

Junia Cabral Marques

**ESTUDO DOS NEUROPEPTÍDEOS NO EPITÉLIO CORNEANO
COM E SEM CERATOCONE**

Dissertação apresentada à Faculdade
Israelita de Ciências da Saúde Albert Einstein
para obtenção do Título de Mestre em
Ciências da Saúde.

São Paulo

2022

Junia Cabral Marques

**ESTUDO DOS NEUROPEPTÍDEOS NO EPITÉLIO CORNEANO
COM E SEM CERATOCONE**

Dissertação apresentada à Faculdade
Israelita de Ciências da Saúde Albert Einstein
para obtenção do Título de Mestre em
Ciências da Saúde.

Orientador: Prof. Dr. Luiz Vicente Rizzo
Coorientador: Prof. Dr. Walton Nosé

São Paulo

2022

Marques, Junia Cabral

Estudo dos neuropeptídeos no epitélio corneano com e sem ceratocone / Junia Cabral Marques. -- São Paulo, 2022.
x, 28 f.

Dissertação (Mestrado) – Faculdade Israelita de Ciências da Saúde Albert Einstein. Instituto Israelita de Ensino e Pesquisa Albert Einstein. Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde.

Título em inglês: *The study of the neuropeptides of corneal epithelium with and without keratoconus.*

1. Ceratocone. 2. Neuropeptídeos. 3. Quimiocinas. 4. Inflamação. 5. Córnea.

Elaborada pelo Sistema Einstein Integrado de Bibliotecas

FACULDADE ISRAELITA DE CIÊNCIAS DA SAÚDE ALBERT EINSTEIN

Coordenador do Curso de Pós-Graduação: Prof. Dr. Luiz Vicente Rizzo

Junia Cabral Marques

**ESTUDO DOS NEUROPEPTÍDEOS NO EPITÉLIO CORNEANO COM E
SEM CERATOCONE**

Presidente da banca: Prof. Dr. Luiz Vicente Rizzo

BANCA EXAMINADORA

Membros titulares:

Profa. Dra. Luciana Cavaleiro Marti

Profa. Dra. Maria Auxiliadora Monteiro Frazão

Dra. Adriana dos Santos Forseto

Membros suplentes:

Dra. Cláudia Maria Francesconi Benicio

Profa. Dra. Ana Luisa Hofling de Lima Farah

Aprovada em: 29/07/2022.

Dedicatória

Aos meus familiares, em especial a meus pais, Regina e José Carlos pelo amor, carinho e exemplo todos os dias.

Agradecimentos

Agradeço a todos que contribuíram de maneira direta ou indireta para tornar real este desafio. Aos pacientes que gentilmente se dispuseram a participar, aos colegas oftalmologistas que entenderam e abraçaram o projeto, às colaboradoras do centro cirúrgico da *Eye Clinic* que trabalharam comigo.

De maneira especial quero agradecer ao Prof. Dr. Luiz Vicente Rizzo pela orientação, à Dra. Karina Inácio Ladislau de Carvalho por toda sua solicitude e conhecimento, e à Rafaela Xavier por me ajudar em todos os momentos. Agradeço ainda aos demais colegas e membros do Centro de Pesquisa Experimental Laboratório de Pesquisa e Desenvolvimento Péter Murányi, do Hospital Israelita Albert Einstein.

Ao Prof. Dr. Walton Nosé agradeço por sua ajuda e ensinamentos que não constam nos livros.

Agradeço aos meus amigos que sempre estiveram presentes e me incentivaram em todos os momentos.

Agradeço a Deus por me permitir cumprir esta etapa e aos meus familiares por todo suporte e incentivo.

Sumário

Dedicatória	v
Agradecimentos.....	vi
Lista de abreviaturas	ix
Resumo	x
1 INTRODUÇÃO	1
1.1 Córnea.....	1
1.2 Ceratocone	2
1.2.1 Definição.....	2
1.2.2 Epidemiologia	2
1.2.3 Classificação	3
1.2.4 Diagnóstico.....	3
1.2.5 Tratamento	3
1.2.6 Genética e fatores ambientais	4
1.3 Marcadores inflamatórios	4
1.4 Neuropeptídeos	5
1.5 Sangue	5
1.6 Objetivos.....	6
2 MÉTODOS	7
2.1 Seleção de pacientes	7
2.1.1 Grupo ceratocone (grupo de estudo).....	7
2.1.2 Grupo Controle	7
2.2 Aspectos éticos	8
2.3 Coleta e análise das amostras de sangue periférico	9
2.4 Epitélio corneano.....	9
2.5 Extração de RNA.....	10
2.5.1 Extração de RNA do epitélio corneano e da camada leucoplaquetária.....	10
2.5.2 Purificação de RNA por coluna tratada com DNase I - PureLink	10
2.5.3 Tratamento do RNA com DNASE transcrição para cDNA.....	11
2.5.4 <i>Real-time</i> reação em cadeia da polimerase (qPCR)	11
2.5.4.1 Preparo da placa	11
2.5.4.2 Preparo do mix I	11

2.5.4.3 Preparo do mix II	12
2.5.4.4 Processamento e amplificação	12
2.6 Análise estatística.....	13
3 RESULTADOS	14
3.1 Comparação de linfócitos e neutrófilos no sangue	16
3.2 Comparação das amostras de córnea e camada leucoplaquetária (<i>buffy coat</i>) nos diferentes genes de interesse.....	17
3.3 Avaliação da relação entre topografia e interleucinas, quimiocinas, neuropeptídios na córnea e no <i>buffy coat</i>	19
4 DISCUSSÃO	21
6 CONCLUSÕES	25
7 REFERÊNCIAS	26
Abstract	
Apêndices	

Lista de abreviaturas

BC	<i>Buffy coat</i> (camada leucoplaquetária)
CCL	<i>Chemokine ligand</i> (ligante de quimiocina)
CGRP	<i>Calcitonin-gene-related peptide</i>
CXL	<i>Crosslinking</i> de colágeno de córnea
DEPC	letilpirocarbonato
GADPH	<i>Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase</i>
IL	Interleucina
KC	Ceratocone
MMP	Metilmetaloproteinase
NLR	<i>Neutrophil-to-lymphocyte ratio</i> (razão neutrófilo/linfócito)
NPY	Neuropeptídeo Y
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PRK	Ceratectomia fotorrefrativa
SP	Substância P
TGF	<i>Transforming growth factor</i>
TNF	Fator de necrose tumoral
VIP	<i>Vasoactive intestinal peptide</i> (Peptídeo intestinal vasoativo)

Resumo

Introdução: Estudos recentes têm demonstrado presença de características inflamatórias no ceratocone. Diversos marcadores inflamatórios estão descritos em lágrimas de pacientes com ceratocone na literatura. A patogênese da doença ainda é desconhecida, porém fatores ambientais, genéticos e sistêmicos parecem fazer parte da evolução do ceratocone. A presença de características sistêmicas como alergia e obesidade estão relacionados à progressão da doença. **Objetivos:** Avaliar os neuropeptídeos vasoativo intestinal (VIP) e neuropeptídeo Y (NPY), as quimiocinas ligante de CC 2 (CCL-2) e CC 5 (CCL-5), interleucina-8 (IL-8) e a interleucinas 6 (IL-6) em amostras de epitélio de córnea e de sangue em pacientes com ceratocone e controle sem doença. Estimar a associação com doença inflamatória sistêmica pela razão de neutrófilos sobre linfócitos (*neutrophil-to-lymphocyte ratio- NLR*), nas amostras de sangue periférico. **Métodos:** Estudo prospectivo comparativo com 32 pacientes com ceratocone em progressão (submetidos a *crosslinking* de colágeno - CXL) e 32 pacientes controle (submetidos a cirurgia ceratorrefrativa) em que foram analisados o epitélio da córnea, extraído do procedimento cirúrgico, e amostra de sangue (*buffy coat*). As amostras em triplicata foram avaliadas em RT-PCR para neuropeptídeos (VIP e NPY), interleucina (IL-6) e quimiocinas (CCL-2, CCL-5 e IL-8). **Resultados:** Nosso estudo demonstrou CCL-5 e IL-8 aumentados com significância estatística no epitélio da córnea dos pacientes com KC. As amostras de sangue têm aumento estatisticamente significativo em VIP, NPY e IL-8 no grupo KC, e estatisticamente inferiores neste grupo em relação ao grupo controle de CCL-2 e CCL-5. O índice NLR não obteve diferença estatística entre os grupos. **Conclusão:** Nossos dados corroboram estudos que sugerem alteração de *status* do ceratocone como doença inflamatória da córnea. A presença de IL-8 na córnea e sangue dos pacientes com KC nos permite inferir em favor de doença sistêmica com possível ação ou repercussão local. Mais estudos são necessários para elucidar a patogênese do KC e sua correlação com doença sistêmica.

Descritores: Ceratocone; Neuropeptídeos; Quimiocinas; Inflamação; Córnea

1 INTRODUÇÃO

1.1 Córnea

A córnea é uma estrutura ocular caracterizada por ser avascular e transparente, em contato direto com o filme lacrimal externamente e com o humor aquoso internamente. Anatomicamente é dividida em seis camadas: epitélio (estratificado, escamoso e não queratinizado), membrana de Bowman (acelular), estroma (ceratócitos), camada de Dua, membrana de Descemet e endotélio (camada única de células cubitais).⁽¹⁾

A camada mais externa, o epitélio, apresenta renovação celular contínua, representa aproximadamente 10% da espessura total da córnea e é densamente innervada. Tem de 5 a 7 camadas de células justapostas com três tipos celulares distribuídos: células superficiais, células aladas e células basais. As células do tecido epitelial corneano são responsáveis pela manutenção da homeostase do tecido como um todo. Têm função de barreira protetora contra infecções, através do reconhecimento de patógenos e resposta na secreção de produtos pró e anti-inflamatórios na cascata de cicatrização.⁽¹⁾ Além de citocinas e quimiocinas o epitélio da córnea produz também neuropeptídeos.

O estroma corneano corresponde a 80% de espessura da córnea e é predominantemente formado por água e colágeno do tipo 1. Os glicosaminoglicanos presentes no estroma são responsáveis pela regulação da hidratação e integridade estrutural. Na matriz extracelular do estroma estão os ceratócitos, que são ativados por fatores de modulação quando há injúria tecidual.⁽²⁾ Já o endotélio faz a homeostase da água, transportando o seu excedente para a câmara anterior.⁽¹⁾

A córnea é a estrutura mais densamente innervada do corpo humano. É derivada de ramos do V nervo craniano, o trigêmeo, cujos ramos entram pela região limbar na periferia do estroma no sentido do epitélio, formando o plexo subepitelial. Ao longo deste percurso subdividem-se em pequenos ramos que se conectam uns aos outros constituindo uma rede no epitélio. As terminações nervosas ficam expostas com a perda epitelial e são sensíveis a estímulos químicos, térmicos e mecânicos.⁽³⁾

1.2 Ceratocone

1.2.1 Definição

Ceratocone (KC) é definido como “condição em que a córnea assume formato cônico devido a seu afinamento e protrusão sendo uma condição não inflamatória”.^(4,5) Foi descrito como doença na córnea pelo médico alemão Burchard Mauchart em 1748 em que posteriormente foi denominada ceratocone pelo médico inglês John Nottingham em 1854.^(4,5)

Tem etiologia desconhecida, mas com características multifatoriais em que há influências ambientais, genéticas, fatores biomecânicos e bioquímicos.

