FANY SOLANGE USUBA

**Avaliação dos parâmetros clínicos da superfície ocular e
citologia de impressão conjuntival nos pacientes com olho
seco associado a doença reumatológica submetidos a
tratamento com terapia anti-TNF**

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

Programa de Oftalmologia

Orientador: Prof. Dr. Milton Ruiz Alves

São Paulo

2017

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

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

©reprodução autorizada pelo autor

Usuba, Fany Solange

Avaliação dos parâmetros clínicos da superfície ocular e citologia de impressão conjuntival nos pacientes com olho seco associado a doença reumatológica submetidos a tratamento com terapia anti-TNF / Fany Solange Usuba. -- São Paulo, 2017.

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

Programa de Oftalmologia.

Orientador: Milton Ruiz Alves.

Descritores: 1.Ceratoconjuntivite seca 2.Túnica conjuntiva /citologia 3.Fator de necrose tumoral alfa/uso terapêutico 4.Espondilite anquilosante 5.Artrite reumatoide 6.Mediadores da inflamação/uso terapêutico

USP/FM/DBD-377/17

*Feliz aquele que transfere o que sabe
e aprende o que ensina.*

Cora Coralina

DEDICATÓRIA

Em memória de minha mãe, Maria Key,
pelo estímulo a todos os projetos da minha vida.

Ao meu pai, Misawo,
pelo incentivo constante aos meus estudos.

Ao meu marido Roberto,
meu melhor amigo e grande companheiro
pelo apoio a realização desse projeto.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Milton Ruiz Alves pela confiança e oportunidade de realizar este trabalho. Pela inestimável orientação, apoio e ensinamentos ao longo de todo o período da minha formação oftalmológica.

Ao Prof. Dr. Mário Luiz Ribeiro Monteiro coordenador da pós-graduação de Oftalmologia pela oportunidade em participar deste programa.

À Profa. Dra. Eloisa Silva Dutra de Oliveira Bonfá pela oportunidade de realizar o projeto com os pacientes do CEDMAC e pelas contribuições nas discussões do trabalho.

Ao Prof. Dr. Alejandro Berra pela transmissão de seus conhecimentos e experiências.

À Dra. Priscila Novaes pela amizade, apoio e compartilhamento de sua experiência científica e pessoal.

Ao Dr. José Eduardo Pazim pela convivência, auxílio no exame dos pacientes e amizade.

À Dra. Nadia Emi Aikawa pelo apoio e conhecimentos compartilhados.

À Dra. Monique Matsuda pela contribuição no desenvolvimento desse projeto.

À Sra. Regina Ferreira de Almeida, pela amizade, ajuda e dedicação aos projetos na pós-graduação.

Aos funcionários e médicos do ambulatório de Oftalmologia do HCFMUSP, do LIM 33 e do CEDMAC.

Aos pacientes e voluntários deste estudo pela cooperação ao projeto e compaixão pelo próximo contribuindo para o desenvolvimento da ciência.

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

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

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

Abreviaturas dos títulos dos periódicos de acordo com *List of Journals Indexed in Index Medicus*.

SUMÁRIO

SUMÁRIO

Lista de Abreviaturas, Siglas e Símbolos

Lista de Figuras

Lista de Tabelas

Resumo

Abstract

1	INTRODUÇÃO.....	1
2	OBJETIVOS	5
2.1	Objetivos Gerais	6
2.2	Objetivos Específicos	6
3	MÉTODOS	7
3.1	Contexto	8
3.2	Aspectos Éticos	8
3.3	Pacientes e Controles	9
3.4	CrITÉrios de Inclusão	10
3.5	CrITÉrios de Exclusão	11
3.6	Avaliação Oftalmológica	11
3.6.1	Teste de Schirmer	11
3.6.2	Tempo de rompimento do filme lacrimal	12
3.6.3	Tingimento da superfície ocular com corantes vitais	13
3.6.4	Avaliação subjetiva dos sintomas	14
3.6.5	Classificação da intensidade do olho seco	17
3.6.6	Citologia de impressão	18
3.7	Atividade Sistêmica da Doença Reumatológica	21
3.7.1	Avaliação dos parâmetros clínicos na EA e na AR	21
3.7.2	Avaliação laboratorial dos parâmetros inflamatórios	21
3.8	Análise Estatística	22
4	RESULTADOS.....	23
4.1	Espondilite Anquilosante	24
4.2	Artrite Reumatoide	30

5	DISCUSSÃO.....	36
5.1	Espondilite Anquilosante	37
5.2	Artrite Reumatoide	41
6	CONCLUSÕES	46
7	ANEXOS.....	48
	Anexo 1 - Aprovação da Comissão de Ética do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.....	49
	Anexo 2 - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido	51
8	REFERÊNCIAS	54

LISTAS

ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

ACR	<i>American College of Rheumatology</i>
AINH	Anti-inflamatorio não hormonal
AR	Artrite reumatoide
ASAS	<i>Assessments in Ankylosing Spondylitis International Society</i>
BASDAI	<i>Bath Ankylosing Spondylitis Activity Index</i>
BASFI	<i>Bath Ankylosing Spondylitis Functional Index</i>
CAPPesq	Comissão de Ética para Análise de Projeto de Pesquisa
CI	Citologia de impressão
DAS	<i>Disease Activity Score</i>
DEWS	<i>Dry Eye Work Shop</i>
EA	Espondilite anquilosante
EULAR	<i>European League Against Rheumatism</i>
HAQ	<i>Health Assessment Questionnaire</i>
HCFMUSP	Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
IL	Interleucina
LIM	Laboratório de Investigação Médica
Muc 5AC	mucina 5AC
OSDI	<i>Ocular Surface Disease Index</i>
PCR	Proteína C reativa
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
TNF- α	Fator de necrose tumoral α
TRFL	Tempo de rompimento do filme lacrimal
VHS	Velocidade de hemossedimentação
°C	grau Celsius
h	hora
L	litro
μ m	micrometro
mg	miligrama
mL	mililitro
mm	milímetro

n	número
s	segundo
%	porcentagem
$\geq$	maior ou igual a
$\leq$	menor ou igual a
$>$	maior que
$<$	menor que
=	sinal de igual
$\pm$	mais ou menos

FIGURAS

Figura 1 -	Desenho esquemático da divisão da superfície ocular e da córnea.....	14
Figura 2 -	Questionário dos sintomas oculares OSDI-Ocular Surface Disease Index	16
Figura 3 -	Questionário dos sintomas oculares OSDI [®] - <i>Ocular Surface Disease Index</i> . Cálculo do escore e classificação intensidade. Allergan	17
Figura 4 -	Fotografia da citologia de impressão conjuntival. Classificação de Nelson: A) grau 0; B) grau 1; C) grau 2; D) grau 3.....	20
Figura 5 -	Análise prospectiva do teste de Schirmer nos pacientes com Espondilite Anquilosante. $P < 0,05$ entre pré-tratamento e 3 meses (3M)	29
Figura 6 -	Análise prospectiva da citologia de impressão nos pacientes com Espondilite Anquilosante- classificação de Nelson. $P < 0,05$ entre pré-tratamento e 12 meses (12M)	29
Figura 7 -	Análise prospectiva do teste de Schirmer nos pacientes com Artrite Reumatoide. $P < 0,05$ entre pré-tratamento e 3 meses (3M) e pré-tratamento e 12 meses (12M)	34
Figura 8 -	Análise prospectiva da citologia de impressão nos pacientes com Artrite Reumatoide. $P < 0,05$ entre pré-tratamento e 3 meses (3M), pré-tratamento e 12 meses (12M) e entre 3M e 12M.....	35
Figura 9 -	Análise prospectiva da densidade de células caliciformes nos pacientes com Artrite Reumatoide. $P < 0,05$ entre pré-tratamento e 3 meses (3M), entre pré-tratamento e 12 meses (12M) e entre 3M e 12M	35

TABELAS

Tabela 1 -	Graduação da citologia de impressão conjuntival de acordo com o sistema de classificação de Nelson.....	20
Tabela 2 -	Dados demográficos, superfície ocular e parâmetros inflamatórios dos pacientes com Espondilite Anquilosante e grupo controle	26
Tabela 3 -	Análise prospectiva dos pacientes com Espondilite Anquilosante pré e pós-terapia anti-TNF (n=14)	27
Tabela 4 -	Dados demográficos, superfície ocular e parâmetros inflamatórios dos pacientes com Artrite Reumatoide e grupo controle	32
Tabela 5 -	Análise prospectiva dos pacientes com Artrite Reumatoide pré e pós-terapia anti-TNF (n=20).....	34

RESUMO

Usuba FS. *Avaliação dos parâmetros clínicos da superfície ocular e da citologia de impressão conjuntival nos pacientes com olho seco associado a doença reumatológica submetidos a tratamento com terapia anti-TNF* [Tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina. Universidade de São Paulo; 2017.

OBJETIVOS: Avaliar as alterações clínicas da superfície ocular, citologia de impressão (CI) e sintomas de olho seco (OS) dos pacientes com Espondilite Anquilosante (EA) e Artrite Reumatoide (AR). Classificar a intensidade de OS. Avaliar prospectivamente os parâmetros clínicos, laboratoriais e da superfície ocular dos pacientes com EA e AR submetidos a tratamento com drogas anti-TNF. **MÉTODOS:** Estudo prospectivo envolvendo inicialmente (pré-tratamento) 36 pacientes com EA e 20 pacientes com AR comparados com grupo controle de 39 voluntários saudáveis para o grupo de EA e 24 voluntários saudáveis para o grupo de AR. Do total inicial, 14 pacientes consecutivos com EA e 20 pacientes consecutivos com AR foram submetidos a terapia anti-TNF. Foram realizados os seguintes exames: teste de Schirmer I, tempo de rompimento do filme lacrimal, tingimento com corantes vitais e questionário dos sintomas de OS (*Ocular Surface Disease Index*-OSDI), citologia de impressão (CI) conjuntival, avaliação laboratorial inflamatória: velocidade de hemossedimentação e proteína C reativa (VHS e PCR) e atividade da doença pelas medidas de *Bath Ankylosing Spondylitis Activity Index* e *Bath Ankylosing Spondylitis Functional Index* (BASDAI e BASFI respectivamente) na EA e *Disease Activity Score 28* (DAS 28) para AR. Além disso, avaliou-se a qualidade de vida pelo *Health Assessment Questionnaire* (HAQ) para ambas as doenças. As avaliações foram realizadas pré-tratamento e repetidas aos 3 meses (3M) e 12 meses (12M) após o início da terapia. **RESULTADOS:** Na avaliação pré-tratamento com drogas anti-TNF, os pacientes com EA apresentaram OS de intensidade leve a moderada (80,5% versus 43,6%, $p=0,01$) e maior escore de alteração da CI (55% versus 12,8%, $p=0,007$) associados a provas de atividade inflamatórias elevadas ($p<0,001$) quando comparados com controles saudáveis. A avaliação longitudinal do tratamento com terapia anti-TNF demonstrou melhora da produção aquosa lacrimal (pré-tratamento: $13,7 \pm 11,3$ mm, aos 3M: $18,3 \pm 11,1$ mm e aos 12M: $19,3 \pm 9,0$ mm, $p=0,04$) assim como da CI conjuntival (pré-tratamento: 78,6% alterada, aos 3M: 57,1%, e aos 12M: 35,7%, $p=0,03$). Houve, paralelamente, melhora dos parâmetros inflamatórios e da atividade da doença ($p<0,05$). No grupo de pacientes com AR, no momento pré-tratamento com drogas anti-TNF, foram observados maior frequência (75% versus 4%, $p<0,001$) e intensidade leve de OS (65% versus 4%, $p<0,001$) associados a sintomas moderados (escore OSDI $24,0 \pm 17,6$ versus $7,5 \pm 14,3$, $p=0,001$) quando comparados com controles saudáveis. Esses pacientes também apresentaram maior frequência de disfunção das glândulas de meibômio (55,0% versus 8,3%, $p=0,001$), maior escore de alteração da CI conjuntival ($1,0 \pm 0,6$ versus $0,0 \pm 0,2$, $p=0,001$) e menor densidade de células caliciformes ($431,3 \pm 209,5$ células/mm² versus $804,8 \pm 383,2$ células/mm², $p<0,001$) quando comparados com o grupo controle. A análise prospectiva dos pacientes com AR tratados com drogas anti-TNF mostrou um aumento dos valores do teste de Schirmer (pré-

tratamento: $11,8 \pm 6,7$ mm, aos 3M: $21,0 \pm 10,4$ mm, e aos 12M: $23,0 \pm 9,7$ mm, $p < 0,001$), melhora da CI conjuntival (pré-tratamento: $1,0 \pm 0,6$, aos 3M: $0,8 \pm 0,6$, e aos 12M: $0,5 \pm 0,5$, $p = 0,005$) e da densidade de células caliciformes (pré-tratamento: $429 \pm 211,7$ células/mm², aos 3M: $908 \pm 291,4$ células/mm², e aos 12M: $1265,4 \pm 430,6$ células/mm², $p = 0,001$). Os marcadores de atividade inflamatória sistêmicos (VHS e PCR) também melhoraram ao longo do tratamento ($p = 0,005$ e $p = 0,006$, respectivamente).