A doença acomete ambos os sexos sem predileção. É usualmente bilateral e de desenvolvimento assimétrico, com início na puberdade e evolução até a terceira década de vida, levando a deficiência visual pelo astigmatismo irregular (de difícil correção, sendo a principal causa de baixa visão) e em casos avançados pela presença de cicatrizes na córnea.⁽⁴⁻⁶⁾

São descritas associações de KC com alergia ocular, atopia e outras doenças sistêmicas como síndrome de Down, síndrome de Ehlers-Danlos, osteogenesis imperfecta, hiper mobilidade articular e prolapso de valva mitral.⁽⁴⁻⁹⁾ Mais recentemente atribui-se também associação a obesidade, apneia do sono e distúrbios psiquiátricos.⁽¹⁰⁾

1.2.2 Epidemiologia

Ceratocone tem prevalência mundial de 50 a 230 casos/100.000^(4-6,11) com diferenças entre algumas populações estudadas por possíveis diferenças entre elas ou por critérios metodológicos. Embora esteja presente em diversas populações parece haver alguma predileção por populações asiáticas frente a caucasianos.^(10,11) Estudos em famílias com KC demonstraram que pacientes em que um dos pais têm a doença apresentam risco aumentado de desenvolvê-la, contudo não há padrão de herança bem definido.⁽⁷⁻¹¹⁾

1.2.3 Classificação

Há várias classificações propostas para estadiar a doença, mas as mais usadas são as de Amsler-Krumeich,⁽¹²⁾ que considera índices topográficos da córnea, espessura corneana, sinais clínicos à biomicroscopia e dioptrias (miopia e astigmatismo induzido), e a classificação proposta por Rabinowitz, quanto à localização e formato do cone.⁽¹³⁾

1.2.4 Diagnóstico

O diagnóstico é feito a partir de exame oftalmológico clínico geral (refração, biomicroscopia de segmento anterior, tonometria de aplanção e fundoscopia) e exames oftalmológicos de imagem complementares: ceratoscopia computadorizada da córnea, mapas de elevação corneana (tomografia corneana), mapas de espessura corneana (paquimetria), e análise biomecânica, nos quais evidenciam-se as alterações topográficas da córnea e de sua espessura.

1.2.5 Tratamento

O tratamento clínico inicial pode ser feito com óculos e/ou lentes de contato. Com a evolução da doença a lente de contato rígida torna-se a melhor opção. O tratamento cirúrgico com *crosslinking* de colágeno de córnea (CXL) é sugerido para diminuir a velocidade de progressão da doença e os anéis intra-estromais podem aplanar a córnea, diminuindo o astigmatismo irregular. Na presença de opacidades e/ou cicatrizes na córnea ou quando não há indicação das alternativas de tratamento anteriormente citadas há opção de transplante de córnea, sendo KC uma das principais indicações para sua realização no mundo.⁽⁶⁾

1.2.6 Genética e fatores ambientais

A genética no KC não está bem definida, com variação na descrição de genes que podem estar associados ao desenvolvimento da doença, como *visual system homeobox 1* (VSX1), *superoxide dismutase 1* (SOD1), *lysyl oxidase* (LOX), e DOCK 9.^(3,10,14) Potencialmente correlacionados à genética estão descritos 17 genes em diferentes cromossomos ligados ao desenvolvimento de KC, sendo muitos deles associados a consanguinidade.^(7,8,10)

Fatores predisponentes, como a genética, sofrem ação de um gatilho ligado a fatores ambientais, dentre eles: o ato de coçar os olhos, uso de lentes de contato, exposição a radiação ultravioleta, atopia e obesidade.^(9,15)

1.3 Marcadores inflamatórios

A córnea está em contato direto com o filme lacrimal e ambos fazem parte da superfície ocular (composto ainda por glândula lacrimal e conjuntiva). Vários estudos demonstram a presença de proteases, citocinas, fator de necrose tumoral *alpha* e beta (TNF- α e β), e atividade proteolítica no filme lacrimal.⁽¹⁶⁻¹⁸⁾ No KC o epitélio tem aumento de concentração de metilmetaloproteinase-9 (MMP-9), interleucina-6 (IL-6) e TNF- α .^(16,17) O afinamento estromal no KC parece decorrente de enzimas proteolíticas ou diminuição nos inibidores de proteases.^(6,16,17) Outra teoria seria que poderia haver redistribuição nas lamelas da córnea, que diminuiriam a adesão interlamelar e assim as inserções lamelares da camada de Bowman.⁽⁸⁾

Muitos estudos têm enfatizado a hipótese da doença ter origem inflamatória ou participação de seus componentes, que poderiam explicar achados de aumento de citocinas pró-inflamatórias no filme lacrimal de indivíduos afetados, como IL-4, IL-5, IL-6, IL-8, IL-12, IL-13, IL-17, TNF- α , *transforming growth factor*- β (TGF- β), mediadores celulares inflamatórios.^(14,19-23)

1.4 Neuropeptídeos

Neuropeptídeos são pequenas moléculas proteicas produzidas e liberadas por neurônios através de via de regulação e secreção agindo em substratos neuronais. Estas moléculas parecem contribuir para o processo cicatricial do epitélio corneano.⁽¹⁾ São considerados mediadores entre neurônios e células efetoras, como glândulas, células musculares e imunes (efeito trófico).

Alguns autores descrevem que a grande presença de inervação leva a presença dos neuropeptídeos na superfície ocular, que por sua vez ativam o sistema imune, levando a inflamação neurogênica.⁽²⁴⁻²⁶⁾

Entre os neuropeptídeos descritos estão substância P (SP), *calcitonin-gene-related peptide* (CGRP), *vasoactive intestinal peptide* (VIP) e neuropeptídeo Y (NPY). Há descrição de progressão de KC com achados de neuropeptídeos.⁽²⁵⁾

A SP tem ação anti-inflamatória, aumenta a produção de metabólitos do ácido aracdônico, induz vasodilatação, quimiotaxia das células imunes e migração do epitélio da córnea no processo cicatricial.

O CGRP diminui a produção de citocinas pró-inflamatórias (TNF- α , IL-1, IL-12p40 e CCL-4) e promove secreção de IL-10 dos monócitos.⁽²⁶⁾

Combinados, CGRP e SP contribuem para recrutamento de neutrófilos na córnea inflamada através de IL-8. A SP amplifica a atuação de CGRP na superfície da córnea.⁽²⁶⁾

Neuropeptídeo VIP é expressado por células imunes e reduz ativamente a função de macrófagos e células dendríticas pela inibição quimiotática de citocinas pró-inflamatórias e diminuição de receptores *toll-like*.

O neuropeptídeo NPY induz quimioatração, adesão, fagocitose, liberação de TGF- β 1 de macrófagos e secreção de IL-1 β de monócitos. Contribui para imunidade ocular privilegiada.⁽²⁶⁾

1.5 Sangue

A análise de sangue vem sendo pesquisada em pacientes com KC a fim de tentar correlacionar dados sistêmicos principalmente (ou especialmente) ao

(des)balanço oxidativo.⁽¹⁴⁾ Foi descrito que o índice *neutrophil-to-lymphocyte ratio* (NLR) estaria aumentado em pacientes portadores de KC.⁽²⁷⁾ Este índice está descrito em doenças inflamatórias sistêmicas e câncer.

1.6 Objetivos

1. Avaliar a presença dos neuropeptídeos (NPY e VIP), citocina (IL-6) e quimiocinas (CCL-2, CCL-5 e IL-8) no epitélio corneano em pacientes com e sem ceratocone para determinar sua associação com inflamação;
2. Associar achados no epitélio corneano com achados na amostra sanguínea periférica de pacientes com e sem ceratocone.

2 MÉTODOS

2.1 Seleção de pacientes

Para a seleção de pacientes dos grupos de estudo e controle foram realizados exames oftalmológicos prévios, que consistiram em exame clínico oftalmológico de rotina, que são: melhor acuidade visual corrigida no refrator, biomicroscopia de segmento anterior (para observação clínica da córnea e demais estruturas do segmento anterior), tonometria de contato e mapeamento de retina. Ambos os grupos realizaram ainda exames de ceratoscopia computadorizada da córnea (EyeSys) e tomografia da córnea (Pentacam ou Galilei), que fazem parte da propedêutica pré-operatória em ambos os grupos do estudo. Os pacientes foram divididos em dois grupos como se segue:

2.1.1 Grupo ceratocone (grupo de estudo)

Elegíveis quando houve diagnóstico de KC e indicação médica para realização de CXL, sugerido quando houve progressão da doença. Não houve estadiamento quanto a ceratometria nos pacientes com KC, mas a ceratometria máxima (Kmax) foi descrita em todos os pacientes. O grupo de estudo foi formado por 32 raspados de epitélio de córnea, usualmente descartados na ocasião da realização de CXL, e imediatamente inserido em tubo Eppendorf com solução de *RNA later*. Em seguida foi realizada punção venosa periférica para retirada de 20mL de sangue.

2.1.2 Grupo Controle

Elegíveis quando houve diagnóstico de miopia ou hipermetropia moderadas ou astigmatismo composto (até 6 dioptrias no equivalente esférico) sem alterações nos exames que compunham a propedêutica descrita previamente, em que pacientes teriam indicação cirúrgica da correção das ametropias pelo método de ceratectomia fotorrefrativa (PRK), sem sinais clínicos ou topográficos de KC. O grupo controle foi composto por coleta de 32 raspados de epitélio de córnea, usualmente

descartados, na ocasião de procedimento de PRK, e imediatamente inserido em tubo Eppendorf com solução de *RNA later*. Posteriormente foi seguida da punção venosa periférica para retirada de 20mL de sangue.

Para ambos os grupos foi arguido pelo investigador sobre presença de doença(s) sistêmica(s), uso de medicações em uso, peso e altura.

Critérios de inclusão: pacientes de ambos os sexos que foram submetidos a CXL (grupo de estudo) ou a PRK (grupo controle), de ambos os sexos, na faixa etária entre 18 anos completos e 40 anos, usuários ou não de lentes de contato, e após preenchimento do TCLE por escrito, e sem histórico de procedimento cirúrgico ocular prévio, ou quaisquer outras doenças sistêmicas em tratamento com corticoides.

Critérios de exclusão: pacientes submetidos a outro(s) procedimento(s) cirúrgico(s) ocular(es) prévio(s), portadores de imunodeficiências, mulheres grávidas, pacientes em tratamento quimioterápico ou em uso contínuo de corticosteroides sistêmicos.