CONCLUSÃO: Os pacientes com EA e AR avaliados nesse estudo apresentaram prevalência elevada de OS de intensidade leve a moderada associada à alteração da citologia conjuntival. A recuperação precoce e manutenção de longo prazo na produção aquosa da lágrima e na CI conjuntival, em especial, das células caliciformes, nos pacientes submetidos a terapia anti-TNF, pode refletir a melhora da condição inflamatória. Esse resultado histológico pode ter influência como biomarcador da inflamação na superfície ocular.

Descritores: 1. Ceratoconjuntivite seca 2. Túnica conjuntiva/citologia 3. Fator de necrose tumoral alfa/uso terapêutico 4. Espondilite anquilosante 5. Artrite reumatoide 6. Mediadores da inflamação/uso terapêutico.

ABSTRACT

Usuba FS. *Evaluation of ocular surface clinical parameters and conjunctival impression cytology of rheumatic disease associated dry eye patients submitted to anti-TNF therapy* [Thesis]. São Paulo: "Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo"; 2017.

OBJECTIVES: Evaluate ocular surface parameters, impression cytology (IC) and dry eye (DE) symptoms of patients with Ankylosing Spondylitis (AS) and Rheumatoid Arthritis (RA). Classify DE severity grade. Analyse prospectively clinical and laboratory, as well as ocular surface parameters of AS and RA patients, submitted to anti-TNF therapy. **METHODS:** This prospective study initially (baseline) enrolled 36 AS patients and 20 RA patients who were compared to a control group of 39 and 24 healthy volunteers for the AS group and RA group, respectively. From the initial group, 14 consecutive AS and 20 consecutive RA patients received anti-TNF therapy. They underwent the following exams: Schirmer I test, tear break-up time, vital dyes staining of the ocular surface, a questionnaire for dry eye symptoms- Ocular Surface Disease Index (OSDI), and conjunctival IC. Laboratory tests for inflammatory activity were assessed by erythrocyte sedimentation rate and C- reactive protein (ESR and CRP). The Bath Ankylosing Spondylitis Activity Index and Bath Ankylosing Spondylitis Functional Index (BASDAI and BASFI, respectively) in AS and Disease Activity Score 28 (DAS 28) in RA analyzed disease activity parameters. Besides, the Health Assessment Questionnaire evaluated the quality of life in both group of diseases. These measurements were taken at baseline (BL) and repeated at 3 months and 12 months (3M and 12M, respectively) after the beginning of anti-TNF therapy. **RESULTS:** At the baseline moment, AS patients presented mild to moderate DE (80.5% vs 43.6%, $p=0.01$) and a higher score of altered IC (55% vs 12.8%, $p=0.007$) associated with the systemic inflammatory activity (ESR and CRP, $p<0.001$) when compared to healthy volunteers. The longitudinal evaluation of anti-TNF treatment showed an improvement of aqueous tear production (BL: 13.7 ± 11.3 mm, 3M: 18.3 ± 11.1 mm and 12M: 19.3 ± 9.0 mm, $p=0.04$). The IC also improved (BL: 78.6% altered IC, 3M: 57.1% and 12M: 35.7%, $p=0.03$). There was a parallel amelioration of systemic inflammatory markers and disease activity ($p<0.05$). Concerning the RA group of patients, at the baseline moment, there was a higher frequency of DE (75% vs 4%, $p<0.001$) as well as mild DE severity grade (65% vs 4%, $p<0.001$) associated with moderate symptoms of DE (OSDI score: 24.0 ± 17.6 vs 7.5 ± 14.3 , $p=0.001$) when compared to healthy volunteers. This group of patients also presented higher frequency of meibomian gland dysfunction (55% vs 8.3%, $p=0.001$), a worse score of IC (1.0 ± 0.6 vs 0.0 ± 0.2 , $p=0.001$) and lower goblet cells count (431.3 ± 209.5 cells/mm² vs 804.8 ± 383.2 cells/mm², $p<0.001$) when compared to the control group. The prospective analysis of RA patients treated with anti-TNF drugs demonstrated an increase of Schirmer's test (BL: 11.8 ± 6.7 , 3M: 21.0 ± 10.4 , 12M: 23.0 ± 9.7 , $p<0.001$) and an improvement of cytological grade (BL: 1.0 ± 0.6 , 3M: 0.8 ± 0.6 , 12M: 0.5 ± 0.5 , $p=0.005$) and goblet cells density (BL: 429.0 ± 211.7 cells/mm², 3M: 908.0 ± 291.4 cells/mm², 12M: 1265.4 ± 430.6 cells/mm², $p=0.001$). The systemic inflammatory markers (ESR and CRP) also improved throughout the

treatment period ($p=0.005$ and $p=0.006$, respectively). **CONCLUSION:** Patients with AS and RA enrolled in this study presented a higher prevalence of mild to moderate DE associated with altered IC. The prompt and maintained aqueous tear and conjunctival cytology recovery, especially the goblet cells, in patients submitted to anti-TNF therapy seem to represent the improvement of inflammatory condition. This histological outcome may have an influence as a biomarker of ocular surface inflammation.

Descriptors: 1. Keratoconjunctivitis sicca 2. Conjunctiva/cytology 3. Tumor necrosis factor-alpha/therapeutic use 4. Spondylitis, ankylosing 5. Arthritis, rheumatoid 6. Inflammation mediators/therapeutic use.

1 INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

As doenças da superfície ocular (córnea, conjuntiva, glândulas lacrimais acessórias e glândulas de meibômio) como a ceratoconjuntivite *sicca* ou olho seco (OS) estão comumente associadas a doenças sistêmicas autoimunes como artrite reumatoide (AR)¹, lupus eritematoso sistêmico², doença mista do tecido conectivo³, espondilite anquilosante (EA)⁴ e síndrome de Sjögren (SS)^{5,6}.

A expressão clínica e a fisiopatologia do OS mudaram recentemente: “O OS é definido como uma doença multifatorial da superfície ocular caracterizada por uma perda da homeostase do filme lacrimal e acompanhada por sintomas oculares no qual a instabilidade do filme lacrimal, a hiperosmolaridade, inflamação e dano da superfície ocular e anormalidades neurosensoriais têm papel etiológico”⁷. O OS devido a insuficiência de produção lacrimal ou excesso de evaporação causa um dano à superfície ocular interpalpebral que resulta em sintomas de desconforto ocular⁸⁻¹⁰, distúrbios visuais¹¹⁻¹³ e instabilidade do filme lacrimal podendo causar potenciais danos à superfície ocular e à função visual¹⁴. Esse quadro é acompanhado por aumento da osmolaridade da lágrima¹⁵⁻¹⁸ e inflamação da superfície ocular^{19,20}, que por sua vez, causam danos às células epiteliais superficiais: o acúmulo de linfócitos T nos tecidos lacrimais e subconjuntivais está associado à liberação de citocinas pró-inflamatórias (IL-1, IL-6 e TNF- α) e metaloproteinases da matriz, tanto na lágrima como

nos tecidos da superfície ocular^{6,20-22}. O desenvolvimento da apoptose das células da superfície ocular no OS apresenta uma via de sinalização intrínseca por meio da proteína quinase mitogenicamente ativada associada ao estresse e uma via extrínseca representada por fator de necrose tumoral (TNF) e molécula Fas e seu ligante (FasL)^{23,24}. A inflamação crônica e apoptose podem ter um papel central no desenvolvimento do OS promovendo alterações patológicas conjuntivais como metaplasia escamosa e perda de células caliciformes que podem ser visualizadas nas análises citológicas da conjuntiva dos pacientes com OS^{25,26}. Contreras-Ruiz et al.²⁷ observaram num estudo experimental que a apoptose das células caliciformes conjuntivais de ratos foi primariamente induzida por TNF- α e IFN- γ .

O estudo desses processos contribui para novas estratégias terapêuticas para o OS incluindo secretagogos, andrógenos, soro autólogo tópico, derivados da tetraciclina e outras drogas anti-inflamatórias e imunobiológicas como os anticorpos monoclonais²⁸⁻³⁰. Recentemente, o uso de novos agentes imunobiológicos, como os bloqueadores de TNF, tem sido investigado para o tratamento de doenças inflamatórias oculares como uveítes, esclerites, ceratites e neuropatias ópticas isquêmicas, uma vez que estas drogas podem atacar mais especificamente o alvo molecular e potencialmente prevenir a progressão da doença^{31,32}. O uso das drogas bloqueadoras de TNF nas doenças oculares foi iniciado devido ao sucesso limitado e falência dos esteróides e drogas imunossupressoras para o controle da inflamação ocular, a alta taxa de efeitos colaterais causados

pelos agentes esteróides e o êxito clínico prévio das drogas anti-TNF em controlar doenças inflamatórias sistêmicas. As drogas anti-TNF são anticorpos monoclonais recombinantes da imunoglobulina humana (IgG1) que se ligam com alta afinidade e alta especificidade ao fator de necrose tumoral e consequentemente, inibem a ação das citocinas TNF- α pró-inflamatórias que têm participação no mecanismo multifatorial do desenvolvimento do OS^{6,23}. A droga infliximabe é um anticorpo monoclonal quimérico humano-murino, o adalimumabe é um anticorpo monoclonal recombinante da imunoglobulina humana contendo apenas sequências humanas de peptídeos e o etanercepte é uma proteína de fusão dimérica do receptor p75 com fragmento Fc da imunoglobulina humana podendo se ligar ao TNF- α e TNF- β ³¹.

Na literatura pesquisada, nenhum estudo caracterizou longitudinalmente as alterações clínicas da superfície ocular e da citologia de impressão conjuntival em sujeitos submetidos a terapia anti-TNF.

2 OBJETIVOS

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVOS GERAIS

2.1.1. Caracterizar as alterações clínicas da superfície ocular por meio dos exames: teste de Schirmer, tempo de rompimento do filme lacrimal (TRFL), tingimento com corantes vitais e aplicação do questionário de sintomas de OS dos pacientes com EA e AR.

2.1.2. Classificar a intensidade do olho seco na EA e AR.

2.1.3. Classificar as alterações da citologia de impressão conjuntival na EA e AR.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

2.2.1. Avaliação prospectiva dos parâmetros clínicos oculares, alterações citológicas da superfície ocular, atividade inflamatória (atividade clínica da doença e laboratorial) dos pacientes com EA e AR ativos submetidos a tratamento sistêmico com drogas anti-TNF.

2.2.2. Avaliação da relação entre os parâmetros oculares e clínico/laboratoriais relacionados à inflamação sistêmica dos pacientes com EA e AR.

3 MÉTODOS

3 MÉTODOS

3.1 CONTEXTO

O presente estudo foi planejado e executado no ambulatório de Córnea e Doenças Externas do Departamento de Oftalmologia do HCFMUSP em conjunto com a Divisão de Reumatologia do HCFMUSP. Os pacientes avaliados foram acompanhados ambulatorialmente no Centro de Dispensação de Medicação de Alta Complexidade (CEDMAC). O processamento das amostras das citologias de impressão foi realizado no Laboratório de Investigação Médica da Clínica Oftalmológica (LIM 33).

3.2 ASPECTOS ÉTICOS

O estudo foi aprovado pela Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa-CAPPesq do HCFMUSP, sob o número CAAE 37166914.8.0000.0068 (ANEXO 1). Todos os sujeitos concordaram em participar do estudo e assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) antes do seu início (ANEXO 2).

3.3 PACIENTES E CONTROLES

Para o estudo inicial, foram selecionados 36 pacientes consecutivos com diagnóstico de Espondilite Anquilosante de acordo com os critérios de Nova Iorque modificados para o diagnóstico de EA³³ e 20 pacientes consecutivos com diagnóstico de Artrite Reumatoide de acordo com o *American College of Rheumatology/ European League Against Rheumatism* (ACR/EULAR criteria)³⁴. Voluntários sadios para o grupo controle foram selecionados, pareados por idade e sexo: 39 sujeitos do banco de dados do LIM 33 para o estudo com pacientes com EA e 24 sujeitos para AR, funcionários do Hospital Universitário da Universidade de São Paulo. Todos os voluntários foram avaliados com a mesma metodologia que os pacientes com EA e AR.

Deste total, 14 pacientes consecutivos com EA e 20 pacientes consecutivos com AR que apresentaram resposta inadequada aos medicamentos anti-inflamatórios não hormonais (AINH) e às drogas antirreumáticas modificadoras da doença (DMARD) foram considerados elegíveis para receber drogas anti-TNF segundo as recomendações do grupo *Assessment in Ankylosing Spondylitis International Society* e da *European League Against Rheumatism* (ASAS/EULAR)³⁵ para os pacientes com EA e do EULAR para os pacientes com AR³⁶. O uso de AINH e de medicações DMARD (sulfassalazina, metotrexato, azatioprina, leflunomida e cloroquina) foi mantido estável durante a terapia anti-TNF.

Os pacientes foram examinados prospectivamente em três diferentes ocasiões: uma primeira avaliação pré-tratamento no momento da inclusão ao estudo e duas avaliações após o início da terapia anti-TNF, aos 3 e 12 meses (3M e 12M, respectivamente). A análise longitudinal dos parâmetros oculares, citologia de impressão conjuntival, marcadores inflamatórios e parâmetros clínicos foi realizada com os dados colhidos no início do estudo e aos 3M e 12M do tratamento.

3.4 CRITÉRIOS DE INCLUSÃO

1) pacientes com doença reumatológica em atividade (EA e AR) que foram submetidos a tratamento sistêmico com medicações bloqueadoras de TNF (infliximabe, adalimumabe ou etanercepte) em suas respectivas doses preconizadas;

2) sexo feminino ou masculino;

3) maiores de 18 anos de idade;

4) aceitar participar do estudo após leitura e assinatura do TCLE.

3.5 CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO

- 1) apresentar doença ocular ativa, infecções, alergia, glaucoma;
- 2) uso de medicações oculares anti-inflamatórias como ciclosporina, corticosteróides ou para tratamento de glaucoma;
- 3) ter realizado procedimentos oculares: cirurgia refrativa, cirurgias intraoculares, colocação de plugue para oclusão do ponto lacrimal ou cauterização do ponto lacrimal);
- 4) uso de lentes de contato;
- 5) uso de medicações sistêmicas que afetem a produção aquosa da lágrima (anti-histamínicos, anti-hipertensivos, ansiolíticos, antidepressivos) nos pacientes com EA.

3.6 AVALIAÇÃO OFTALMOLÓGICA

Após exame oftalmológico completo pré-tratamento, incluindo teste de acuidade visual com o emprego da tabela de Snellen e exame ocular das pálpebras, córnea e conjuntiva sob biomicroscopia na lâmpada de fenda, foram realizados:

3.6.1 Teste de Schirmer

Todos os sujeitos foram submetidos ao teste de Schirmer I, sem anestesia³⁷. Tiras de papel filtro do tipo Whatman I, graduadas em

milímetros (Ophthalmos[®], São Paulo, Brasil), foram colocadas entre o terço medial e o terço distal da pálpebra inferior. Os sujeitos foram instruídos a fecharem os olhos, mantendo-se nessa posição por 5 minutos. A fita foi então retirada e lida após 1 minuto: a extensão da área molhada foi mensurada conforme a escala contida na fita que apresenta graduação de 0 a 35 milímetros. Resultados abaixo de 10 mm foram considerados com produção lacrimal alterada³⁷.

3.6.2 Tempo de rompimento do filme lacrimal

Para medida do TRFL foram utilizadas tiras de papel filtro impregnadas com 1,0 mg de fluoresceína sódica (Ophthalmos[®], São Paulo, Brasil). No momento do exame adicionou-se a cada tira uma gota de solução fisiológica a 0,9%, retirou-se o excesso e, na sequência, o restante foi depositado na superfície da conjuntiva tarsal inferior de cada olho separadamente. Na lâmpada de fenda, com magnificação de 10x, utilizando-se o filtro azul-cobalto, pediu-se para o paciente piscar várias vezes para espalhar o corante. A seguir, o paciente foi orientado a parar de piscar e fixar o olhar para a frente, quando então o cronômetro foi acionado. Marcou-se o tempo até o aparecimento do primeiro rompimento no filme lacrimal. Foram realizadas 3 medidas consecutivas para cada olho, que foram somadas e divididas por 3 para obtenção do valor médio do TRFL. Valores menores que dez segundos foram considerados alterados³⁷.

3.6.3 Tingimento da superfície ocular com corantes vitais

Corante fluoresceína: foram utilizadas tiras impregnadas com fluoresceína conforme descrito acima. O sistema de Van Bijsterveld foi utilizado para mensurar o tingimento dos corantes³⁸. Para fins de graduação, a córnea foi dividida em 3 regiões (superior, central e inferior) e foi utilizado um escore de 0 a 3 para cada região, podendo somar um total máximo de 9 por olho (Figura 1).

Corante lissamina verde: foram utilizadas tiras impregnadas com 1,5 mg de lissamina verde (Ophthalmos[®], São Paulo, Brasil). No momento do exame adicionou-se à cada tira uma gota de solução fisiológica a 0,9% que, após remoção do excesso, foi depositada na região tarsal inferior e/ou fundo de saco conjuntival inferior de cada olho separadamente. Para fins de graduação, a conjuntiva foi dividida em 3 regiões (nasal, central e temporal) e foi utilizada um escore de 0 a 3 para cada região, sendo 0 a ausência do corante e 3 a impregnação confluyente, podendo somar um total máximo de 9 por olho (Figura 1). Um escore total ≥ 3 para um olho, constituiria um teste positivo³⁷.

Pontuação com Lissamina Verde
Conjuntiva

Pontuação máxima total=9

Pontuação com Fluoresceína
Córnea

Pontuação máxima total= 9

Figura 1 – Desenho esquemático da divisão da superfície ocular e da córnea

3.6.4 Avaliação subjetiva dos sintomas

Índice de Doença da Superfície Ocular - Ocular Surface Disease Index (OSDI)

Utilizou-se uma versão em português do questionário *Ocular Surface Disease Index (OSDI)*, desenvolvido na língua inglesa e culturalmente adaptado e validado para o português e para o uso em pacientes com OS, com o intuito de avaliar os sintomas como sensação de areia, dor ocular e alteração visual; o impacto nas atividades da vida diária como leitura, dirigir

veículo à noite ou trabalhar com computador; e fatores ambientais desencadeando desconforto como vento ou ar condicionado. Todas as questões são referentes aos últimos sete dias^{39,40}. Esse é um questionário composto por 12 questões: a soma do escore dessas questões é multiplicada por 25 e dividida pelo número total de questões respondidas. O escore varia de 0 a 100, com os maiores valores indicando maior impedimento (normal: 0-12, OS leve: 13-22, OS moderado: 23-32 e OS grave: acima de 33)⁴¹ (Figura 2). Para avaliar a classificação da intensidade dos sintomas foi utilizado o gráfico do OSDI (Allergan) – (Figura 3).

OSDI

Data:

Nome:

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

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

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

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

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

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

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

Figura 2 – Questionário dos sintomas oculares OSDI – Ocular Surface Disease Index

Avaliação OSDI® Instrumento validado e aprovado pelo FDA e pelo The National Eye Institute

Faça ao seu paciente as 12 perguntas seguintes e anote o número na coluna que melhor represente cada resposta. Posteriormente, some a nota obtida em cada grupo de perguntas e preencha os campos A, B e C. Os campos D e E deverão ser preenchidos de acordo com as instruções de cada um.

A Experimentou qualquer dos seguintes sintomas durante a última semana?

	0 tempo todo	A maior parte do tempo	A metade do tempo	Às vezes	Nunca
1. Olhos sensíveis à luz?	4	3	2	1	0
2. Sensação de areia nos olhos?	4	3	2	1	0
3. Dor ou vermelhidão dos olhos?	4	3	2	1	0
4. Visão embaçada?	4	3	2	1	0
5. Visão deficiente?	4	3	2	1	0

Soma das notas para as perguntas de 1 a 5 **A**

B Os problemas com os seus olhos limitaram a realização de qualquer das seguintes atividades durante a última semana?

	0 tempo todo	A maior parte do tempo	A metade do tempo	Às vezes	Nunca
6. Ler?	4	3	2	1	0
7. Dirigir à noite?	4	3	2	1	0
8. Trabalhar com o computador ou usar o caixa eletrônico?	4	3	2	1	0
9. Assistir televisão?	4	3	2	1	0

Soma das notas para as perguntas de 6 a 9 **B**

C Sentiu desconforto nos olhos em qualquer uma das seguintes situações durante a última semana?

	0 tempo todo	A maior parte do tempo	A metade do tempo	Às vezes	Nunca
10. Com vento	4	3	2	1	0
11. Locais ou áreas muito secos	4	3	2	1	0
12. Locais com ar condicionado	4	3	2	1	0

Soma das notas para as perguntas de 10 a 12 **C**

D = RESULTADO DAS NOTAS DE A + B + C **D**

E = QUANTIDADE DE PERGUNTAS RESPONDIDAS **E**
não inclua as perguntas marcadas S/R (SEM Resposta)

Para um resultado preciso consulte sua régua OSDI®

Resultado da Avaliação OSDI®

A OSDI® é um instrumento válido e confiável para medir a gravidade da doença do olho seco e o efeito na função relacionada com a visão. OSDI® é avaliado em uma escala de 0 a 100, sendo os resultados mais elevados os que representam maior impedimento.

No seguinte quadro, localize os resultados D e E do questionário no eixo correspondente. Localize o resultado de seu paciente e compare a intensidade da cor vermelha com o guia.

Perguntas respondidas (E)	5	10	15	20	25	30	35	40	45	48
12	10.4	20.8	31.2	41.7	52.1	62.5	72.9	83.3	93.8	100.0
11	11.4	22.7	34.1	45.5	56.8	68.2	79.5	90.9	100.0	
10	12.5	25.0	37.5	50.0	62.5	75.0	87.5	100.0		
9	13.6	27.2	40.7	53.6	66.4	79.3	92.2			
8	14.6	29.3	43.9	57.8	71.4	85.0	98.6			
7	17.0	33.7	50.6	67.4	83.3	100.0				
6	20.8	41.7	62.5	83.3	100.0					
5	25.0	50.0	75.0	100.0						
4	31.2	62.5	93.8							
3	41.7	83.3								
2	62.5									
1										

Resultado da nota (D)

Normal Leve Moderado Severo

* Os valores para determinar a gravidade da doença do olho seco se calcularam utilizando a fórmula OSDI®:

$$OSDI^{\circ} = \frac{(\text{resultado da nota}) \times 25}{(\text{N}^{\circ} \text{ de perguntas respondidas})}$$

Nome do paciente: _____ Data: _____

Há quanto tempo o paciente sofre de olho seco? _____

Comentários do oftalmologista _____

Coloque esta avaliação na ficha do paciente para acompanhamento do tratamento na próxima consulta.

Figura 3 - Questionário dos sintomas oculares OSDI®- *Ocular Surface Disease Index*. Cálculo do escore e classificação intensidade. Allergan

3.6.5 Classificação da intensidade do olho seco

Foi utilizado o sistema modificado do *Dry Eye Work Shop* (DEWS)⁴² que inclui escore de sintomas e sinais clínicos. A graduação da intensidade varia de 1 a 4 (leve, leve/moderado, moderado e intenso, respectivamente). Grau 1 (leve): sintomas leves, ausência de tingimento da córnea e conjuntiva, disfunção das glândulas de meibômio (DGM) variavelmente presente⁶, valores variáveis do teste de Schirmer e do TRFL. Grau 2 (leve/moderado): sintomas moderados, escore do tingimento da córnea e conjuntiva variável, DGM variavelmente presente, teste de Schirmer ≤ 10

mm e TRFL ≤ 10 segundos. Grau 3 (moderado): sintomas graves ou frequentes, escore do tingimento da córnea e conjuntiva moderado a elevado, DGM frequentemente presente, teste de Schirmer ≤ 5 mm e TRFL ≤ 5 segundos. Grau 4 (intenso): sintomas graves, escore do tingimento da córnea e conjuntiva elevado, presença de triquíase, queratinização e simbléfaro, teste de Schirmer ≤ 2 mm e TRFL imediato.

3.6.6 Citologia de impressão

A técnica da citologia de impressão foi utilizada para obtenção de amostras da camada superficial das células epiteliais da conjuntiva bulbar temporal inferior²⁶.

Filtros semicirculares de 15 mm de diâmetro de acetato de celulose (Millipore GVWP, PVDF, poro de 0,22 μ m, Millipore Corp., Bedford, MA, USA) foram justapostos à conjuntiva bulbar temporal inferior após a instilação de uma gota de colírio anestésico (proximetacaína 5mg/ml, Anestalcon[®], Alcon) em cada olho. Os fragmentos do filtro foram aplicados por aproximadamente 10 segundos e, após leve pressão com a ponta romba de uma pinça cirúrgica em toda extensão do fragmento do filtro, foram removidos suavemente por uma das extremidades e imediatamente imersos em pequenos tubos contendo 1,5 ml de álcool absoluto. Após a coleta as amostras foram levadas ao LIM 33, onde foram processadas em um período de até um mês. Os espécimes foram então lavados com água e imersos em ácido periódico a 0,5%. Na sequência, foram lavados com água e imersos no reagente de Schiff. Foram novamente lavados com água e imersos em

Hematoxilina de Carazzi. Para a montagem das lâminas os fragmentos de papel filtro corados foram imersos em álcool a 96%, álcool absoluto e xilol 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 com campos de alta magnificação (400x)⁴³. A classificação das alterações citológicas foi realizada de acordo com o critério de Nelson²⁶ baseado na morfologia das células epiteliais, razão núcleo/citoplasma e densidade das células caliciformes: grau 0 foi considerado normal e graus 1, 2 e 3 foram considerados alterados (Tabela 1). A cada lâmina foram avaliados 10 campos de alta magnificação e realizada a média da classificação (Figura 4). Foi feita a contagem do número de células caliciformes no grupo de pacientes com AR para obtenção da média em 13 campos de alta magnificação por lâmina^{43,44}. A análise das lâminas foi feita de forma mascarada.

Para uniformização dos parâmetros oculares, todas as medidas foram colhidas dentro do mesmo período do dia (entre 13:00h e 16:00h), com temperatura variando de 19 °C a 24 °C e umidade relativa do ar entre 55 e 70%.