A estimativa de tamanho amostral foi realizada pelo serviço de estatística do Instituto Israelita de Ensino e Pesquisa (IIEP) considerando os objetivos de comparar os dois grupos de estudo quanto às medidas de CGRP e VIP, assumindo os desvios padrão de 128 e 6, respectivamente, e a utilização de testes t para amostras com variâncias iguais, bilateral e com nível de significância 5%.

2.2 Aspectos éticos

Os pacientes foram informados do estudo e tiveram a oportunidade de participar quando estavam em concordância com o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (Apêndice 2) aprovado pelo Comitê de Ética em pesquisa do Hospital Israelita Albert Einstein (número CAAE: 97314818.7.0000.0071). O estudo foi aprovado pela instituição (SGPP: 3497). Os pacientes foram submetidos à cirurgia oftalmológica conforme a rotina habitual do serviço, sem qualquer mudança para adaptação ao estudo. O acompanhamento pós-operatório também ocorreu como de rotina no serviço.

2.3 Coleta e análise das amostras de sangue periférico

Foram coletados 20mL de sangue periférico por punção venosa em membro superior de indivíduos pertencentes a este estudo, após assepsia local. Realizou-se a técnica de coleta a vácuo que cujo sangue flui diretamente para o tubo de coleta. Esta técnica possibilita a coleta de vários tubos e é caracterizada por ser um sistema fechado, sem a necessidade de manuseio da amostra. A coleta de sangue não faz parte da rotina oftalmológica usual e foi proposta neste estudo com intuito de correlacionar os achados da córnea com achados sistêmicos no grupo de estudo.

O material foi coletado no centro cirúrgico do *Eye Clinic Day Hospital*, e foi enviado para análise laboratorial, no Centro de Pesquisa Experimental – Laboratório de Pesquisa e Desenvolvimento Péter Murányi, do Hospital Israelita Albert Einstein. A contagem de células sanguíneas foi realizada por citometria, seguida de determinação das células brancas para contagem de neutrófilos e de linfócitos cuja divisão implica no NLR.

Os procedimentos laboratoriais foram realizados em cabine de segurança biológica devidamente esterilizada. Foram separados soro, plasma e camada leucoplaquetária (*buffy coat*), seguidos por congelamento em *freezer* a -80°C para futuros ensaios imunológicos e expressão gênica.

2.4 Epitélio corneano

Ambas as coletas das amostras de córnea do grupo de estudo e do grupo controle ocorreram na ocasião da realização dos procedimentos indicados (CXL ou PRK) pela equipe médica do serviço *Eye Clinic Day Hospital* (São Paulo, SP).

O paciente foi posicionado no centro cirúrgico sob o microscópio cirúrgico, e então colocado campo estéril e sob anestesia tópica com colírio anestésico (Anestalcon - Alcon, Forth Worth, TX, USA). O olho a ser operado foi exposto com blefarostato para então remoção do epitélio corneano. As amostras de epitélio corneano removidos com espátula crescente (Alcon, Forth Worth, TX, USA) por ocasião do procedimento cirúrgico (PRK no grupo controle e CXL no grupo de estudo) foram colocadas em tubo Eppendorf com solução *RNA later* e encaminhadas

imediatamente para o Centro de Pesquisa Experimental – Laboratório de Pesquisa e Desenvolvimento Péter Murányi, do Hospital Israelita Albert Einstein onde foi mantida congelada até ocasião do seu processamento.

2.5 Extração de RNA

2.5.1 Extração de RNA do epitélio corneano e da camada leucoplaquetária

Após descongelar a amostra, esta foi transferida para o frasco de Eppendorf do kit PureLink RNA (ThermoFisher Scientific) e foi centrifugado 2.000xg por 5 minutos a 4°C. Foi retirado o sobrenadante e acrescentado 600µL de Lysis Buffer e posteriormente foi passado no *vórtex* para homogeneização e transferido para um tubo do mesmo kit onde foi centrifugado por 2 minutos a 12.000xg.

2.5.2 Purificação de RNA por coluna tratada com DNase I - PureLink

Para realização desta etapa, foi adicionado ao tubo o mesmo volume de etanol 70% e misturado no *vórtex*. Posteriormente foi transferido 700µL para tubo com filtro e centrifugado de maneira rápida (*spin*) por 15 segundos à 12.000xg com descarte da parte líquida. Esta última etapa foi repetida até findar a amostra contida no Eppendorf.

Posteriormente foi adicionado 350µL de *wash buffer* I na coluna e centrifugado no *spin* por 12.000xg por 15 segundos e descartado o sobrenadante da coluna. Foi adicionado à coluna 80µL da mistura de PureLink™ DNase, incubado por 15 minutos e passado no *spin*. Na sequência foi adicionado 500µL de *wash buffer* II com etanol, centrifugado no *spin* por 12.000xg por 15 segundos e descartado sobrenadante da coluna, sendo esta etapa repetida e centrifugada a 12.000xg por 1 minuto em temperatura ambiente, e substituindo a coluna por um Eppendorf do kit. Segue-se com adição de 62µL de RNASE-FREE water e deixado em temperatura ambiente por 1 minuto, centrifugado a 12.000xg por 2 minutos em temperatura ambiente e trocado frasco pelo Eppendorf do kit. Com RNA purificado a quantificação das amostras foi submetida ao Qubit 2.0 Fluorometer (ThermoFisher Scientific) e NanoDrop™ One Microvolume UV-Vis Spectrophotometer (ThermoFisher Scientific).

2.5.3 Tratamento do RNA com DNASE transcrição para cDNA

Às amostras em tubos de 0,2mL, mantidas em recipiente com gelo durante todo o procedimento, foram adicionadas 1ng-5µg do RNA tratado, 0,5µL de Oligo-dT (0,5µg/µL), 0,5µL de *Random primer* (0,1µg/µL), 1µL de dNTPs (10nM) e água ietilpirocarbonato (DEPc) q.s.p. 20µL. Estas foram alocadas no termociclador (Veriti® - 96 Well Thermal Cycler, Applied Biosystems, ThermoFisher Sc., Singapur) durante 5 minutos a 65°C e durante 2 minutos a 42°C. O programa foi então pausado para acrescentar a cada tubo, sem retirá-los da máquina, 4µL tampão de *Superscript II* (5x), 2µL de DTT (0,1M), 1µL de RNase *out* e 1µL *Superscript II*. Foi então reiniciado o programa que performou a 42°C por 50 minutos, a 70°C por 15 minutos. O cDNA foi então armazenado no *freezer* a -20°C para posterior análise.

2.5.4 Real-time reação em cadeia da polimerase (qPCR)

2.5.4.1 Preparo da placa

As reações em cadeia da polimerase (PCR) em tempo real foram realizadas em placas de 96 poços, usando reagente Power SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA) para cada amostra. As placas não foram preparadas nas bancadas em que estavam as máquinas de leitura para evitar contaminação. Os preparos descritos a seguir foram feitos em triplicata para cada amostra.

2.5.4.2 Preparo do mix I

Em um tubo de 0,5mL foram misturados 17,5µL de SyBR, 0,7µL de *Primer 5'* 100nM, 0,7µL de *Primer 3'* 100nM, 11,1mL de água, resultando em volume final de 30µL.

2.5.4.3 Preparo do mix II

Da solução descrita acima, foi pipetado 3µL do cDNA em 10µL do Mix I em microtubos em tiras (*strips*) de 0,2mL. Cada um dos *strips* alimentou 3 poços na placa de *real time*, que foi cuidadosamente vedada com plástico, a fim de se evitar sua evaporação. Posteriormente a placa foi centrifugada, em centrífuga adequada, em rotação de 1000rpm por 30 segundos, sendo posteriormente levada para análise.

2.5.4.4 Processamento e amplificação

Esta etapa ocorreu no QuantStudio 6 Flex Real-Time PCR System® (Applied BioSystems, ThermoFisher Sc.) e os resultados exibidos no *software* Design & Analysis Software 2.5.0. Após colocada a placa na posição correta, na gaveta do equipamento, foram selecionados os *primers*. A programação do equipamento decorreu como se segue: *Hold stage* - 95°C durante 10 minutos; *PCR stage* (40 ciclos) -95°C durante 15 segundos, seguido de 60°C por 1 minuto; *Melt curve stage* -95°C por 15 segundos, seguido de 60°C por 1 minuto e 95°C por 15 segundos.

Foram realizadas amostras em triplicata e controle com GAPDH em cada placa.

Os *primers* (Invitrogen®, ThermoFisher Sc.) utilizados para este experimento foram:

- I. *Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase* (GAPDH) (controle);
- II. *Vasoactive Intestinal Neuropeptide* – VIP;
- III. *Neuropeptide Y* – NPY;
- IV. *Interleukin-6* - IL-6;
- V. *Interleukin -8* - IL-8;
- VI. *Chemokine ligand 2* - CCL2;
- VII. *Chemokine ligand 5* - CCL5.

A tabela 1 demonstra as sequências dos "*primers*" utilizados.

Tabela 1. Sequência dos *primers*

	<i>Forward sequence</i>	<i>Reverse sequence</i>
VIP	CCA GTC AAA CGT CAC TCA GAT GC	CTG GAA AGT CGG GAG ATT CTC C
NPY	GCT GCG ACA CTA CAT CAA CCT C	CTG TGC TTT CTC TCA TCA AGA GG
IL-6	AAG CCA GCC AGA GCT GTG CAG ATG	GTT GGG TCA GGG GTG GTT AT
IL-8	CTT CCT GAT TTC TGC AGC TCT G	AAA CTT CTC CAC AAC CCT CTG C
CCL5	CGT GCC CAC ATC AAG GAG	GGA CAA GAG CAA GCA GAA AC
CCL2	CCC AAT GAG TAG GCT GGA GA	AAA ATG GAT CCA CAC CTT GC
GAPDH	ATT GCC CTC AAC GAC CAC TT	TGC TGT AGC CAA ATT CGT TGT C

CCL: ligante de quimiocina CC; IL: interleucina; NPY: neuropeptídeo Y; VIP: peptídeo vasoativo intestinal.

2.6 Análise estatística

As variáveis qualitativas foram descritas por frequências absolutas e relativas e comparadas entre os grupos por teste exato de Fisher ou testes de qui-quadrado. As variáveis quantitativas tiveram sua distribuição estudada por gráficos *bloxplot*, histogramas e gráficos de comparação de quartis, além de testes de normalidade de Shapiro-Wilk e foram descritas por médias e desvio-padrão ou por medianas e quartis, além de mínimo e máximo na amostra. As comparações entre os dois grupos quanto as variáveis quantitativas foram realizadas por testes *t* de Student com ou sem correção para variâncias desiguais nos casos em que a suposição de normalidade foi razoável e por testes de Mann-Whitney nos demais casos. Para avaliar a correlação entre medidas quantitativas, utilizamos o coeficiente de correlação de Spearman, dada a distribuição assimétrica da maioria das medidas. As análises foram realizadas com auxílio do programa SPSS (IBM Corp. IBM SPSS Statistics for Windows, Version 26.0. 2019) e considerando nível de significância de 5%.