Tabela 1 - Graduação da citologia de impressão conjuntival de acordo com o sistema de classificação de Nelson

Achados	Grau 0	Grau 1	Grau 2	Grau 3
Tamanho célula	Pequeno <1,0 μm^2	Pequeno <1,0 μm^2	Grande >1,0 μm^2	Grande >1,0 μm^2
Citoplasma	Eosinofílico	Eosinofílico	Variável	Basofílico
Núcleo	Grande	Menor grau 0	Pequeno	Picnótico
Relação núcleo:citoplasma	1:2	1:3	1:4-1:5	1:6
Células caliciformes	>500	350-500	100-350	<100
Citoplasma células caliciformes	PAS +++	PAS+++	PAS ++	PAS -

PAS - ácido periódico de Schiff

Figura 4 - Fotografia da citologia de impressão conjuntival Classificação de Nelson: A) grau 0; B) grau 1 C) grau 2; D) grau 3

3.7 ATIVIDADE SISTÊMICA DA DOENÇA REUMATOLÓGICA

3.7.1 Avaliação dos parâmetros clínicos na EA e na AR

A avaliação da atividade da doença para os pacientes com EA foi realizada com medidas clínicas preconizadas, incluindo *Bath Ankylosing Spondylitis Activity Index* (BASDAI), *Bath Ankylosing Spondylitis Functional Index* (BASFI), e dos pacientes com AR incluiu *Disease Activity Score 28* (DAS 28) [remissão $\leq 2,6$; baixa $< 3,2$; moderada $3,2-5,1$ e alta $> 5,1$]⁴⁵. A qualidade de vida foi avaliada pelo *Health Assessment Questionnaire* (HAQ) na EA e na AR. Essas medidas foram avaliadas no início do estudo e aos 3 e 12 meses após o início do tratamento.

3.7.2 Avaliação laboratorial dos parâmetros inflamatórios

A atividade inflamatória das doenças reumatológicas de base foi avaliada por exames séricos: velocidade de hemossedimentação (VHS) em mm/1^ah medida, pelo método de Westergren automatizado, e pela dosagem da proteína C reativa (PCR) em mg/L, pelo método nefelométrico.

3.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados estão apresentados como percentagem para as variáveis categóricas. Com relação às variáveis quantitativas, todos os valores foram expressos como média $\pm$ desvio padrão para variáveis com distribuição normal ou como mediana para variáveis com distribuição assimétrica. A aderência à distribuição normal foi avaliada pelo teste de Kolmogorov-Smirnov. Para variáveis categóricas, as diferenças foram avaliadas por teste qui-quadrado ou teste exato de Fisher. Variáveis quantitativas foram analisadas pelo teste t ou de Mann-Whitney. Para avaliar a diferença entre resultados pré e pós-tratamento (3M e 12M) aplicou-se o teste de análises de medidas repetidas de Friedman e quando houve diferenças estatisticamente significantes aplicou-se o Teste dos Postos Sinalizados de Wilcoxon, ajustado pela Correção de Bonferroni para identificar quais momentos de observação diferenciavam-se entre si. Associação entre as variáveis clínicas e laboratoriais foram determinadas usando correlação de Spearman. A significância estatística foi estabelecida com valores de $p < 0,05$.

4 RESULTADOS

4 RESULTADOS

4.1 Espondilite Anquilosante

A idade dos pacientes com EA foi comparável ao do grupo controle (40,0 versus 42,0 anos, $p=0,08$), assim como a frequência do sexo masculino (89,2 versus 89,7%, $p=1,0$). O tempo de duração da doença foi de $17,8 \pm 11,8$ anos (Tabela 2).

Trinta e seis pacientes com EA e 39 voluntários sadios para o grupo controle foram avaliados para OS como segue: 14 (38,8%) pacientes versus 10 (25,6%) controles apresentaram resultado do teste de Schirmer ≤ 10 mm ($p=0,9$) e um resultado do teste de Schirmer mais baixo (≤ 5 mm) em 7 (19,4%) pacientes versus 4 (10,2%) controles ($p=0,1$) e mediana de 16 (2-35) mm nos pacientes e 15 (4-35) mm nos controles ($p=0,9$). O teste do TRFL estava alterado (≤ 10 segundos) em 28 (77,6%) pacientes versus 29 (74,3%) controles ($p=0,6$) e em 14 (38,8%) pacientes o TRFL foi ≤ 5 segundos versus 15 (38,4%) voluntários ($p=0,8$) com valor semelhante nos dois grupos [8 (3-15) segundos nos pacientes versus 7 (3-20) segundos nos controles, $p=0,8$] (Tabela 2). O escore do tingimento com fluoresceína foi de 1/9 em 5 (13,8%) pacientes. O escore do tingimento com lissamina verde foi de 1/9 em 5 (13,8%) pacientes, escore 2/9 em 1 (2,7%) paciente e escore 3/9 em 1 (2,7%) paciente. O tingimento conjuntival com lissamina verde foi menor nos pacientes com EA quando comparados ao grupo controle (escore

0 versus 1, $p=0.006$). Entretanto, nos dois grupos o escore médio estava dentro dos valores normais. A disfunção das glândulas de meibômio estava presente em 18 (50%) pacientes versus 21 (53,7%) controles ($p=0,7$). A mediana do OSDI foi de 6,2 (0-84,8) no grupo dos pacientes versus 2,5 (0-20,8) no grupo controle ($p=0.1$).

A comparação dos parâmetros oftalmológicos demonstrou maior grau de intensidade do OS (80,5% versus 43,6%, $p=0,003$) e maior escore de alteração da CI [1 (0-2) versus 0 (0-2), $p=0,01$] nos pacientes com EA quando comparados com os voluntários sadios. A CI estava alterada em 20 (55,5%) pacientes [17 (47,2%) pacientes apresentaram grau 1 e 3 (8,3 %) pacientes, grau 2]; o grupo controle apresentou CI alterada em 12,8% dos casos [grau 1 em 3 (7,7%) indivíduos e grau 2 em 2 (5,1%) indivíduos] ($p=0,007$). Ademais, as provas de atividade inflamatória (VHS e PCR) estavam elevadas nos pacientes com EA ($p<0,001$) em relação aos indivíduos sadios (Tabela 2). Nove (25%) pacientes tinham um diagnóstico prévio de uveíte anterior.

Tabela 2 - Dados demográficos, superfície ocular e parâmetros inflamatórios dos pacientes com Espondilite Anquilosante e grupo controle

	EA (n=36)	Controle (n=39)	p
Dados demográficos			
Idade (anos)	40 (17 - 63)	42 (23 – 59)	0,08
Sexo masculino (%)	89,2	89,7	0,8
Parâmetros da superfície ocular			
Schirmer (mm)	16,0 (2 – 35)	15,0 (4 – 35)	0,9
Schirmer ≤ 10mm (%)	38,8	25,6	0,3
Schirmer ≤ 5mm (%)	19,4	10,3	0,3
TRFL (segundos)	8,0 (3 – 15)	7,0 (3 – 20)	0,7
Fluoresceína (escore)	0 (0 – 1)	0 (0 – 0)	0,3
Lissamina verde (escore)	0 (0 – 3)	1,0 (0 – 3)	0.006
OSDI (escore)	6,2 (0 – 84.8)	2,5 (0 – 20.8)	0,1
Citologia Impressão (escore)	1 (0 – 2)	0 (0 – 1)	0,015
CI alterada (%)	55,5	12,8	0,007
DGM (%)	50,0	53,7	0,7
Olho seco (%)	80,5	43,6	0,011
Intensidade OS (%)			
Ausente	19,5	56,4	0,003
Leve	50,0	35,8	
Leve/moderada	22,2	7,8	
Moderada	8,3	0,0	
Parâmetros inflamatórios			
VHS (mm/1 ^a h)	15,0 (2 – 75)	2,0 (1 – 79)	<0,001
PCR (mg/L)	20,5 (0,3 – 81,9)	2,6 (0,1 – 5,9)	<0,001

EA: espondilite anquilosante; TRFL: tempo de rompimento do filme lacrimal; OSDI: Ocular Surface Disease Index; CI: citologia de impressão; DGM: disfunção das glândulas de meibômio; VHS: velocidade de hemossedimentação; PCR: proteína C-reativa; $p < 0.05$

Tabela 3 - Análise prospectiva dos pacientes com Espondilite Anquilosante pré e pós-terapia anti-TNF (n=14)

	Pré	3M	12M	p
Parâmetros Oftalmológicos				
Schirmer (mm)	10,0 (2 – 35)	17,5 (4 – 35)	20,0 (4 – 30)	0,04*
Schirmer ≤ 10mm (%)	28,6	28,6	28,6	1,0
Schirmer ≤ 5mm (%)	21,4	14,3	21,4	0,5
TRFL (segundos)	7,0 (3 – 15)	8,0 (0 – 15)	8,0 (3 – 15)	0,8
Fluoresceína (escore)	0 (0 - 1)	0 (0 – 1)	0 (0 – 1)	0,8
Lissamina verde (escore)	0 (0 - 1)	0 (0 - 0)	0 (0 - 1)	0,4
OSDI (escore)	1,2 (0 - 84)	0 (0 – 81)	5,4 (0 – 84)	0,6
CI (escore)	1,0 (0 – 2)	1,0 (0 – 1)	0 (0 – 1)	0,006^{†‡}
CI alterada (%)	78,6	57,1	35,7	0,03[†]
Parâmetros atividade doença				
BASDAI	5,1 (1,04 – 8,16)	2,1 (0 – 7,76)	3,0 (0 – 7,33)	0,009*[†]
BASFI	5,2 (1,31 – 8,49)	2,3 (0 – 8,25)	3,0 (0 – 7,1)	0,01*[†]
HAQ	0,88 (0-2,13)	0,38 (0-1,88)	0,5(0-1,75)	0,02*
VHS (mm/1 ^a h)	20,0 (7 – 67)	4,0 (2 – 23)	7,0 (1 – 35)	0,01*
PCR (mg/L)	29,6 (2,5 – 81,9)	2,73 (0,15 – 30,4)	3,02 (0,3 – 22,8)	<0,001*[†]

3M: 3 meses; 12M:12 meses; TRFL: tempo de rompimento do filme lacrimal; OSDI: *Ocular Surface Disease Index*; CI: citologia de impressão (alterada: graus 1, 2 e 3; BASDAI: *Bath Ankylosing Spondylitis Disease Activity Index*; BASFI: *Bath Ankylosing Spondylitis Functional Index*; HAQ: *Health Assessment Questionnaire*; VHS: velocidade de hemossedimentação; PCR: proteína C-reativa; * p < 0,05 entre pré vs. 3M; [†] p < 0,05 entre pré vs. 12M ; [‡] p < 0,05 entre 3M vs. 12M

Do total de 36 pacientes com EA, 14 pacientes receberam terapia anti-TNF (Tabela 3). A média dos valores do teste de Schirmer nesses pacientes aumentou durante o período de seguimento (pré-tratamento: $13,7 \pm 11,3$ mm, 3M: $18,3 \pm 11,1$ mm, 12M: $19,3 \pm 9,0$ mm, $p=0,04$) (Figura 5). Não houve diferenças estatisticamente significativas nos valores do TRFL, nos escores dos tingimentos com fluoresceína e lissamina verde, e OSDI aos 3M e 12M (Tabela 3). Houve melhora da alteração da CI para o escore normal quando comparados pré-tratamento e 12M (78,6% versus 35,7%, $p=0,03$) (Figura 6). Todos os parâmetros de atividade da doença e inflamatórios melhoraram e nenhum paciente apresentou episódio de iridociclite na vigência do tratamento com drogas anti-TNF. Não foi observada correlação entre os sintomas e sinais clínicos de OS, nem entre a intensidade do OS e os parâmetros de atividade inflamatória da EA.

Figura 5 - Análise prospectiva do teste de Schirmer nos pacientes com Espondilite Anquilosante. $p < 0,05$ entre pré-tratamento e 3 meses (3M)

Figura 6 - Análise prospectiva da citologia de impressão nos pacientes com Espondilite Anquilosante- classificação de Nelson. $p < 0,05$ entre pré-tratamento e 12 meses (12M)

4.2 ARTRITE REUMATOIDE

A idade dos pacientes com AR foi comparável ao do grupo controle (51,0 versus 52,0 anos, $p=0,7$), assim como a frequência do sexo feminino (95,0 versus 95,8%, $p=1,0$) (Tabela 4). O tempo de duração da doença foi de $16,8 \pm 11,1$ anos.

No total, 20 pacientes foram avaliados para OS e comparados com 24 voluntários do grupo controle como segue: 9 (45%) pacientes e 2 (8,3%) controles ($p=0,4$) apresentaram resultado do teste de Schirmer ≤ 10 mm e apenas 4 (20%) pacientes tiveram um resultado do teste de Schirmer mais baixo (≤ 5 mm) versus 0 do grupo controle, com mediana de 12,5 (0-20) mm no grupo dos pacientes versus 29,5 (8-35) mm no grupo controle ($p < 0,001$) (Tabela 4). O teste do TRFL estava alterado (≤ 10 segundos) em 16 (80%) pacientes versus 19 (79,1%) controles ($p=0,1$) e 5 (25%) pacientes versus 3 (12,5%) controles ($p=0,8$) apresentaram TRFL ≤ 5 segundos, com mediana de 7,5 (2-15) segundos no grupo dos pacientes versus 8,0 (3-16) segundos nos controles ($p=0,5$). O escore do tingimento com fluoresceína foi 0 (0-4) nos pacientes versus 0 (0-1) nos voluntários ($p=0,8$) sendo escore 2/9 em 2 (10,0%) pacientes e escore 4/9 em 1 (5,0 %) paciente. A mediana do escore do tingimento com lissamina verde foi de 0 (0-6) nos pacientes versus 0 (0-1) nos controles ($p=0,01$) sendo escore 1/9 em 1 (5%) paciente, escore 2/9 em 4 (20%) pacientes e escore 6/9 em 1 (5%) paciente. A disfunção das glândulas de meibômio estava presente em 11 pacientes e em 2 voluntários (55% versus 8,3% $p=0.001$). A média do escore do OSDI foi de $24,0 \pm 17,6$

nos pacientes e de $7,5 \pm 14,3$ nos voluntários ($p=0,001$) resultando em uma intensidade moderada dos sintomas de OS no primeiro grupo.

A comparação dos parâmetros oftalmológicos demonstrou maior frequência (75% versus 4%, $p < 0.001$) e intensidade leve a moderada de OS ($p<0,001$), assim como maior escore de alteração da CI [1 (0-2) versus 0 (0-1), $p<0.001$] e menor densidade de células caliciformes [332 (209-856) versus 742 (376-2209) células/mm², $p<0,001$] nos pacientes com AR em relação aos voluntários sadios (Tabela 4). A CI estava alterada em 15 (75%) pacientes: 12 (60%) deles apresentaram grau 1 e 3 (15%) pacientes, grau 2; o grupo controle apresentou CI alterada em 8,3% dos casos ($p<0,001$). Ademais, as provas de atividade inflamatória, VHS e PCR, estavam elevadas nos pacientes com AR (respectivamente, $p=0,006$ e $p=0,002$) quando comparados ao grupo controle.

Tabela 4 - Dados demográficos, superfície ocular e parâmetros inflamatórios dos pacientes com Artrite Reumatoide e grupo controle

	AR (n=20)	Controle (n=24)	p
Dados demográficos			
Idade (anos)	51,0 (24-73)	52,0 (27-69)	0,7
Sexo feminino (%)	95,0	95,8	0,9
Parâmetros da superfície ocular			
Schirmer (mm/5min)	12,5 (0-20)	29,5 (8-35)	<0,001
TRFL (segundos)	7,5 (2-15)	8 (3-16)	0,5
Fluoresceína (escore)	0 (0-4)	0 (0-1)	0,8
Lissamina verde (escore)	0 (0-6)	0 (0-1)	0,01
OSDI (escore)	20,8 (0-53,6)	1,0 (0-62,5)	0,001
Citologia (escore)	1,0 (0-2)	0 (0-1)	<0,001
DCC (células/mm ²)	332 (209-856)	742 (376-2209)	<0,001
DGM (%)	55,0	8,3	0.001
Olho Seco (%)	75,0	4,0	<0.001
Intensidade OS (n)			
Ausente	5	23	
Leve	13	1	<0,001
Leve/moderada	1	0	
Moderada	1	0	
Parâmetros inflamatórios			
VHS (mm/1 ^a h)	29,0 (7-124)	16,0 (2-35)	0,006
PCR (mg/L)	11,2 (1,3-88,5)	3,3 (3,3-15,0)	0.002

AR: artrite reumatoide; TRFL: tempo de rompimento do filme lacrimal; OSDI: Ocular Surface Disease Index; DCC: densidade células calciformes; DGM: disfunção das glândulas de meibômio; OS: olho seco; VHS: velocidade de hemossedimentação; PCR: proteína C-reativa; p<0,05

Concomitantemente com o recebimento da terapia anti-TNF, 12 (60%) pacientes foram tratados com prednisona 5 mg/dia, 7 (35%) pacientes com metotrexato, 9 (45%) pacientes com leflunomida, 7 (35%) pacientes com cloroquina, 1 (5%) paciente com sulfassalazina e 1 (5%) com azatioprina. Houve uma melhora significativa nos parâmetros laboratoriais da atividade inflamatória na AR quando os dados pré-tratamento foram comparados com a avaliação aos 3M e 12M (VHS, $p=0,005$ e PCR, $p=0,006$) (Tabela 5). No entanto, o escore do DAS 28 manteve-se estável durante o período do estudo ($p=0,08$). Três pacientes (15%) conseguiram remissão da atividade aos 3M mantendo este quadro aos 12M.

A média dos valores do teste de Schirmer nos pacientes recebendo a terapia anti-TNF aumentou aos 3M e 12M (pré-tratamento: 10,5 mm, 3M: 20 mm e 12M: 23 mm, $p<0,001$) (Figura 7). Não houve diferenças estatisticamente significativas nos valores do TRFL, nos escores dos tingimentos com fluoresceína e lissamina verde (Tabela 5). A avaliação dos sintomas obtidos pelo escore do OSDI apresentou uma tendência de melhora ($p=0,6$). A graduação da CI retornou ao escore normal quando foram comparados os valores pré-tratamento com 3M e 12M (pré-tratamento: $1,0 \pm 0,6$, 3M: $0,8 \pm 0,6$ e 12 M: $0,5 \pm 0,5$, $p=0,005$) (Figura 8). Em relação à densidade das células, observou-se um aumento gradativo aos 3M e 12M (pré-tratamento: $429,0 \pm 211,7$ caliciformes/mm², 3M: $908,0 \pm 291,4$ caliciformes/mm² e 12M: $1265,4 \pm 430$ caliciformes/mm², $p<0,001$) (Figura 9). Não foi observada correlação entre os sintomas e sinais clínicos de OS nem com escore da citologia e densidade das células caliciformes com atividade doença e marcadores da inflamação.

Tabela 5 - Análise prospectiva dos pacientes com Artrite Reumatoide pré e pós-terapia anti-TNF (n=20)

	Pré	3M	12M	p
Parâmetros oculares				
Schirmer (mm/5min)	10,5 (0-20)	20 (3-35)	23 (3-35)	<0,001^{*,†}
TRFL (segundos)	7,5 (2-15)	8,5 (3-16)	8,0 (2-13)	0,5
Fluoresceína (escore)	0 (0-4)	0 (0-3)	0 (0-4)	0,7
Lissamina verde (escore)	0 (0-6)	0 (0-7)	0 (0-7)	0,2
Citologia (escore)	1,0 (0-2)	1,0 (0-2)	0 (0-1)	0,005^{*,†}
DCC (células/mm ²)	339 (209-856)	814 (503-1637)	1244 (656-1974)	<0,001^{*,†}
OSDI (escore)	20,8 (0-53,6)	17,5 (0-55,6)	10,7 (0-53,6)	0,6
Parâmetros atividade doença				
DAS-28 (escore)	4,9 (3,0-7,3)	4,1 (1,2-8,4)	3,8 (0-7,8)	0,08
HAQ (escore)	1,2 (0,4-2,2)	0,7 (0,4-2,0)	0,7 (0,2-2,6)	0,1
VHS (mm/1 ^a h)	28 (7-124)	20 (2-74)	17 (3-112)	0,005^{*,†}
PCR (mg/L)	10 (1,3-88,5)	4,3 (0,3-31,0)	3,3 (0,6—17,7)	0,006^{*,†}

3M: 3 meses; 12M: 12 meses; TRFL: tempo de rompimento do filme lacrimal; DCC: densidade de células caliciformes; OSDI: *Ocular Surface Disease Index*; DAS: *Disease Activity Score*; HAQ: *Health Assessment Questionnaire*; VHS: velocidade de hemossedimentação; PCR: proteína C-reativa; * p<0,05 entre pré vs 3M; +p<0,05 entre pré vs 12M; † p<0,05 entre 3M e 12M.

Figura 7 - Análise prospectiva do teste de Schirmer nos pacientes com Artrite Reumatoide. p <0,05 entre pré-tratamento e 3 meses (3M) e pré-tratamento e 12 meses (12M)

Figura 8 - Análise prospectiva da citologia de impressão nos pacientes com Artrite Reumatoide. $p < 0,05$ entre pré-tratamento e 3 meses (3M), pré-tratamento e 12 meses (12M) e entre 3M e 12 M

Figura 9 - Análise prospectiva da densidade de células calciformes nos pacientes com Artrite Reumatoide. $p < 0,05$ entre pré-tratamento e 3 meses (3M), pré-tratamento e 12 meses (12M) e entre 3M e 12 M

5 DISCUSSÃO

5 DISCUSSÃO

5.1 ESPONDILITE ANQUILOSANTE

O presente estudo demonstrou uma frequência elevada de olho seco com componente evaporativo de intensidade leve a moderada nos pacientes com EA. A avaliação de longo prazo das alterações da superfície ocular nesses pacientes revelou uma melhora nos valores do teste de Schirmer e da citologia de impressão conjuntival após o início da terapia anti-TNF.

Foram utilizados critérios clínicos sistemáticos e validados de OS: essas avaliações foram consideradas vantajosas numa revisão sistemática⁴⁶ e recomendadas pelo *The ODISSEY European Consensus Group* como critérios determinantes⁴⁷. Foram excluídos fatores que são fortemente associados ao OS como o uso de drogas anti-histamínicas, antidepressivos tricíclicos, anti-hipertensivos e benzodiazepínicos; idade avançada e distribuição de gênero mais homogênea, uma vez que o desequilíbrio hormonal afeta a produção e qualidade lacrimal⁴⁸⁻⁵³. Portanto, diante da exclusão desses fatores, a EA pode ter um papel no desenvolvimento do OS, sendo a superfície ocular e glândula lacrimal principal órgãos alvo no processo autoimune na EA.

A maioria dos pacientes com EA não manifestou sintomas de OS e a média do escore do OSDI pode ser classificada de intensidade normal. A falta de correlação entre os sinais e sintomas no OS pode estar relacionada

pela presença de OS leve^{8,54} e pelo tempo de duração da doença mais prolongado associado à inflamação crônica que levaria a sensibilidade corneana reduzida causada pelos efeitos dos mediadores inflamatórios nos terminais nervosos sensoriais periféricos que suprem a superfície corneana, pelas alterações morfológicas nos plexos nervosos sub-basais e pela diminuição da atividade reflexa, incluindo lacrimejamento reflexo e piscar⁵⁵.

Gunes et al.⁵⁶ analisaram a espessura corneana central pelo método de imagem de Scheimpflug e testes de olho seco em 57 pacientes com EA e relacionaram a redução da espessura corneana central encontrada devido à disfunção lacrimal, sintomas de OS aumentados e PCR elevada. Ortak et al.⁵⁷ estudaram a espessura corneana em 68 pacientes com EA por paquimetria ultrassônica e obtiveram como resultados córnea central mais fina e teste de Schirmer e TRFL diminuídos. Com esses dados sugeriram precaução em possíveis intervenções cirúrgicas como ceratectomia fotorrefrativa e ceratomileusis *in situ* assistida a laser nesse grupo de pacientes. Apesar dos dados de disfunção lacrimal presentes nesses trabalhos, não foram realizadas avaliações da intensidade do OS.

Mais da metade dos pacientes com EA apresentou CI alterada e esse achado indica que as camadas epiteliais da superfície ocular foram afetadas por inflamação crônica levando à uma redução das células caliciformes. O valor significativamente elevado dos parâmetros inflamatórios (VHS e PCR) dos pacientes com EA comparados com o grupo controle reforça o papel da inflamação nesse processo. De fato, Marsofsky et al.⁵⁸ acharam uma associação entre valores diminuídos do teste de Schirmer com alteração da

morfologia das células de Langerhans corneanas centrais nos pacientes com EA ativa o que suporta a hipótese de disfunção imunorreguladora. Um aumento na expressão das moléculas de adesão e citocinas inflamatórias do epitélio da superfície ocular, além do aumento na concentração das citocinas na lágrima foi demonstrado no OS, evidenciando a importância da inflamação na patogênese dessa condição⁵⁹.

O OS mais intenso pode necessitar de terapia imunossupressora sistêmica para inibir a inflamação da superfície ocular e possíveis complicações que ameacem a integridade estrutural do globo ocular. Há apenas relatos de casos de terapia anti-TNF para o tratamento de OS e o algoritmo do *Dry Eye Workshop* (DEWS) incluiu recentemente essa classe de medicação como opção terapêutica^{60,61}.

A avaliação prolongada dos pacientes com EA tratados com drogas anti-TNF demonstrou que os parâmetros clínicos e laboratoriais da doença melhoraram concomitantemente com a produção aquosa lacrimal e a CI conjuntival. O aumento da produção aquosa da lágrima observado nesses pacientes indica que as drogas anti-TNF- α podem interferir com o metabolismo da superfície ocular e restaurar as células glandulares acinares afetadas pelas citocinas pró-inflamatórias. Trousdale et al.⁶² estudaram a expressão do gene inibidor de TNF em coelhos e observaram recuperação da produção lacrimal e estabilidade da lágrima. Li et al.⁶³ investigaram a eficácia de infliximabe tópico num modelo experimental em ratos e concluíram que a aplicação tópica a 0,01% e a 0,1% podia melhorar a produção lacrimal e a irregularidade da superfície ocular, diminuir as

citocinas e células inflamatórias na superfície ocular e aumentar a densidade de células caliciformes conjuntivais. Ji et al.⁶⁴ avaliaram a ação tópica de etanercepte e HL036 em camundongos obtendo supressão da inflamação da glândula lacrimal e da córnea pela supressão de IFN- γ , IL-21 e IL-6. A melhora da inflamação sistêmica constatada nos pacientes com EA proporcionou recuperação das células caliciformes comprovada pela citologia de impressão conjuntival. Não foi observado maior escore do tingimento da superfície ocular nos pacientes com EA nem diminuição do tingimento acompanhando a melhora da recuperação citológica com o tratamento provavelmente pelo fato das alterações citológicas e da intensidade do OS serem de grau leve⁶⁵. O estudo que mostra a correlação entre escore de tingimento com corante de Rosa de Bengala e densidade das células caliciformes conjuntivais diminuída foi positivo no subgrupo dos pacientes com SS e OS com deficiência aquosa, nos outros subgrupos de pacientes avaliados (OS com deficiência aquosa sem SS, disfunção das glândulas de meibômio inflamatória e atrófica) não houve essa correlação⁶⁶. Além disso, na SS primária, os achados de OS são mais intensos que os achados na SS secundária⁵⁴. As alterações oculares presentes no início do tratamento acompanharam a melhora da atividade da doença e a capacidade funcional dos pacientes com EA. Embora o quadro ocular do OS nesses pacientes fosse, na maioria dos casos de grau leve, essa condição não pode ser negligenciada uma vez que pode induzir a uma incapacidade crônica levando a piora da qualidade de vida com impacto comparável aos pacientes com quadro de hemodiálise hospitalar e angina grave⁶⁷.