3 RESULTADOS

A distribuição da amostra consta de 64 pacientes, sendo 32 (50%) no grupo controle e 32 (50%) no grupo caso. Considerando por gênero temos maioria de homens em ambos os grupos sendo 53,1% no grupo controle e 62,5% no grupo de casos ($p=0,448$). A média de idade dos pacientes foi 27,5 entre os controles e 26,3 entre os casos ($p=0,309$). Não há evidências de diferenças quanto à altura dos indivíduos ($p=0,192$). No entanto quando observamos as variáveis peso e índice de massa corporal há evidências de diferenças entre os grupos, com valores maiores no grupo caso (respectivamente $p=0,007$ e $p=0,015$). Quando consideramos a variável sobrepeso, observamos 37,5% nos controles e 71,9% nos casos ($p=0,006$). Esta é a primeira descrição da associação de pacientes com KC e obesidade no Brasil.

A lateralidade direita foi de 53,1% no grupo controle e 43,8% nos casos ($p=0,453$). Presença de doenças sistêmicas foi mais frequente entre os pacientes do grupo caso (37,5%) e essa diferença se mostrou significativa ($p=0,021$), sendo a doença mais comum a alergia respiratória ($p=0,604$), seguida de distúrbios da tireoide ($p=0,450$) e ansiedade ou depressão ($>0,99$). O uso contínuo de medicação é citado por 21,9% dos controles e por 43,8% dos casos ($p=0,062$).

Os grupos também se diferenciaram em relação à ceratometria máxima na topografia (Kmax), maior no grupo caso, com mediana de 54,4 enquanto a mediana no grupo controle foi 44,0 ($p<0,001$). A espessura da córnea (paquimetria mínima), apresenta evidências de maiores valores no grupo de controles (valor- $p<0,001$). A tabela 2 descreve as características sociodemográficas e clínicas dos grupos estudados.

Tabela 2. Características sociodemográficas e clínicas dos grupos

	Grupo		Valor-p
	Controle (n=32)	Caso (n=32)	
Gênero, n(%)			
Feminino	15 (46,9)	12 (37,5)	0,448 q
Masculino	17 (53,1)	20 (62,5)	
Idade à coleta de dados			0,309 tc
Média (desvio-padrão)	27,5 (2,6)	26,3 (5,7)	
Mediana (1º; 3º quartil)	27,5 (25,8; 29,4)	25,9 (21,7; 29,6)	
Mínimo; máximo (n)	21,5; 31,4 (32)	18,2; 38,3 (32)	

continua...

...continuação

Peso			0,007 m
Média (desvio-padrão)	72,5 (17,9)	84,2 (17,7)	
Mediana (1º; 3º quartil)	70,0 (58,5; 83,5)	83,0 (70,0; 98,0)	
Mínimo; máximo (n)	48,0; 125,0 (32)	59,0; 119,0 (32)	
Altura			0,192 t
Média (desvio-padrão)	169,4 (10,3)	173,1 (12,0)	
Mediana (1º; 3º quartil)	167,0 (163,0; 177,0)	171,5 (163,0; 183,0)	
Mínimo; máximo (n)	150,0; 187,0 (32)	155,0; 201,0 (32)	
IMC			0,015 m
Média (desvio-padrão)	25,0 (4,5)	28,1 (5,6)	
Mediana (1º; 3º quartil)	23,2 (22,1; 27,3)	26,7 (24,9; 31,6)	
Mínimo; máximo (n)	19,0; 37,8 (32)	19,4; 41,4 (32)	
Lateralidade, n(%)			
Olho direito	17 (53,1)	14 (43,8)	0,453 q
Olho esquerdo	15 (46,9)	18 (56,3)	
Sobrepeso ou obesidade, n(%)			
Não (IMC <25)	20 (62,5)	9 (28,1)	0,006 q
Sim (IMC ≥25)	12 (37,5)	23 (71,9)	
Presença de doença sistêmica, n(%)			
Não	28 (87,5)	20 (62,5)	0,021 q
Sim	4 (12,5)	12 (37,5)	
Doença sistêmica – Distúrbio da tireoide, n(%)			
Não	3 (75)	11 (91,7)	0,450 f
Sim	1 (25)	1 (8,3)	
Total	4 (100)	12 (100)	
Doença sistêmica – alergia respiratória, rinite, n(%)			
Não	2 (50)	4 (33,3)	0,604 f
Sim	2 (50)	8 (66,7)	
Total	4 (100)	12 (100)	
Doença sistêmica – depressão ou ansiedade, n(%)			
Não	3 (75)	10 (83,3)	>0,99 f
Sim	1 (25)	2 (16,7)	
Total	4 (100)	12 (100)	
Doença sistêmica – outra			
Não	4 (100)	8 (66,7)	0,516 f
Sim	0 (0)	4 (33,3)	
Total	4 (100)	12 (100)	
Uso contínuo de medicação, n(%)			
Não	25 (78,1)	18 (56,3)	0,062 q
Sim	7 (21,9)	14 (43,8)	
Ceratometria máxima – topografia			<0,001 m
Média (desvio-padrão)	44,0 (1,6)	55,2 (5,8)	
Mediana (1º; 3º quartil)	44,2 (43,1; 45,4)	54,4 (50,3; 58,0)	
Mínimo; máximo (n)	38,9; 46,0 (32)	48,2; 71,3 (25)	

continua...

...continuação

Paquimetria mínima – espessura da córnea			<0,001 t
Média (desvio-padrão)	531,2 (34,6)	487,9 (40,1)	
Mediana (1º; 3º quartil)	524,0 (501,0; 561,0)	488,0 (457,0; 526,0)	
Mínimo; máximo (n)	472,0; 596,0 (32)	412,0; 546,0 (28)	

IMC: índice de massa corporal; f: teste exato de Fisher; q: teste de qui-quadrado; tc: teste t para variâncias desiguais; t: teste t de Student; m: teste de Mann-Whitney.

3.1 Comparação de linfócitos e neutrófilos no sangue

Não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos quando analisados os resultados do hemograma. No índice NLR também não houve evidências de diferenças significantes ($p=0,995$), conforme apresentados na tabela 3. As demais medidas laboratoriais de amostras sanguíneas também não apresentam diferenças significantes entre os grupos e estão demonstradas na tabela suplementar 1 (Apêndice 1).

Tabela 3. Resultados das amostras sanguíneas

Amostras de sangue	Grupo		Valor-p
	Controle	Caso	
Porcentagem de linfócitos			0,727 m
Média (desvio-padrão)	39,7 (35,4)	32,7 (7,7)	
Mediana (1º; 3º quartil)	33,6 (27,6; 38,8)	33,2 (29,2; 38,4)	
Mínimo; máximo (n)	23,5; 231,0 (32)	12,3; 48,8 (32)	
Contagem de linfócitos			0,304 m
Média (desvio-padrão)	4,2 (8,9)	2,4 (0,7)	
Mediana (1º; 3º quartil)	2,7 (2,0; 3,1)	2,3 (1,9; 2,9)	
Mínimo; máximo (n)	1,6; 52,8 (32)	1,4; 3,9 (32)	
Porcentagem de neutrófilos			0,638 m
Média (desvio-padrão)	55,5 (10,8)	56,0 (8,5)	
Mediana (1º; 3º quartil)	57,4 (50,3; 62,3)	56,0 (52,1; 59,7)	
Mínimo; máximo (n)	14,5; 70,3 (32)	39,8; 77,8 (32)	
Contagem de neutrófilos			0,456 m
Média (desvio-padrão)	4,4 (1,5)	4,2 (1,3)	
Mediana (1º; 3º quartil)	4,4 (3,3; 5,4)	4,2 (3,4; 4,7)	
Mínimo; máximo (n)	1,0; 7,1 (32)	2,1; 9,0 (32)	
NLR			0,995 m
Média (desvio-padrão)	1,7 (0,6)	1,9 (1,1)	
Mediana (1º; 3º quartil)	1,7 (1,2; 2,3)	1,7 (1,4; 2,0)	
Mínimo; máximo (n)	0,02; 2,9 (32)	0,9; 6,4 (32)	

NLR: índice neutrófilo/linfócito; t: teste t de Student; m: teste de Mann-Whitney.

3.2 Comparação das amostras de córnea e camada leucoplaquetária (*buffy coat*) nos diferentes genes de interesse

As medidas das amostras foram avaliadas no sangue [camada leucoplaquetária ou *buffy coat* (BC)] e córnea (C), quanto a diferença em *fold induction* (Tabela 4). As figuras 1 e 2 mostram respectivamente as medidas do gene de interesse em *fold induction* para córnea e BC, respectivamente.

Considerando os resultados em *fold induction* para córnea, os neuropeptídeos VIP e NPY não apresentaram diferença estatística (respectivamente $p=0,413$ e $p=0,638$). A quimiocina CCL-2 apresentou valor- $p=0,052$, enquanto CCL-5 foi estatisticamente significativa ($p<0,001$). A interleucina IL-8 apresentou valor- $p=0,002$, portanto significativa, porém IL-6 não apresentou significância estatística ($p=0,376$).

Para BC os resultados em *fold induction* apresentaram diferença estatística nos neuropeptídeos VIP ($p<0,001$) e NPY ($p<0,001$). Nas quimiocinas CCL-2 e CCL-5 os valores são menores entre os casos (respectivamente $p=0,006$ e $0,005$). Assim como na córnea IL-8 apresentou resultado significativo com $p<0,001$ e IL-6 sem significância estatística ($p=0,063$).

A IL-8 é a única variável aumentada no grupo caso, com significância estatística, tanto nas amostras de córnea como no BC.