Observamos que o OS tem frequência elevada nos pacientes com EA, sendo na maioria dos casos subdiagnosticado. A melhora dos parâmetros dessa condição nos pacientes que receberam terapia anti-TNF sugere que a superfície ocular seja um alvo adicional da inflamação sistêmica nessa doença.

5.2 ARTRITE REUMATOIDE

O presente estudo revelou uma frequência elevada de OS nos pacientes com AR associado a sintomas moderados, além de alterações citológicas conjuntivais. A avaliação longitudinal demonstrou melhora da produção aquosa do filme lacrimal assim como a recuperação das células caliciformes conjuntivais concomitante com os parâmetros laboratoriais inflamatórios na vigência da terapia com drogas anti-TNF.

Nesse estudo a grande maioria dos pacientes apresentou olho seco com intensidade leve. Além do componente de deficiência aquosa do filme lacrimal, mais comumente relacionado ao OS na AR, foi observado um componente evaporativo com a presença da DGM e deficiência de células caliciformes. Essas duas categorias de OS podem ocorrer na SS e frequentemente coexistir no mesmo indivíduo^{68,69}. Os sintomas reportados pelo escore do questionário OSDI foram graduados como moderados. A falta de correlação entre os sinais e sintomas dos pacientes estudados pode ser explicada pela presença de OS leve⁶⁵. A aplicação do sistema de

graduação da intensidade do OS, que inclui sintomas e sinais objetivos, aumentou a frequência do diagnóstico se comparado apenas aos testes de Schirmer ou tingimento conjuntival com corantes vitais (rosa de Bengala ou lissamina verde)⁷⁰. Esse sistema resultou numa melhor acurácia diagnóstica, incluindo as diferentes intensidades de OS e detecção precoce do quadro, além de auxiliar na estratégia terapêutica a ser estabelecida em cada caso⁶⁸.

Os pacientes com AR apresentaram provas inflamatórias mais elevadas que, do ponto de vista da superfície ocular, foram representadas pela citologia conjuntival alterada e menor densidade de células caliciformes⁷¹. As células caliciformes conjuntivais secretoras de mucina Muc5AC são a primeira linha de defesa contra patógenos e alérgenos externos, eliminando várias potenciais ameaças⁷². Recentemente uma nova função para as células caliciformes foi demonstrada: células apresentadoras de antígenos agindo como imunomoduladoras das células dendríticas dentro do estroma corneano⁷¹. Quadros crônicos de inflamação da superfície ocular estão associados a perda das células caliciformes conjuntivais que participam na manutenção da homeostase da superfície ocular. As células caliciformes são alvo da regulação por mediadores inflamatórios produzidos por células imunes locais inatas e adaptativas²⁵. Esses mediadores alteram a proliferação dessas células, sua secreção e sobrevivência principalmente no decorrer de doenças inflamatórias crônicas da superfície ocular²⁷.

Um estudo avaliando a morfologia das células corneanas e dados de OS em pacientes com AR mostrou que não houve diferença dos valores obtidos entre pacientes com SS e sem SS⁷³. Marsovszky et al.⁷⁴ observaram

que as células corneanas de Langerhans, responsáveis pelos processos imunes corneanos, estavam aumentadas nos pacientes com AR. Esse achado sugeriu um processo inflamatório ativo na córnea, reflexo do elevado estado de ativação da imunidade inata, embora essas células não estivessem afetadas pela atividade da doença. O estudo de Villani et al.⁷⁵ mostrou que o tratamento sistêmico com prednisona e metotrexato levou a melhora da atividade da doença assim como dos níveis de IL1 α , IL6, IL8 e TNF do filme lacrimal, dos testes diagnósticos de olho seco e da densidade das células dendríticas corneanas dos pacientes com AR e SS secundária mas não melhorou estes mesmos parâmetros nos pacientes com AR sem SS secundária, sugerindo que o acometimento da superfície ocular seja diferente nos pacientes com e sem SS. O tratamento sistêmico, ao melhorar os efeitos locais da AR, sugere que existam mediadores inflamatórios comuns na AR ocular e sistêmica⁷⁶. O mediador inflamatório TNF está elevado nas articulações e lágrima dos pacientes com AR e a melhora das condições oculares que ameaçam a integridade da superfície ocular com o tratamento sistêmico com drogas anti-TNF foi demonstrada em alguns estudos^{60,76}. Neste trabalho houve uma melhora da produção aquosa da lágrima e da densidade das células calciformes conjuntivais concomitantemente com os níveis dos indicadores laboratoriais da atividade inflamatória na vigência do tratamento sistêmico com terapia anti-TNF. O escore de atividade da doença (DAS 28) não acompanhou essa melhora, mantendo-se nos níveis de atividade moderada. No entanto, os pacientes que conseguiram atingir a remissão aos 3M mantiveram-se estáveis aos

12M. Esses valores são semelhantes a estudos que observaram remissão da atividade da doença em 16% dos pacientes com AR^{77,78}. Fujita et al.⁷⁹ observaram correlação entre OS e atividade da doença em pacientes com AR, mas utilizaram outra classificação de OS e o índice de Lansbury para avaliar atividade da AR. O questionário dos sintomas de OS apresentou melhora na avaliação longitudinal com escore inicial de intensidade moderada chegando próximo dos valores considerados normais aos 12M. Esse resultado mostra uma recuperação na qualidade de vida causado pelo impacto negativo do OS no dia-a-dia dos pacientes⁸⁰.

Recentemente, um consenso europeu (*The ODISSEY European Consensus Group*) incluiu a contagem das células caliciformes como um marcador objetivo para o diagnóstico de OS⁴⁷. A anormalidade funcional ou a redução no número das células caliciformes tem impacto negativo na visão e saúde ocular devido ao aumento da permeabilidade corneana, inflamação, alteração do volume e composição lacrimal e por alterações moleculares na expressão de mucina⁷². O aumento da densidade das células caliciformes conjuntivais durante o tratamento sistêmico com drogas anti-TNF evidenciou a melhora da inflamação na superfície ocular. Apesar desse aumento, não foi observada melhora do TRFL: as células caliciformes são responsáveis pela secreção da mucina Muc5AC, que é um dos componentes da lágrima, além das fases aquosa, lipídica e de glicocálice⁷². No trabalho de Moore et al. também não foi observada correlação entre o número de células caliciformes ou função com TRFL⁸¹.

Os conhecimentos adquiridos nos estudos imunológicos do OS podem auxiliar no direcionamento mais específico e seletivo do tratamento da inflamação da superfície ocular. As estratégias terapêuticas sistêmicas da AR podem ter papel essencial no tratamento das condições oculares associadas a AR quando os mecanismos dessas condições são justapostos.

6 CONCLUSÕES

6 CONCLUSÕES

1. Os pacientes com EA e AR avaliados nesse estudo apresentaram prevalência elevada de olho seco de intensidade leve e moderada associada a alteração da citologia conjuntival.
2. O quadro de olho seco apresentado pelos pacientes com EA e AR mostra a presença dos componentes de deficiência aquosa e evaporativo representados respectivamente pelo acometimento da função das glândulas lacrimais e alterações relacionadas às pálpebras (DGM) e superfície ocular (células caliciformes produtoras de Muc5AC).
3. O tratamento sistêmico com terapia anti-TNF nesses pacientes diminuiu os valores das provas de atividade inflamatórias sistêmicas (VHS e PCR) levando, paralelamente, a uma melhora na produção aquosa do filme lacrimal e na citologia conjuntival, em especial, das células caliciformes. Este resultado histológico pode ter influência como biomarcador da inflamação na superfície ocular.

ANEXOS

ANEXO 1. Aprovação da Comissão de Ética do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

Hospital das Clínicas da FMUSP
Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa - CAPPesq

PROJETO DE PESQUISA

Título: AVALIAÇÃO DOS PARÂMETROS CLÍNICOS DA SUPERFÍCIE OCULAR E DA CITOLOGIA DE IMPRESSÃO CONJUNTIVAL NOS PACIENTES COM OLHO SECO ASSOCIADO A DOENÇA REUMATOLÓGICA SUBMETIDOS A TRATAMENTO SISTÊMICO COM MEDICAÇÕES IMUNOBIOLOGICAS.
Pesquisador Responsável: PROF.DR. MILTON RUIZ ALVES **Versão:** 1
Pesquisador Executante: FANY SOLANGE USUBA **CAAE:** 37166914.8.0000.0068
Coautores: Dra. Ruth Miyuki Santo, Dra. Priscila Novaes, Prof. Dra. Eloisa Bonfá
Finalidade Acadêmica: Doutorado
Orientador: Prof. Dr. Milton Ruiz Alves
Instituição: HCFMUSP
Departamento: OFTALMOLOGIA E OTORRINOLARINGOLOGIA

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

Registro on-line: 12874

Número do Parecer: 835.803

Data da Relatoria: 15/10/2014

Apresentação do Projeto: Estudo transversal em que serão avaliados 30 pacientes com olho seco associado à doença reumatológica sistêmica (artrite reumatóide e espondilite anquilosante) em seguimento no ambulatório da Divisão de Reumatologia do HCFMUSP e no ambulatório de córnea e doenças externas do Departamento de Oftalmologia do HCFMUSP. Os pacientes serão submetidos ao tratamento sistêmico com medicações com agentes imunobiológicos. Todos os exames oculares analisados fazem parte da rotina oftalmológica.

Objetivo da Pesquisa: Avaliar se o tratamento sistêmico com medicações imunobiológicas causa uma melhora da inflamação sistêmica e atividade da doença, ele pode promover a melhora dos parâmetros clínicos oculares e também da citologia das células da superfície ocular nos quadro de olho seco. Uma vez que este tipo de tratamento atinge um alvo mais específico que tem participação na fisiopatogenia do OS, ele poderia ser mais uma opção terapêutica aos pacientes que apresentam um processo inflamatório da superfície ocular mais grave ou crônico. Avaliar a mudança dos resultados clínicos comparando pré e pós-tratamento: 1) teste de Schirmer, 2) tempo de ruptura do filme lacrimal, 3) tingimento da

Hospital das Clínicas da FMUSP
Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa - CAPPesq

conjuntiva bulbar e córnea. Avaliar a mudança no padrão de alteração citológica conjuntival e do questionário para OS pré e pós tratamento.

Avaliação dos Riscos e Benefícios: Riscos mínimos.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa: O tema é pertinente, a metodologia está adequada, o TCLE está claro.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória: Adequados.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações: Sem pendências.

Situação do Parecer: Aprovado.

Necessita Apreciação da CONEP: Não.

Considerações Finais a critério do CEP: Em conformidade com a Resolução CNS nº 466/12 – cabe ao pesquisador: a) desenvolver o projeto conforme delineado; b) elaborar e apresentar relatórios parciais e final; c) apresentar dados solicitados pelo CEP, a qualquer momento; d) manter em arquivo sob sua guarda, por 5 anos da pesquisa, contendo fichas individuais e todos os demais documentos recomendados pelo CEP; e) encaminhar os resultados para publicação, com os devidos créditos aos pesquisadores associados e ao pessoal técnico participante do projeto; f) justificar perante o CEP interrupção do projeto ou a não publicação dos resultados.

São Paulo, 15 de Outubro de 2014

Prof. Dr. Alfredo José Mansur
Coordenador
Comissão de Ética para Análise
de Projetos de Pesquisa - CAPPesq

ANEXO 2. Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO-HCFMUSP

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO SUJEITO DA PESQUISA OU RESPONSÁVEL LEGAL

1. NOME:
DOCUMENTO DE IDENTIDADE No: SEXO: ☐ M ☐ F ☐
DATA NASCIMENTO:/...../.....
ENDEREÇO No: APTO:
BAIRRO: CIDADE
CEP: TELEFONE: DDD (.....)
2. RESPONSÁVEL LEGAL
NATUREZA (grau de parentesco, tutor, curador etc.)
DOCUMENTO DE IDENTIDADE: SEXO: ☐ M ☐ F ☐
DATA NASCIMENTO:/...../.....
ENDEREÇO: No APTO:
BAIRRO: CIDADE:
CEP: TELEFONE: DDD (.....)