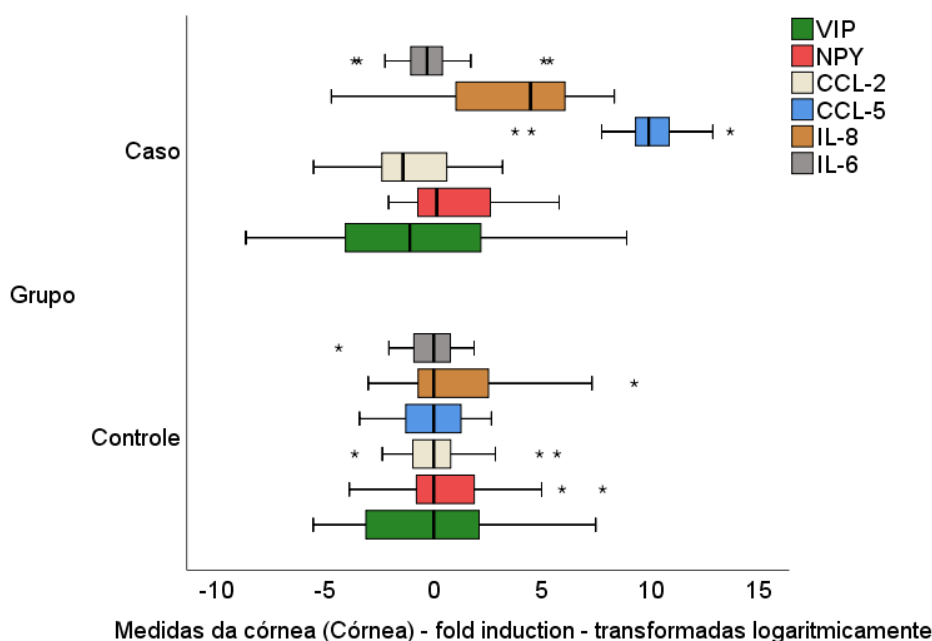


Figura 1. Medidas de *fold induction* dos genes de interesse na córnea

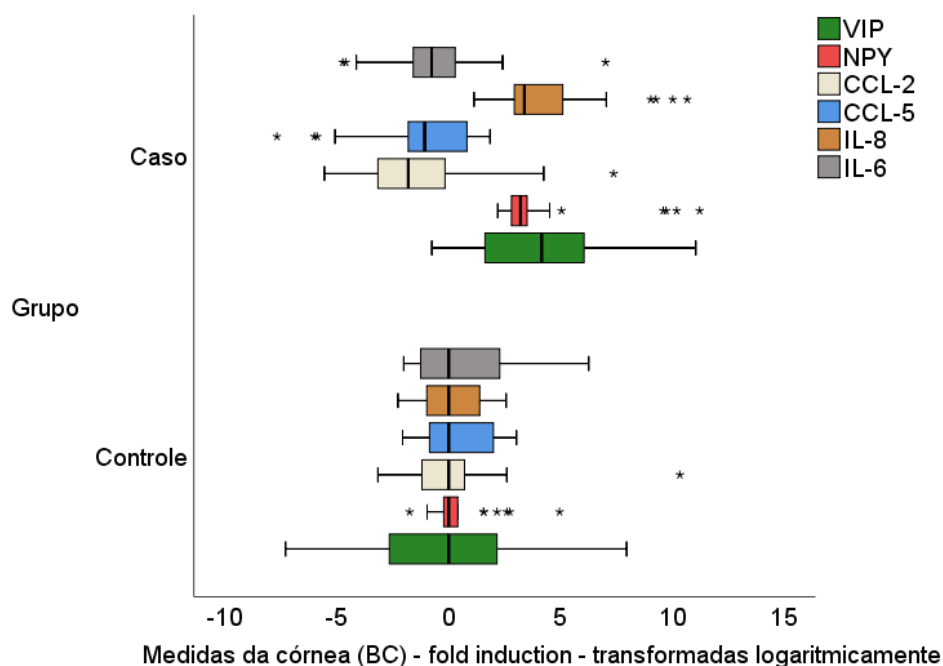


Figura 2. Medidas de *fold induction* dos genes de interesse *buffy coat*

Tabela 4. Resultados em *fold induction*

	Grupo		Valor-p
	Controle	Caso	
VIP córnea (<i>fold induction</i>)			0,413 m
Mediana (1º; 3º quartil)	1,0 (0,0; 8,2)	0,3 (0,0; 9,4)	
Mínimo; máximo (n)	0,004; 1746,4 (32)	0,0002; 7270,5 (32)	
NPY córnea (<i>fold induction</i>)			0,638 m
Mediana (1º; 3º quartil)	1,0 (0,4; 8,0)	1,1 (0,5; 13,6)	
Mínimo; máximo (n)	0,02; 2402,5 (32)	0,1; 323,1 (32)	
CCL-2 córnea (<i>fold induction</i>)			0,052 m
Mediana (1º; 3º quartil)	1,0 (0,4; 2,2)	0,2 (0,1; 1,8)	
Mínimo; máximo (n)	0,03; 293,1 (32)	0,004; 23,8 (30)	
CCL-5 córnea (<i>fold induction</i>)			<0,001 m
Mediana (1º; 3º quartil)	1,0 (0,3; 3,5)	20161,8 (9983,5; 55364,2)	
Mínimo; máximo (n)	0,03; 14,3 (30)	42,4; 862202,2 (31)	
IL-8 córnea (<i>fold induction</i>)			0,002 m
Mediana (1º; 3º quartil)	1,0 (0,5; 17,6)	89,0 (3,5; 423,0)	
Mínimo; máximo (n)	0,05; 10321,3 (32)	0,009; 4132,1 (32)	
IL-6 córnea (<i>fold induction</i>)			0,376 m
Mediana (1º; 3º quartil)	1,0 (0,4; 2,2)	0,7 (0,3; 1,5)	
Mínimo; máximo (n)	0,01; 6,4 (32)	0,03; 211,5 (32)	
VIP BC (<i>fold induction</i>)			<0,001 m
Mediana (1º; 3º quartil)	1,0 (0,1; 8,6)	64,2 (5,1; 440,4)	
Mínimo; máximo (n)	0,0007; 2831,5 (32)	0,5; 62489,8 (32)	
NPY BC (<i>fold induction</i>)			<0,001 m
Mediana (1º; 3º quartil)	1,0 (0,8; 1,5)	24,6 (16,6; 33,3)	
Mínimo; máximo (n)	0,2; 141,6 (32)	9,0; 73893,8 (32)	

continua...

...continuação

CCL-2 BC (<i>fold induction</i>)			0,006 m
Mediana (1º; 3º quartil)	1,0 (0,3; 2,0)	0,2 (0,0; 0,9)	
Mínimo; máximo (n)	0,04; 30644,3 (32)	0,004; 1580,7 (32)	
CCL-5 BC (<i>fold induction</i>)			0,005 m
Mediana (1º; 3º quartil)	1,0 (0,4; 7,4)	0,3 (0,2; 2,3)	
Mínimo; máximo (n)	0,1; 20,6 (32)	0,0005; 6,3 (30)	
IL-8 BC (<i>fold induction</i>)			<0,001 m
Mediana (1º; 3º quartil)	1,0 (0,4; 4,0)	29,4 (18,8; 166,4)	
Mínimo; máximo (n)	0,1; 13,0 (32)	3,1; 42465,4 (32)	
IL-6 BC (<i>fold induction</i>)			0,063 m
Mediana (1º; 3º quartil)	1,0 (0,3; 10,2)	0,5 (0,2; 1,3)	
Mínimo; máximo (n)	0,1; 519,9 (31)	0,009; 1103,1 (32)	

BC: *buffy coat*.; CCL: ligante de quimiocina CC; IL: interleucina; NPY: neuropeptídeo Y; VIP: peptídeo vasoativo intestinal; m: teste de Mann-Whitney.

3.3 Avaliação da relação entre topografia e interleucinas, quimiocinas, neuropeptídeos na córnea e no *buffy coat*

Avaliamos a relação entre as medidas de ceratometria máxima e espessura da córnea com as demais de interesse por coeficientes de correlação de Spearman, considerando o total da amostra (64 indivíduos) e os grupos caso e controle separadamente, dado que a maioria das medidas consideradas diferem entre os grupos. Para esta avaliação, consideramos as medidas em *fold induction* (Tabela 5).

Para o grupo controle, observamos relações significantes de ceratometria máxima com IL-8 córnea (correlação fraca e positiva, coeficiente 0,369) e com IL-8- BC (correlação fraca e positiva, coeficiente 0,388). Para espessura da córnea, observamos relação significativa com VIP – córnea (correlação positiva e fraca, coeficiente de 0,350).

Para o grupo caso, observamos relações significantes de ceratometria máxima com CCL-2 diferença do gene de interesse em relação ao de referência-córnea (correlação moderada e negativa, coeficiente -0,497) e com IL-8 BC (correlação moderada e negativa, coeficiente -0,412). Neste grupo a paquimetria não foi estatisticamente significativa em nenhuma das variáveis estudadas.

Tabela 5. Correlação entre medidas de topografia, paquimetria e as medidas de interesse (*fold induction*)

		Controle		Caso	
		Ceratometria máxima Topografia	Espessura da córnea	Ceratometria máxima Topografia	Espessura da córnea
Buffy coat	Coeficiente	-0,058	-0,235	0,160	0,049
	Valor-p	0,752	0,196	0,445	0,814
	n	32	32	25	26
VIP córnea	Coeficiente	0,015	0,350	-0,077	0,042
	Valor-p	0,935	0,050	0,715	0,832
	n	32	32	25	28
NPY córnea	Coeficiente	-0,013	-0,256	-0,272	0,240
	Valor-p	0,944	0,157	0,189	0,218
	n	32	32	25	28
CCL-2 córnea	Coeficiente	0,331	-0,035	-0,497	0,253
	Valor-p	0,064	0,848	0,016	0,212
	n	32	32	23	26
CCL-5 córnea	Coeficiente	-0,145	0,175	-0,241	0,127
	Valor-p	0,444	0,354	0,257	0,529
	n	30	30	24	27
IL-8 córnea	Coeficiente	0,369	-0,030	-0,072	-0,043
	Valor-p	0,038	0,869	0,731	0,828
	n	32	32	25	28
IL-6 córnea	Coeficiente	0,158	0,097	0,095	0,231
	Valor-p	0,386	0,597	0,650	0,237
	n	32	32	25	28
VIP-BC	Coeficiente	-0,076	0,155	0,196	-0,016
	Valor-p	0,677	0,397	0,347	0,934
	n	32	32	25	28
NPY-BC	Coeficiente	0,252	-0,041	-0,374	0,113
	Valor-p	0,165	0,823	0,066	0,568
	n	32	32	25	28
CCL-2-BC	Coeficiente	0,197	0,035	-0,326	-0,022
	Valor-p	0,279	0,851	0,112	0,910
	n	32	32	25	28
CCL-5-BC	Coeficiente	0,145	-0,041	0,012	-0,200
	Valor-p	0,430	0,823	0,957	0,327
	n	32	32	23	26
IL-8-BC	Coeficiente	0,388	-0,138	-0,412	0,001
	Valor-p	0,028	0,453	0,041	0,996
	n	32	32	25	28
IL-6-BC	Coeficiente	-0,043	0,288	-0,097	-0,114
	Valor-p	0,817	0,116	0,645	0,562
	n	31	31	25	28

Coeficientes de correlação de Spearman. Quanto mais próximo de -1 (correlação negativa e perfeita), mais intenso o vermelho e quanto mais próximo de +1 (correlação positiva e perfeita), mais intenso o azul. Valores em negrito foram significantes no teste de igualdade do coeficiente a zero. BC: *buffy coat*; CCL: ligante de quimiocina CC; IL: interleucina; NPY: neuropeptídeo Y; VIP: peptídeo vasoativo intestinal.