DADOS SOBRE A PESQUISA

1. TÍTULO DO PROTOCOLO DE PESQUISA: "Avaliação dos parâmetros clínicos da superfície ocular e citologia de impressão conjuntival nos pacientes em tratamento sistêmico com medicações imunobiológicas"

PESQUISADOR RESPONSÁVEL: Prof. Dr. Milton Ruiz Alves

CARGO/FUNÇÃO: Prof. Adjunto da Divisão de Clínica Oftalmológica da FMUSP e da Divisão de Clínica Oftalmológica da FMUSP

INSCRIÇÃO CONSELHO REGIONAL No
UNIDADE DO HCFMUSP: Divisão de Clínica Oftalmológica do HCFMUSP

PESQUISADOR EXECUTANTE: Fany Solange Usuba

3. AVALIAÇÃO DO RISCO DA PESQUISA:

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

4. DURAÇÃO DA PESQUISA: 24 meses

HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO-HCFMUSP**1. Justificativa e os objetivos da pesquisa:**

O senhor (a) está sendo convidado a participar de uma pesquisa para avaliar as alterações oculares relacionadas ao tratamento com medicação sistêmica imunobiológica (infiximabe, adalimumabe, etanercept ou rituximabe). Leia cuidadosamente este termo de consentimento livre e esclarecido e faça todas as perguntas que quiser antes de decidir se quer participar do estudo. Sua decisão de consentir em participar deste estudo é voluntária e o sr(a) pode sair do estudo a qualquer momento. Se decidir não participar ou retirar-se do estudo, o sr(a) não perderá os benefícios a que teria direito. O objetivo desta pesquisa é investigar as alterações que possam ocorrer na superfície dos olhos e na lágrima por causa da sua doença reumatológica e quais mudanças podem ocorrer com o tratamento. Serão pesquisadas a presença de inflamação e outras alterações na parte externa dos olhos.

2. Procedimentos que serão utilizados e propósitos, incluindo a identificação dos procedimentos que serão aplicados:

O senhor (a) irá responder a um questionário sobre os sinais e sintomas de olho seco e o quanto isto pode afetar a realização das suas atividades diárias. Estes dados serão utilizados somente para fins científicos. Os exames a serem realizados são testes clínicos e laboratoriais que são comuns na prática oftalmológica: **1)** Teste de Schirmer: para avaliar a quantidade de lágrima produzida pelo olho, são duas fitinhas que são colocadas na parte lateral da pálpebra inferior por 5 min; **2)** Biomicroscopia: que é o exame com um microscópio especial que se chama lâmpada de fenda. É o exame da parte da frente dos olhos (pálpebras, córnea, conjuntiva e cristalino); **3)** Coloração com Fluoresceína e Verde de Lissamina: dois colírios com corante especial para detectar áreas com células em sofrimento ou áreas que tenha sofrido dano epitelial por alterações da lágrima. É também realizado na lâmpada de fenda; **4)** Tempo de Ruptura do Filme Lacrimal: avalia se a lágrima está se espalhando normalmente na superfície do olho ou não; **5)** Citologia de impressão: exame para saber se existe alteração das camadas mais superficiais da membrana que recobre a parte branca dos olhos, que se chama conjuntiva. Isto é feito encostando um pequeno pedacinho de papel na parte branca dos olhos por alguns segundos, depois que foi feita a anestesia do olho com colírio próprio.

3. Procedimentos rotineiros

Coleta de sangue por punção periférica da veia do antebraço para avaliação dos exames de atividade da doença (velocidade de hemossedimentação e proteína C reativa)

4. Há desconfortos e riscos esperados:

Não existem riscos esperados neste estudo. Todos os exames a serem realizados já fazem parte da prática oftalmológica internacional.

Alguns exames envolvem o toque de pequenos pedaços de papel especial nos olhos, e pode ser esperado algum desconforto, sensação de irritação ou de areia nos olhos, vermelhidão e lacrimejamento. Para minimizar esse inconveniente os procedimentos serão padronizados. Os colírios a serem utilizados podem causar ardor passageiro nos olhos.

5. Benefícios que poderão ser obtidos:

Não há benefício direto ou compensação financeira aos participantes do estudo. Esse estudo poderá ajudar na detecção de alterações relacionadas às doenças reumatológicas. Isso pode ajudar no entendimento da doença e no desenvolvimento de futuros tratamentos.

6. Procedimentos alternativos que possam ser vantajosos para o senhor (a): não haverá procedimento alternativo.

7. Garantia de acesso: em qualquer etapa do estudo, o sr(a) terá acesso aos profissionais responsáveis pela pesquisa para esclarecimento de eventuais dúvidas. O principal investigador é o Dr. **Milton Ruiz Alves** que pode ser encontrado no endereço **Prédio dos Ambulatórios, 6º Andar Bloco 6** Telefone (s): **2661-6213**. Se o sr (a) tiver alguma consideração ou dúvida sobre a ética da pesquisa, entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) – Rua Ovídio Pires de Campos, 225 – 5o

andar – tel: 2661-6442 ramais 16, 17, 18 FAX: 2661-6442 ramal 26 – e-mail: cappesq.adm@hc.fm.usp.br.

8. O sr(a) tem garantida a liberdade da retirada do consentimento a qualquer momento e deixar de participar do estudo, sem qualquer prejuízo à continuidade de seu tratamento na Instituição.

9. **Direito de confidencialidade** – As informações obtidas serão analisadas em conjunto com as informações de outros pacientes, não sendo divulgado a identificação de nenhum paciente;

10. O sr(a) tem o direito de ser mantido(a) atualizado(a) sobre os resultados parciais das pesquisas, quando em estudos abertos, ou de resultados que sejam do conhecimento dos pesquisadores;

11. Os dados e o material coletado serão utilizados somente para esta pesquisa.

12. O sr(a) não terá despesas pessoais em qualquer fase do estudo, incluindo exames e consultas. Também não há compensação financeira relacionada à sua participação. Se existir qualquer despesa adicional, ela será absorvida pelo orçamento da pesquisa.

HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO-HCFMUSP

Acredito ter sido suficientemente informado a respeito das informações que li ou que foram lidas para mim, descrevendo o estudo "**Avaliação dos parâmetros clínicos da superfície ocular e citologia de impressão conjuntival nos pacientes em tratamento sistêmico com medicações imunobiológicas**".

Eu discuti com a **Dra. Fany Solange Usuba** sobre a minha decisão em participar nesse estudo. Ficaram claros para mim quais são os propósitos do estudo, os procedimentos a serem realizados, seus desconfortos e riscos, as garantias de confidencialidade e de esclarecimentos permanentes. Ficou claro também que minha participação é isenta de despesas e que tenho garantia do acesso a tratamento hospitalar quando necessário. Concordo voluntariamente em participar deste estudo e poderei retirar o meu consentimento a qualquer momento, antes ou durante o mesmo, sem penalidades ou prejuízo ou perda de qualquer benefício que eu possa ter adquirido, ou no meu atendimento neste Serviço.

Assinatura do paciente/representante legal Data / /

Assinatura da testemunha Data / /

Para casos de pacientes menores de 18 anos, analfabetos, semi-analfabetos ou portadores de deficiência auditiva ou visual.

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

Assinatura do responsável pelo estudo Data / /

8 REFERÊNCIAS

8 REFERÊNCIAS

1. Andonopoulos AP, Drosos AA, Skopouli FN, Acritidis NC, Moutsopoulos HM. Secondary Sjögren's syndrome in rheumatoid arthritis. *J Rheumatol*. 1987;14(6):1098-103.
2. Soo MPK, Chow SK, Tan CT, Nadior N, Yeap SS, Hoh HB. The spectrum of ocular involvement in patients with systemic lupus erythematosus without ocular symptoms. *Lupus*. 2000;9(7):511-4.
3. Usuba FS, Lopes JB, Fuller R, Yamamoto JH, Alves MR, Pasoto SG, Caleiro MT. Sjögren's syndrome: An underdiagnosed condition in mixed connective tissue disease. *Clinics (Sao Paulo)*. 2014;69(3):158-62.
4. Kobak S, Kobak AC, Kabasakal Y, Doganavsargil E. Sjögren's syndrome in patients with ankylosing spondylitis. *Clin Rheumatol*. 2007;26(2):173-5.
5. Fox RI. Sjögren's syndrome. *Lancet*. 2005;366(9482):321-31.
6. Bron AJ, de Paiva CS, Chauhan SK, Bonini S, Gabison EE, Jain S, Knop E, Markoulli M, Ogawa Y, Perez V, Uchino Y, Yokoi N, Zoukhri D, Sullivan DA. TFOS DEWS II pathophysiology report. *Ocul Surf*. 2017;15(3):438-510.
7. Craig JP, Nichols KK, Akpek EK, Caffery B, Dua HS, Joo CK, Liu Z, Nelson JD, Nichols JJ, Tsubota K, Stapleton F. TFOS DEWS II Definition and Classification Report. *Ocul Surf*. 2017;15(3):276-83.

8. Begley CG, Chalmers RL, Abetz L, Venkataraman K, Mertzanis P, Caffery BA, Snyder C, Edrington T, Nelson D, Simpson T. The relationship between habitual patient-reported symptoms and clinical signs among patients with dry eye of varying severity. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2003;44(11):4753-61.
9. Adatia FA, Michaeli-Cohen A, Naor J, Caffery B, Bookman A, Slomovic A. Correlation between corneal sensitivity, subjective dry eye symptoms and corneal staining in Sjögren's syndrome. *Can J Ophthalmol*. 2004;39(7):767-71.
10. Vitali S, Goodman LA, Reed GF, Smith JA. Comparison of the NEI-VFQ and OSDI questionnaires in patients with Sjögren's syndrome-related dry eye. *Health Qual Life Outcomes*. 2004; 2:44.
11. Rieger G. The importance of the precorneal tear film for the quality of optical imaging. *Br J Ophthalmol*. 1992;76(3):157-8.
12. Liu Z, Pflugfelder SC. Corneal surface irregularity and the effect of artificial tears in aqueous tear deficiency. *Ophthalmology*. 1999;106(5):936-43.
13. Goto E, Yagi Y, Matsumoto Y, Tsubota K. Impaired functional visual acuity of dry eye patients. *Am J Ophthalmol*. 2002;133(2):181-6.
14. Uchino M, Schaumberg D. Dry eye disease: impact on quality of life and vision. *Curr Ophthalmol Rep*. 2013;1(2):51-7.
15. Farris RL, Stuchell RN, Mandel ID. Tear osmolarity variation in the dry eye. *Trans Am Ophthalmol Soc*. 1986;84:250-68.
16. Gilbard JP. Human tear film electrolyte concentrations in health and dry-eye disease. *Int Ophthalmol Clin*. 1994;34(1):27-36.

17. Murube J. Tear osmolarity. *Ocul Surf.* 2006;4(2):62-73.
18. Tomlinson A, Khanal S, Ramaesh K, Diaper C, McFadyen A. Tear film osmolarity: determination of a referent for dry eye diagnosis. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2006;47(10):4309-15.
19. Pflugfelder SC, Jones D, Ji Z, Afonso A, Monroy D. Altered cytokine balance in the tear fluid and conjunctiva of patients with Sjögren's syndrome keratoconjunctivitis sicca. *Curr Eye Res.* 1999;19(3):201-11.
20. Zoukhri D. Effect of inflammation on lacrimal gland function. *Exp Eye Res.* 2006;82(5):885-98.
21. Lam H, Bleiden L, de Paiva CS, Farley W, Stern ME, Pflugfelder SC. Tear cytokine profiles in dysfunctional tear syndrome. *Am J Ophthalmol.* 2009;147(2):198-205.
22. Kaufman HE. The practical detection of MMP-9 diagnoses ocular surface disease and may help prevent its complication. *Cornea.* 2013;32(2):211-6.
23. Stevenson W, Chauhan SK, Dana R. Dry eye disease: an immune-mediated ocular surface disorder. *Arch Ophthalmol.* 2012;130(1):90-100.
24. Liu KC, Huynh K, Grubbs J Jr, Davis RM. Autoimmunity in the pathogenesis and treatment of keratoconjunctivitis sicca. *Curr Allergy Asthma Rep.* 2014;14(1):403.
25. Dartt DA, Masli S. Conjunctival epithelial and goblet cell function in chronic inflammation and ocular allergic inflammation. *Curr Opin Allergy Clin Immunol.* 2014;14(5):464-70.
26. Nelson JD. Impression cytology. *Cornea.* 1988;7(1):71-81.

27. Contreras-Ruiz L, Ghosh-Mitra A, Shatos MA, Dartt DA, Masli S. Modulation of conjunctiva goblet cell function by inflammatory cytokines. *Mediators Inflamm.* 2013;2013:636812.
28. Jap A, Chee SP, Immunossuppressive therapy for ocular diseases. *Curr Opin Ophthalmol.* 2008;19(6):535-40.
29. Sahli E, Hoşal BM, Zilelioğlu G, Gülbahçe R, Ustün H. The effect of topical cyclosporine A on clinical findings and cytological grade of the disease in patients with dry eye. *Cornea.* 2010;29(12):1412-6.
30. Kraus CL, Culican SM. Use of biologic agents in ocular manifestations of rheumatic disease. *Int J Rheumatol.* 2012;2012:203819.
31. Lim L, Suhler EB, Smith JR. Biologic therapies for inflammatory eye disease. *Clin Experiment Ophthalmol.* 2006;34(4):365-74.
32. Hernandez-Illas M, Tozman E, Fulcher SF, Jundt JW, Davis J, Pflugfelder SC. Recombinant human tumor necrosis factor receptor Fc fusion protein (Etanercept): experience as a therapy for sight-threatening scleritis and sterile corneal ulceration. *Eye Contact Lens.* 2004;30(1):2-5.
33. van der Linden S, Valkenburg HA, Cats A. Evaluation of diagnostic criteria for ankylosing spondylitis. A proposal for modification of the New York criteria. *Arthritis Rheum.* 1984;27(4):361-8.
34. Aletaha D, Neogi T, Silman AJ, Funovits J, Felson DT, Bingham CO 3rd, Birnbaum NS, Burmester GR, Bykerk VP, Cohen MD, Combe B, Costenbader KH, Dougados M, Emery P, Ferraccioli G, Hazes JM, Hobbs K, Huizinga TW, Kavanaugh A, Kay J, Kvien TK, Laing T, Mease P, Ménard HA, Moreland LW, Naden RL, Pincus T, Smolen JS, Stanislawska-Biernat E, Symmons D, Tak PP, Upchurch KS, Vencovský J, Wolfe F, Hawker G. 2010 Rheumatoid arthritis classification criteria: an American College of Rheumatology/ European League Against Rheumatism collaborative initiative. *Arthritis Rheum.* 2010;62(9):2569-81.