4 DISCUSSÃO

Ceratocone é doença de etiologia desconhecida, possivelmente multifatorial com associação de fatores ambientais, biomecânicos, bioquímicos e genéticos. Os estudos não são assertivos quanto ao gênero já que há grandes diferenças metodológicas entre eles.^(5,6,8,10) Nosso estudo demonstrou leve predileção pelo gênero masculino nos grupos estudados, porém sem significância estatística, assim como encontrado na literatura. Outro fator que podemos levar em consideração é a obesidade. Há relatos na literatura que indivíduos obesos têm uma tendência de maior inflamação, propensão a infecções, e comorbidades em geral.⁽²⁸⁾

Embora ainda não esteja bem consolidada, a descrição da correlação entre obesidade e KC vem sendo estudada. Nossos resultados mostram indivíduos do grupo KC com obesidade e sobrepeso maiores que no grupo controle com significância estatística. Acreditamos ser este o primeiro estudo que correlaciona obesidade e KC no Brasil. Outros autores também descrevem obesidade em pacientes com KC, como Pihlblad et al.⁽²⁹⁾ Recentemente um estudo populacional com adolescentes israelenses identificou maior chance de desenvolver KC naqueles com sobrepeso ou obesidade.⁽¹⁵⁾ Entretanto autores de outro estudo populacional na Turquia, não evidenciaram diferença no índice de massa corporal (IMC) entre os grupos KC e controle.⁽³⁰⁾ Postula-se que obesidade poderia vir a ser fator de risco para desenvolver KC em pacientes predispostos especialmente por alteração na elastina tarsal, levando a frouxidão na pele palpebral, alteração na sua função e irritação mecânica da córnea.⁽²⁹⁾ Um ambiente pró-inflamatório com resposta imune prejudicada são descritas com o acúmulo de tecido adiposo⁽²⁸⁾ e poderiam estar relacionadas na patogênese do KC.

No nosso estudo, pacientes com relato de outras doenças no grupo KC foi estatisticamente significante quando comparado ao grupo controle. Destaca-se a presença de alergia respiratória e doença psiquiátrica (depressão e ansiedade). Alergia respiratória isoladamente não apresentou significância estatística, assim como no estudo de Woodward et al.⁽³¹⁾ Sua frequente presença em pacientes com KC pode estar subdiagnosticada devido à baixa repercussão clínica que não requer tratamento contínuo. Entretanto é muito frequente o ato de coçar os olhos nos pacientes com KC e este está associado à progressão da doença⁽⁶⁾ e a alergia.^(6,18,31,32) Lema et al. descrevem que 64,3% da amostra com KC admite coçar os olhos de forma vigorosa e

frequente, conquanto negativa no seu grupo controle.⁽¹⁸⁾ Sharma et al. descreveram a forte relação entre alergia ocular e progressão do KC.⁽²⁰⁾ Mas é importante lembrarmos que o processo inflamatório gera uma sequência de eventos bioquímicos e acúmulo de células imunes, o qual pode gerar um desconforto local e coceira consequentemente.

O KC pode ser classificado de várias maneiras. A classificação mais aceita é a de Amsler-Krumeich, dividida em 4 estágios, e leva em consideração a refração (miopia e astigmatismo), ceratometria central (K), paquimetria, e presença ou não de cicatriz na córnea.⁽¹²⁾ Nosso estudo não fez estadiamento do KC, mas mediu ceratometria máxima (Kmax), que foi estatisticamente significante quando comparado ao grupo controle, assim como a paquimetria mínima.^(4,5,8)

Ceratocone é uma doença descrita como não inflamatória, e na sua etiologia ainda desconhecida, hipotetiza-se a influência de inflamação.⁽⁸⁾ Sem sabermos se há repercussão sistêmica vemos alguns estudos, assim como o nosso, investigando amostras de sangue.

A razão de linfócitos e neutrófilos (NLR) fornece um número que pode ser preditor de doença inflamatória.⁽²⁷⁾ Karaca et al.⁽²⁷⁾ descreveram resultado estatisticamente significante em pacientes com KC, assim como Oltulu et al.,⁽³³⁾ mas diferentemente do nosso estudo em que não houve diferença estatística, assim como encontrado por Bozkurt et al.⁽³⁴⁾

Córnea com ceratocone tem nervos mais facilmente visíveis ao exame biomicroscópico. Os nervos liberam neuropeptídeos, que contribuem na homeostase e processo de cicatrização da córnea.^(1,35)

Em nosso estudo, os neuropeptídeos VIP e NPY estão aumentados no sangue dos pacientes com KC. Não foram encontrados na literatura artigos que correlacionam amostras de sangue, neuropeptídeos e KC.^(24,26,35,36) Entretanto, há relato de maior concentração de NPY sanguíneo com obesidade em estudos com ratos. NPY pode ser produzido por adipócitos, e no tecido adiposo pode participar mediador autócrino, parácrino ou endócrino. O neuropeptídeo NPY promove diferenciação de adipócitos e acúmulo de gordura no metabolismo de tecido adiposo branco.⁽³⁷⁾

Nas amostras de epitélio da córnea não houve significância estatística para os neuropeptídeos. O neuropeptídeo VIP foi observado em maior quantidade em botões de córnea por Sacchetti et al.⁽²⁴⁾ diferentemente do nosso estudo do qual não houve aumento, no entanto o material estudado foi epitélio da córnea.

Neuropeptídeo VIP é conhecido por exercer ação anti-inflamatória pela inibição de quimiocinas pró-inflamatórias, como CCL-2 e 5.⁽²⁶⁾ Conforme publicação de Mantelli et al., os neuropeptídeos nas mucosas poderiam estar envolvidos no processo de inflamação local pelo mecanismo de inflamação neurogênica, que é quando um estímulo para liberação dos neuromediadores locais promove produção e liberação local de citocinas e quimiocinas.⁽²⁵⁾

As quimiocinas apresentam papel regulatório na resposta inflamatória e na homeostase.⁽³⁸⁾ Demonstramos que a quimiocina CCL-2 tem maior expressão no grupo controle, tanto para amostras de epitélio da córnea quanto para amostras de sangue. Ebihara et al. descreveram possível associação de condições inflamatórias oculares após descreverem expressão de CCL-2 no epitélio de córneas normais e em culturas de ceratócitos, assim como a interação com seus receptores pelas camadas da córnea.⁽³⁹⁾ Mais recentemente Villarreal-Ponce et al. publicaram a influência de CCL-2 no processo de reparação tecidual sugerindo que sua ausência atrasa o mecanismo de cicatrização.⁽⁴⁰⁾ Assim inferimos que a diminuição de CCL-2 poderia alterar a cascata de reparação tecidual nos pacientes com KC.

A CCL-5 aumentada com significância estatística na córnea de pacientes com KC pode indicar inflamação local, já que esta quimiocina está relacionada a vários processos inflamatórios, tais como angiogênese, câncer, inflamação de vias aéreas e artrite reumatoide.⁽⁴¹⁾ Na literatura há descrição de CCL-5 na lágrima,⁽²²⁾ mas não na córnea, sendo este o primeiro a relatar esta quimiocina localmente. Quando comparadas CCL-5 em amostras de sangue de pacientes com KC com controles saudáveis, não foi encontrada significância estatística, contrariamente ao nosso estudo em que CCL-5 está presente de maneira significativa no grupo controle.⁽²²⁾

Além das quimiocinas, as interleucinas também estão descritas no filme lacrimal de estudos com KC.^(18,32,33)

Interleucina-6 é uma das mais estudadas em KC especialmente em amostras de lágrima. É reguladora de MMP-9 cuja ação exerce influência na estrutura da matriz de colágeno presente na córnea e cuja degradação parece fazer parte da fisiopatogenia do KC.⁽⁸⁾ No nosso estudo não houve significância estatística no sangue ou na córnea, embora esteja aumentado nesta. A IL-6 atua na cascata de inflamação e induz a expressão de CCL-2 e IL-8.⁽⁴²⁾

Contrariamente a Spandau et al.,⁽⁴³⁾ nosso estudo mostra concentrações de CCL-5 e IL-8 no epitélio da córnea de ambos os grupos, porém

aumentada com significância estatística nos pacientes com KC. Interleucina-8 é sintetizada por células do epitélio da córnea em resposta à inflamação local.⁽¹⁾ Foi descrita ainda como componente ligado à resposta alérgica.⁽⁴⁴⁾ Concentrações de IL-8 aumentadas na córnea e no sangue de pacientes com KC, nos permite inferir sobre doença sistêmica, com sítio de ação atuante nos olhos. A obesidade poderia ser o estímulo pelo qual a inflamação pode se perpetuar (ou ser redundante) pela ação do IL-8.^(45,46)

6 CONCLUSÕES

1. Nosso estudo demonstrou no epitélio da córnea as quimiocinas CCL-5 aumentada com significância estatística no grupo de estudo assim como interleucina-8 (IL-8);
2. Os achados das amostras de sangue têm aumento significativo para interleucina-8 (IL-8) no grupo de estudo que nos permite inferir sobre possibilidade de doença sistêmica com possível ação ou repercussão na córnea;
3. A razão entre neutrófilos linfócitos não apresentou diferença entre os grupos estudados.

7 REFERÊNCIAS

1. Dartt DA, Dana R, D'Amore P, Niederkorn J. Immunology, inflammation and diseases of the eye. San Diego: Elsevier; 2011.
2. Shaheen BS, Bakir M, Jain S. Corneal nerves in health and disease. *Surv Ophthalmol*. 2014;59(3):263-85.
3. Volatier TL, Figueiredo FC, Connon CJ. Keratoconus at a molecular level: a review. *Anat Rec (Hoboken)*. 2020;303(6):1680-8.
4. Feder RS, Kshettry P. Noninflammatory ectatic disorders. In: Krachmer JH, Mannis MJ, Holland EJ, editors. *Cornea*. Vol 1. 2nd ed. Philadelphia: Elsevier; 2005.
5. Rabinowitz YS. Keratoconus. *Surv Ophthalmol*. 1998;42(4):297-319.
6. Gomes JA, Tan D, Rapuano CJ, Belin MW, Ambrósio R Jr, Guell JL, et al.; Group of Panelists for the Global Delphi Panel of Keratoconus and Ectatic Diseases. Keratoconus and ectatic diseases: global consensus. *Cornea*. 2015;34(4):359-69.
7. Davidson AE, Hayes S, Hardcastle AJ, Tuft SJ. The pathogenesis of keratoconus. *Eye (Lond)*. 2014;28(2):189-95.
8. Galvis V, Sherwin T, Tello A, Merayo J, Barrera R, Acera A. Keratoconus: an inflammatory disorder? *Eye (Lond)*. 2015;29(7):843-59.
9. Khaled ML, Helwa I, Drewry M, Seremwe M, Estes A, Liu Y. Molecular and histopathological changes associated with keratoconus. *BioMed Res Int*. 2017;2017:7803029.
10. Ferrari G, Rama P. The keratoconus enigma: A review with emphasis on pathogenesis. *Ocul Surf*. 2020;18(3):363-73.
11. Mas Tur V, MacGregor C, Jayaswal R, O'Brart D, Maycock N. A review of keratoconus: Diagnosis, pathophysiology, and genetics. *Surv Ophthalmol*. 2017;62(6):770-83.
12. Krumeich JH, Daniel J, Knülle A. Live-epikeratophakia for keratoconus. *J Cataract Refract Surg*. 1998;24(4):456-63.
13. Rabinowitz YS, Yang H, Brickman Y, Akkina J, Riley C, Rotter JI, et al. Videokeratography database of normal human corneas. *Br J Ophthalmol*. 1996;80(7):610-6.
14. Navel V, Malecaze J, Pereira B, Baker JS, Malecaze F, Sapin V, et al. Oxidative and antioxidative stress markers in keratoconus: a systematic review and meta-analysis. *Acta Ophthalmol*. 2021;99(6):e777-94.
15. Eliasi E, Bez M, Megreli J, Avramovich E, Fischer N, Barak A, et al. The association between keratoconus and body mass index: a population-based cross-sectional study among half a million adolescents. *Am J Ophthalmol*. 2021;224:200-6.
16. Wisse RP, Kuiper JJ, Gans R, Imhof S, Radstake TR, Van der Lelij A. Cytokine expression in keratoconus and its corneal microenvironment: a systematic review. *Ocul Surf*. 2015;13(4):272-83.
17. Balasubramanian SA, Mohan S, Pye DC, Willcox MD. Proteases, proteolysis and inflammatory molecules in the tears of people with keratoconus. *Acta Ophthalmol*. 2012;90(4):e303-9.
18. Lema I, Durán JA. Inflammatory molecules in the tears of patients with keratoconus. *Ophthalmology*. 2005;112(4):654-9.
19. Seppälä HP, Määttä M, Rautia M, Mackiewicz Z, Tuisku I, Tervo T, et al. EMMPRIN and MMP-1 in keratoconus. *Cornea*. 2006;25(3):325-30.

20. Sharma N, Rao K, Maharana PK, Vajpayee RB. Ocular allergy and keratoconus. *Indian J Ophthalmol.* 2013;61(8):407-9.
21. Ghosh A, Zhou L, Ghosh A, Shetty R, Beuerman R. Proteomic and gene expression patterns of keratoconus. *Indian J Ophthalmol.* 2013;61(8):389-91.
22. Jun AS, Cope L, Speck C, Feng X, Lee S, Meng H, et al. Subnormal cytokine profile in the tear fluid of keratoconus patients. *PLoS One.* 2011;6(1):e16437.
23. Kurpakus Wheeler M, Kernacki KA, Hazlett LD. Corneal cell proteins and ocular surface pathology. *Biotech Histochem.* 1999;74(3):146-59.
24. Sacchetti M, Scorgia V, Lambiase A, Bonini S. Preliminary evidence of neuropeptides involvement in keratoconus. *Acta Ophthalmol.* 2015;93(4):e315-6.
25. Mantelli F, Micera A, Sacchetti M, Bonini S. Neurogenic inflammation of the ocular surface. *Curr Opin Allergy Clin Immunol.* 2010;10(5):498-504.
26. Sabatino F, Di Zazzo A, Simone L, Bonini S. The intriguing role of neuropeptides at the ocular surface. *Ocul Surf.* 2017;15(1):2-14.
27. Karaca EE, Özmen MC, Ekici F, Yüksel E, Türkoğlu Z. Neutrophil-to-lymphocyte ratio may predict progression in patients with keratoconus. *Cornea.* 2014;33(11):1168-73.
28. Nyambuya TM, Dlodla PV, Mxinwa V, Nkambule BB. Obesity-induced inflammation and insulin resistance: a mini-review on T-cells. *Metabol Open.* 2019;3:100015.
29. Pihlblad MS, Schaefer DP. Eyelid laxity, obesity, and obstructive sleep apnea in keratoconus. *Cornea.* 2013;32(9):1232-6.
30. Gencer B, Ozgurhan EB, Kara S, Tufan HA, Arikan S, Bozkurt E, et al. Obesity and obstructive sleep apnea in patients with keratoconus in a Turkish population. *Cornea.* 2014;33(2):137-40.
31. Woodward MA, Blachley TS, Stein JD. The association between sociodemographic factors, common systemic diseases, and keratoconus: an analysis of a nationwide health care claims database. *Ophthalmology.* 2016;123(3):457-65.e2.
32. Balasubramanian SA, Pye DC, Willcox MD. Effects of eye rubbing on the levels of protease, protease activity and cytokines in tears: relevance in keratoconus. *Clin Exp Optom.* 2013;96(2):214-8.
33. Oltulu R, Katipoğlu Z, Gündoğan AO, Mirza E, Belviranlı S. Evaluation of inflammatory biomarkers in patients with keratoconus. *Eur J Ophthalmol.* 2022;32(1):154-9.
34. Bozkurt E, Ucak T. Serum inflammation biomarkers in patients with keratoconus. *Ocul Immunol Inflamm.* 2021;29(6):1164-7.
35. Jiang X, McClellan SA, Barrett RP, Zhang Y, Foldenauer ME, Hazlett LD. The role of VIP in cornea. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2012;53(12):7560-6.
36. Sacchetti M, Micera A, Lambiase A, Speranza S, Mantelli F, Petrachi G, et al. Tear levels of neuropeptides increase after specific allergen challenge in allergic conjunctivitis. *Mol Vis.* 2011;17:47-52.
37. Boura-Halfon S, Pecht T, Jung S, Rudich A. Obesity and dysregulated central and peripheral macrophage-neuron cross-talk. *Eur J Immunol.* 2019;49(1):19-29.
38. Palomino DC, Marti LC. Chemokines and immunity. *einstein (São Paulo).* 2015;13(3):469-73.
39. Ebihara N, Yamagami S, Yokoo S, Amano S, Murakami A. Involvement of C-C chemokine ligand 2-CCR2 interaction in monocyte-lineage cell recruitment of normal human corneal stroma. *J Immunol.* 2007;178(5):3288-92.

40. Villarreal-Ponce A, Tiruneh MW, Lee J, Guerrero-Juarez CF, Kuhn J, David JA, et al. Keratinocyte-macrophage crosstalk by the Nrf2/Ccl2/EGF signaling axis orchestrates tissue repair. *Cell Rep.* 2020;33(8):108417.
41. Marques RE, Guabiraba R, Russo RC, Teixeira MM. Targeting CCL5 in inflammation. *Expert Opin Ther Targets.* 2013;17(12):1439-60.
42. Wang XM, Hamza M, Wu TX, Dionne RA. Upregulation of IL-6, IL-8 and CCL2 gene expression after acute inflammation: correlation to clinical pain. *Pain.* 2009;142(3):275-83.
43. Spandau UH, Toksoy A, Verhaart S, Gillitzer R, Kruse FE. High expression of chemokines Gro-alpha (CXCL-1), IL-8 (CXCL-8), and MCP-1 (CCL-2) in inflamed human corneas in vivo. *Arch Ophthalmol.* 2003;121(6):825-31.
44. Castellani ML, De Lutiis MA, Toniato E, Conti F, Felaco P, Fulcheri M, et al. Impact of RANTES, MCP-1 and IL-8 in mast cells. *J Biol Regul Homeost Agents.* 2010;24(1):1-6.
45. Strackowski M, Dzienis-Strackowska S, Stêpień A, Kowalska I, Szelachowska M, Kinalska I. Plasma interleukin-8 concentrations are increased in obese subjects and related to fat mass and tumor necrosis factor-alpha system. *J Clin Endocrinol Metab.* 2002;87(10):4602-6.
46. Akhter N, Wilson A, Thomas R, Al-Rashed F, Kochumon S, Al-Roub A, et al. ROS/TNF- α Crosstalk triggers the expression of IL-8 and MCP-1 in human monocytic THP-1 cells via NF- κ B and ERK1/2 mediated signaling. *Int J Mol Sci.* 2021;22(19):10519.

Abstract

Introduction: Recent studies have been presented inflammatory features on keratoconus. Many inflammatory markers are described on tears of patients with keratoconus. The KC pathogenesis is still unknown, however environmental and genetics issues may be part of this disease evolution. In addition, some systemic features such as allergy and obesity seem to be related to the progression of KC. **Purpose:** To evaluate the neuropeptides vasoactive intestinal peptide (VIP) and neuropeptide Y (NPY), chemokines ligand 2 (CCL-2) and 5 (CCL-5), and interleukins 6 (IL-6) and 8 (IL-8) on corneal epithelial cells and blood of patients with KC and healthy controls. The neutrophil-to-lymphocyte ratio (NLR) was evaluated to predict inflammation. **Methods:** This was a prospective observational study including 32 KC patients who underwent corneal crosslinking (CXL) and 32 control patients who underwent photorefractive keratectomy (PRK). Patients' corneal epithelial cells removed surgically, and blood (buffy coat) were analyzed. The samples in triplicate were evaluated on rt-PCR for neuropeptides (VIP e NPY), interleukin-6 (IL-6) and chemokines (CCL-2, CCL-5 and IL-8). **Results:** Our study showed statistically higher CCL-5 and IL-8 on corneal epithelial cells in patients with KC. Blood cells were statistically higher in VIP, NPY and IL-8 in KC's group, and statistically lower in patients with KC compared with controls for CCL-2 and CCL-5. NLR showed no difference between the groups. **Conclusions:** Our data support findings of other studies that suggested the alteration of KC status such as inflammatory corneal disease. The presence of IL-8 at cornea and blood samples of KC's group suggests systemic disease with a possible local or repercussion action. Further studies are warranted to elucidate KC pathogenesis and its correlation to systemic disease.