35. van der Heijde D, Sieper J, Maksymowich WP, Dougados M, Burgos-Vargas R, Landewé R, Rudwaleit M, Braun J; Assessment of SpondyloArthritis International Society. 2010 Update of the international ASAS recommendations for the use of anti-TNF agents in patients with axial spondyloarthritis. *Ann Rheum Dis*. 2011;70(6):905-8.
36. Smolen JS, Landewé R, Breedveld FC, Dougados M, Emery P, Gaujoux-Viala C, Gorter S, Knevel R, Nam J, Schoels M, Aletaha D, Buch M, Gossec L, Huizinga T, Bijlsma JW, Burmester G, Combe B, Cutolo M, Gabay C, Gomez-Reino J, Kouloumas M, Kvien TK, Martin-Mola E, McInnes I, Pavelka K, van Riel P, Scholte M, Scott DL, Sokka T, Valesini G, van Vollenhoven R, Winthrop KL, Wong J, Zink A, van der Heijde D. EULAR recommendations for the management of rheumatoid arthritis with synthetic and biological disease-modifying antirheumatic drugs. *Ann Rheum Dis*. 2010;69(6):964-75.
37. Whitcher JP, Shiboski CH, Shiboski SC, Heidenreich AM, Kitagawa K, Zhang S, Hamann S, Larkin G, McNamara NA, Greenspan JS, Daniels TE; Sjögren's International Collaborative Clinical Alliance Research Groups. A simplified quantitative method for assessing keratoconjunctivitis sicca from the Sjögren's Syndrome International Registry. *Am J Ophthalmol*. 2010; 149(3):405-15.
38. van Bijsterveld OP. Diagnostic tests in the Sicca syndrome. *Arch Ophthalmol*. 1969;82(1):10-4.
39. Schiffman RM, Christianson MD, Jacobsen G, Hirsch JD, Reis BL. Reliability and validity of the Ocular Surface Disease Index. *Arch Ophthalmol*. 2000;118(5):615-21.

-
40. Santo RM, Ribeiro-Ferreira F, Alves MR, Epstein J, Novaes P. Enhancing the cross-cultural adaptation and validation process: linguistic and psychometric testing of the Brazilian-Portuguese version of a self-report measure for dry eye. *J Clin Epidemiol*. 2015;68(4):370-8.
41. Grubbs JR Jr, Tolleson-Rinehart S, Huynh K, Davis RM. A review of quality measures in dry eye questionnaires. *Cornea*. 2014;33(2):215-8.
42. Research in dry eye: report of the Research Subcommittee of the International Dry Eye WorkShop (DEWS). The definition and classification of dry eye disease. *Ocul Surf*. 2007;5(2):75-92.
43. Doughty MJ. A systematic assessment of goblet cell sampling of the bulbar conjunctiva by impression cytology. *Exp Eye Res*. 2015;136:16-28.
44. Torricelli AA, Matsuda M, Novaes P, Braga AL, Saldiva PH, Alves MR, Monteiro ML. Effects of ambient levels of traffic-derived air pollution on the ocular surface: analysis of symptoms, conjunctival goblet cell count and mucin 5AC gene expression. *Environ Res*. 2014; 131:59-63.
45. Fransen J, Creemers MC, Van Riel PL. Remission in rheumatoid arthritis: agreement of the disease activity score (DAS28) with the ARA preliminary remission criteria. *Rheumatology*. 2004;43(10):1252-5.
46. Alves M, Fonseca EC, Alves MF, Malki LT, Arruda GV, Reinach OS, Rocha EM. Dry eye disease treatment: a systematic review of published trials and a critical appraisal of therapeutic strategies. *Ocul Surf*. 2013; 11(3):181-92.
47. Baudoin C, Aragona P, Van Setten G, Rolando M, Irçek M, Benítez del Castillo J, Geerling G, Labetoulle M, Bonini S; ODISSEY European Consensus Group members.. Diagnosing the severity of dry eye: a clear and practical algorithm. *Br J Ophthalmol*. 2014;98(9):1168-76.

48. Fraunfelder FT, Sciubba JJ, Mathers WD. The role of medications in causing dry eye. *J Ophthalmol.* 2012; 2012:285851.
49. Gomes JAP, Azar DT, Baudoin C, Efron N, Hirayama M, Horwath-Winter J, Kim T, Mehta JS, Messmer EM, Pepose JS, Sangwan VS, Weiner AL, Wilson SE, Wolffsohn JS. TFOS DEWS II iatrogenic report. *Ocul Surf.* 2017;15(3):511-38.
50. Sullivan DA, Rocha EM, Aragona P, Clayton JA, Ding J, Golebiowski B, Hampel U, McDermott AM, Schaumberg DA, Srinivasan S, Versura P, Willcox MDP. TFOS DEWS II Sex, Gender and Hormones Report. *Ocul Surf.* 2017;15(3):284-333.
51. Nagler RM, Pollack S. Sjögren's syndrome induced by estrogen therapy. *Semin Arthritis Rheum.* 2000;30(3):209-14.
52. Uncu G, Avci R, Uncu Y, Kaymaz C, Develioğlu O. The effects of different hormone replacement therapy regimen on tear function, intraocular pressure and lens opacity. *Gynecol Endocrinol.* 2006;22(9):501-5.
53. Gayton JL. Etiology, prevalence and the treatment of dry eye disease. *Clin Ophthalmol.* 2009; 3:405-12.
54. Bron AJ, Tomlinson A, Foulks GN, Pepose JS, Baudoin C, Geerling G, Nichols KK, Lemp MA. Rethinking dry eye disease: a perspective on clinical implications. *Ocul Surf.* 2014;12 (2 Suppl): S1-31.
55. Labbé A, Liang Q, Wang Z, Zhang Y, Xu L, Baudoin C, Sun X. Corneal nerve structure and function in patients with non-Sjögren dry eye: clinical correlations. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2013;54(8):5144-50.

56. Gunes A, Inal EE, Tok L, Tok O. Assessment of corneal parameters with Scheimpflug imaging in patients with ankylosing spondylitis. *Semin Ophthalmol.* 2017;32(3):276-80.
57. Ortak H, Inanir A, Demir S, Uysal A, Şahin Ş, Sağcan M, Önder Y, Alim S, Demir AK. Decreased central corneal thickness in ankylosing spondylitis. *Int Ophthalmol.* 2014;34(2):236-8.
58. Marsovszky L, Németh J, Resch MD, Toldi G, Legány N, Kovács L, Balog A. Corneal Langerhans cell and dry eye examinations in ankylosing spondylitis. *Innate Immun.* 2014;20(5):471-7.
59. Massingale ML, Li X, Vallabhajosyula M, Chen D, Wei Y, Asbell PA. Analysis of inflammatory cytokines in the tears of dry eye patients. *Cornea.* 2009;28(9):1023-7.
60. Cordero-Coma M, Anzaar F, Sobrin L, Foster CS. Systemic immunomodulatory therapy in severe dry eye secondary to inflammation. *Ocul Immunol Inflamm.* 2007;15(2):99-104.
61. Jones L, Downie LE, Korb D, Benitez-del-Castillo JM, Dana R, Deng SX, Dong PN, Geerling G, Hida RY, Liu Y, Seo KY, Tauber J, Wakamatsu TH, Xu J, Wolffsohn JS, Craig JP. TFOS DEWS II Management and Therapy Report. *Ocul Surf.* 2017;15(3):575-628.
62. Trousdale MD, Zhu Z, Stevenson D, Schechter JE, Ritter T, Mircheff AK. Expression of TNF inhibitor gene in the lacrimal gland promotes recovery of tear production and tear stability and reduced immunopathology in rabbits with induced autoimmune dacryoadenitis. *J Autoimmune Dis.* 2005;28:2:6.
63. Li Z, Choi W, Oh HJ, Yoon KC. Effectiveness of topical infliximab in a mouse model of experimental dry eye. *Cornea.* 2012;31(Suppl.1):S25-S31.

-
64. Ji YW, Byun YJ, Choi W, Jeong E, Kim JS, Noh H, Kim ES, Song YJ, Park SK, Lee HK. Neutralization of ocular surface TNF- α reduces ocular surface and lacrimal gland inflammation induced by in vivo dry eye. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2013;54(12):7557-66.
65. Sullivan BD, Crews LA, Messmer EM, Foulks GN, Nichols KK, Baenninger P, Geerling G, Figueiredo F, Lemp MA. Correlations between commonly used objective signs and symptoms for the diagnosis of dry eye disease: clinical implications. *Acta Ophthalmol*. 2014;92(2):161-6.
66. Pflugfelder SC, Tseng SC, Yoshino K, Monroy D, Felix C, Reis BL. Correlation of goblet cell density and mucosal epithelial membrane mucin expression with rose bengal staining in patients with ocular irritation. *Ophthalmology*. 1997;104(2):223-35.
67. Buchholz P, Steeds CS, Stern LS, Wiederkehr DP, Doyle JJ, Katz LM, Figueiredo FC. Utility assessment to measure the impact of dry eye disease. *Ocul Surf*. 2006;4(3):155-61.
68. Vivino FB, Carsons SE, Foulks G, Daniels TE, Parke A, Brennan MT, Forstot SL, Scofield RH, Hammitt KM. New treatment guidelines for Sjögren's disease. *Rheum Dis Clin North Am*. 2016;42(3):531-51.
69. Beckman KA, Luchs J, Milner MS. Making the diagnosis of Sjögren's syndrome in patients with dry eye. *Clin Ophthalmol*. 2015;10:43-53.
70. Vitali C, Bombardieri S, Jonsson R, Moutsopoulos HM, Alexander EL, Carsons SE, Daniels TE, Fox PC, Fox RI, Kassan SS, Pillemer SR, Talal N, Weisman MH; European Study Group on Classification Criteria for Sjögren's Syndrome. Classification criteria for Sjögren's syndrome: a revised version of the European criteria proposed by the American-European Consensus Group. *Ann Rheum Dis*. 2002;61(6):554-8.

-
71. Contreras-Ruiz L, Masli S. Immunomodulatory cross-talk between conjunctival goblet cells and dendritic cells. *PloS One*. 2015;10(3):e0120284.
72. McCauley HA, Guasch G. Three cheers for the goblet cell: maintaining homeostasis in mucosal epithelia. *Trends Mol Med*. 2015; 21(8):492-503.
73. Villani E, Galimberti D, Viola F, Mapelli C, Del Papa N, Ratiglia R. Corneal involvement in rheumatoid arthritis: an in vivo confocal study. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2008;49(2):560-4.
74. Marsovszky L, Resch MD, Németh J, Toldi G, Medgyesi E, Kovács L, Balog A. In vivo confocal microscopic evaluation of corneal Langerhans cell density, and distribution and evaluation of dry eye in rheumatoid arthritis. *Innate Immun*. 2013;19(4):348-54.
75. Villani E, Galimberti D, Del Papa N, Nucci P, Ratiglia R. Inflammation in dry eye associated with rheumatoid arthritis: cytokine and *in vivo* confocal microscopy study. *Innate Immun*. 2013;19(4):420-7.
76. Tong L, Thumboo J, Tan YK, Wong TY, Albani S. The eye: a window of opportunity in rheumatoid arthritis? *Nat Rev Rheumatol*. 2014;10(9):552-60.
77. Listing J, Strangfeld A, Rau R, Kekow J, Gromnica-Ihle E, Klopsch T, Demary W, Burmester GR, Zink A. Clinical and functional remission: even though biologicals are superior to conventional DMARDs overall success rates remain low- results from RABBIT, the German biologics register. *Arthritis Res Ther*. 2006;8(3): R66.

78. Einarsson JT, Geborek P, Saxne T, Kapetanovic MC. Sustained remission in tumor necrosis factor inhibitor-treated patients with rheumatoid arthritis: a population-based cohort study. *J Rheumatol*. 2015;42(5):741-8.
79. Fujita M, Igarashi T, Kurai T, Sakane M, Yoshino S, Takahashi H. Correlation between dry eye and rheumatoid arthritis activity. *Am J Ophthalmol*. 2005;140(5):808-13.
80. Mertzanis P, Abetz L, Rajagopalan K, Espindle D, Chalmers R, Snyder C, Caffery B, Edrington T, Simpson T, Nelson JD, Begley C. The relative burden of dry eye in patient's lives: comparisons to a U.S. normative sample. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2005;46(1):46-50.
81. Moore JE, Vasey GT, Dartt DA, McGilligan VE, Atkinson SD, Grills C, Lamey PJ, Leccisotti A, Frazer DG, Moore TC. Effect of tear hyperosmolarity and signs of clinical ocular surface pathology upon conjunctival goblet cell function in the human ocular surface. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2011;52(9):6174-80.