Keywords: Keratoconus; Neuropeptides; Chemokines; Inflammation; Cornea

Apêndices

Apêndice 1. Outros resultados das amostras sanguíneas

Tabela 1. Outros resultados das amostras sanguíneas

	Grupo		Valor-p
	Controle	Caso	
WBC			0,510 t
Média (desvio-padrão)	7,8 (1,9)	7,5 (1,6)	
Mediana (1º; 3º quartil)	7,6 (6,6; 9,3)	7,6 (6,4; 8,2)	
Mínimo; máximo (n)	4,4; 11,7 (32)	4,6; 11,5 (32)	
RBC			0,076 t
Média (desvio-padrão)	4,9 (0,5)	5,1 (0,5)	
Mediana (1º; 3º quartil)	4,9 (4,6; 5,2)	5,0 (4,6; 5,5)	
Mínimo; máximo (n)	4,1; 5,9 (32)	4,2; 6,4 (32)	
HGB			0,470 t
Média (desvio-padrão)	14,6 (1,6)	14,8 (1,3)	
Mediana (1º; 3º quartil)	14,7 (13,1; 15,6)	14,8 (13,9; 15,8)	
Mínimo; máximo (n)	12,2; 18,3 (32)	12,3; 17,2 (32)	
HCT			0,354 m
Média (desvio-padrão)	43,8 (9,6)	43,9 (4,5)	
Mediana (1º; 3º quartil)	42,8 (38,9; 45,4)	43,8 (40,6; 45,7)	
Mínimo; máximo (n)	36,2; 91,7 (32)	36,5; 60,5 (32)	
MCV			0,586 m
Média (desvio-padrão)	49,4 (71,5)	45,7 (75,1)	
Mediana (1º; 3º quartil)	86,9 (65,2; 89,4)	86,2 (0,6; 88,1)	
Mínimo; máximo (n)	-85,7; 91,7 (32)	-84,6; 115,2 (32)	
MCH			0,063 m
Média (desvio-padrão)	31,7 (10,1)	29,3 (1,4)	
Mediana (1º; 3º quartil)	30,2 (29,0; 31,1)	29,2 (28,4; 30,5)	
Mínimo; máximo (n)	27,0; 86,4 (32)	26,7; 31,7 (32)	
MCHC			0,310 m
Média (desvio-padrão)	34,4 (1,3)	33,9 (1,8)	
Mediana (1º; 3º quartil)	34,5 (33,5; 35,0)	34,3 (33,4; 34,7)	
Mínimo; máximo (n)	31,0; 37,3 (32)	26,4; 36,5 (32)	
PLT			0,893 m
Média (desvio-padrão)	240,6 (77,8)	242,3 (62,6)	
Mediana (1º; 3º quartil)	246,0 (206,5; 289,0)	251,5 (198,0; 278,5)	
Mínimo; máximo (n)	12,8; 379,0 (32)	105,0; 386,0 (32)	
MXD%			0,373 m
Média (desvio-padrão)	9,5 (6,6)	9,0 (2,4)	
Mediana (1º; 3º quartil)	8,1 (5,4; 10,3)	9,3 (6,9; 10,9)	
Mínimo; máximo (n)	4,4; 32,7 (20)	4,5; 12,6 (10)	
MXD#			0,350 m
Média (desvio-padrão)	0,7 (0,5)	0,8 (0,3)	

continua...

...continuação

Mediana (1º; 3º quartil)	0,6 (0,5; 0,9)	0,8 (0,5; 0,9)	
Mínimo; máximo (n)	0,3; 2,2 (20)	0,4; 1,3 (10)	
RDW-SD			0,069 m
Média (desvio-padrão)	40,6 (7,1)	38,5 (13,9)	
Mediana (1º; 3º quartil)	41,6 (40,0; 43,2)	41,1 (38,3; 42,5)	
Mínimo; máximo (n)	3,4; 45,0 (32)	-35,2; 55,1 (32)	
RDW-CV			0,183 m
Média (desvio-padrão)	13,7 (5,4)	12,7 (0,6)	
Mediana (1º; 3º quartil)	12,9 (12,4; 13,3)	12,6 (12,2; 13,0)	
Mínimo; máximo (n)	11,7; 43,4 (32)	11,8; 14,4 (32)	
MPV			0,316 m
Média (desvio-padrão)	9,2 (4,8)	9,5 (4,9)	
Mediana (1º; 3º quartil)	10,4 (9,8; 11,0)	10,6 (9,8; 11,4)	
Mínimo; máximo (n)	-8,9; 11,9 (32)	-8,9; 13,1 (32)	

HCT: hematócrito; HGB: hemoglobina; MCH: hemoglobina corpuscular média; MCHC: concentração de hemoglobina corpuscular média; MCV: volume corpuscular médio; MPV: volume plaquetário médio; MXD: contagem de células mistas; PLT: plaqueta; RBC: *red blood cells*; RDW: *red cell distribution width*; WBC: *white blood cells*; t: teste *t* de Student; m: teste de Mann-Whitney.

Apêndice 2. Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido Pacientes com idade $\geq$ 18 anos

Introdução

Você foi convidado (a) para participar voluntariamente do estudo intitulado: “**Estudo dos neuropeptídeos do epitélio da córnea em pacientes com e sem ceratocone**”. Se você decidir fazer parte dele, precisará saber das possibilidades de riscos e benefícios e confirmar sua participação através do termo de consentimento livre e esclarecido.

Este documento esclarece sobre o estudo que você deseja participar. Se você tiver qualquer pergunta, por favor, sinta-se à vontade para entrar em contato com o médico responsável pela condução do estudo ou com algum profissional que participa do estudo e que possa esclarecer suas dúvidas.

A decisão de fazer parte do estudo é **voluntária** e você pode recusar ou retirar-se do estudo a qualquer momento sem nenhum tipo de consequência para o seu tratamento. O objetivo dessa pesquisa é avaliar moléculas da camada mais superficial da córnea em pacientes com ceratocone e sem ceratocone e buscar associações com sangue que possam estar correlacionadas.

Procedimentos realizados neste protocolo

Você será incluído (a) após aceitar participar do estudo. Serão avaliadas as células da córnea que serão retiradas pelo(a) seu(sua) médico(a) e que seriam descartadas, ou seja, faz parte da técnica cirúrgica anteriormente proposta para você sem qualquer modificação (Crosslinking de colágeno para fortalecer as pontes de colágeno da córnea - se você for portador de ceratocone; ou cirurgia fotorrefrativa ou PRK se você for corrigir a miopia e/ou o astigmatismo).

Será retirada amostra de sangue de 20mL, imediatamente antes de realização do procedimento cirúrgico proposto, para complementar o estudo da córnea.

Todas as amostras serão enviadas ao HIAE para análise laboratorial. Os dados serão processados pela equipe e passarão por análise estatística. Não serão necessárias visitas seguintes, exceto as já programadas na sua rotina oftalmológica, com o(a) médico(a) com quem as faz rotineiramente, ou seja, o pós-operatório de rotina.

Ou seja, as amostras serão colhidas na Eye Clinic e serão enviadas ao Hospital Albert Einstein para análise. O pós-operatório será conduzido na Eye Clinic pela equipe médica, sem qualquer alteração.

Riscos e inconveniências

Você poderá sentir desconforto durante a retirada da amostra de sangue e poderá se formar um hematoma no local da retirada.

A coleta do raspado da córnea ocorrerá de acordo com o método indicado por seu(sua) médico(a) cirurgião(ã) e poderá causar irritação e/ou incômodo local, que não interferem na sua recuperação ou no seu prognóstico e serão tratados com medicações tópicas (colírios) e sistêmicas (comprimidos).

Benefício do tratamento

Não há benefício direto ao participar desta pesquisa. Entretanto sua participação contribuirá a médio e/ou longo prazo para ampliar os conhecimentos médicos na área de Oftalmologia.

Alternativa (s) à participação no estudo

Nada mudará no seu seguimento oftalmológico, seja no tratamento clínico ou cirúrgico, caso você não queira participar deste estudo.

Direitos do participante

Sua participação é voluntária e você pode retirar seu consentimento ou ainda descontinuar sua participação em qualquer momento, se o assim o preferir, sem penalização e/ou prejuízo de qualquer natureza. Não haverá nenhum custo a você proveniente deste estudo, assim como não haverá qualquer tipo de remuneração pela sua participação. Ao assinar este termo você não abre mão de nenhum direito legal.

Danos à Saúde

Se uma lesão ou qualquer dano à saúde ocorrer como comprovado resultado de sua participação nesta pesquisa, assistência integral estará disponível sem que você tenha gastos.

Indenização

Se você sofrer algum dano ou doença, previsto ou não neste termo de consentimento e relacionado com sua participação no estudo, os pesquisadores responsáveis do estudo pagarão as despesas médicas necessárias e decorrentes do tratamento, pelo tempo que for necessário. A equipe do estudo deverá ser notificada o mais rápido possível. Os pesquisadores garantem assistência integral gratuita e imediata.

Você não renunciará a quaisquer de seus direitos legais ao assinar este termo de consentimento, incluindo o direito de pedir indenização por danos resultantes de sua participação no estudo.

Confidencialidade

A equipe do estudo e a equipe assistencial terão acesso a seus dados, no entanto, seu anonimato é garantido e possíveis publicações científicas resultantes deste estudo não o (a) identificará em nenhuma circunstância como participante. Os dados obtidos serão tratados sob estritas condições de confidencialidade.

Os seus dados também poderão ser compartilhadas com os seguintes grupos/pessoas associadas a este estudo de pesquisa ou envolvidos na revisão de pesquisas: outros funcionários da equipe de pesquisa dos Pesquisador Responsável, equipe do Centro de Pesquisa Clínica, o Comitê de Ética em Pesquisa e o Departamento Jurídico; e também os representantes do governo ou agências federais, quando exigido por lei. Caso surjam novas informações que possam ser importantes à sua decisão de continuar na pesquisa, você ou seu representante legal serão informados assim que os dados estejam disponíveis.

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Albert Einstein (CEP), cuja função é o de aprovar os estudos envolvendo seres humanos.

Para qualquer dúvida geral e/ou relacionada a direitos do participante (direito a informação clara, relacionado a custos, acompanhamento médico e hospitalar em caso de danos decorrentes da participação na pesquisa, confidencialidade de dados, acesso a resultados), entrar em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Albert Einstein localizado na Av. Albert Einstein, 627/701 - Morumbi, CEP: 05652-900, São Paulo, SP no telefone (11) 2151-3729/ e-mail cep@einstein.br.

Para qualquer dúvida relacionada ao estudo, por favor, sinta-se a vontade para entrar em contato com os médicos responsáveis pela condução do estudo, **Dra. Junia C. Marques** no telefone: **(11)3884-2020**.

Reclamações, elogios e sugestões deverão ser encaminhados ao Sistema de Atendimento ao Cliente (SAC) por meio do telefone (11) 2151-0222 ou formulário identificado como “fale conosco” disponível na página da pesquisa clínica ou pessoalmente.

Entendo também que o material coletado será usado exclusivamente para responder as perguntas dessa pesquisa e para garantir minha segurança. Após a realização destes testes o material coletado será descartado.

Assinaturas de Consentimento

Fui informado de todos os detalhes relacionados ao estudo ao qual serei submetido.

Receberei uma via assinada e datada deste Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

Nome Completo do participante da pesquisa	
	Data: ____ / ____ / ____
Assinatura do participante da pesquisa	

Nome completo e legível do pesquisador responsável	
	Data: ____ / ____ / ____
Assinatura do pesquisador responsável	

Nome completo do representante legal	
	Data: ____ / ____ / ____
Assinatura do representante legal	
Relação do representante legal com o paciente	

Apêndice 3. Graduação topográfica dos pacientes do grupo de estudo baseado nos padrões de Rabinowitz

Imagem topográfica	n
Encurvado inferior	15
Gravata borboleta assimétrica com eixos radiais inclinados	8
Gravata borboleta assimétrica com maior curvatura inferior	4
Oval	3
Gravata borboleta assimétrica com maior curvatura superior	1
Irregular	1

Fonte: Baseado em Rabinowitz YS, Yang H, Brickman Y, Akkina J, Riley C, Rotter JI, et al. Videokeratography database of normal human corneas. Br J Ophthalmol. 1996;80(7):610-6.