

Paulo Henrique Gonçalves Escarião



**ANÁLISE DE CITOCINAS, QUIMIOCINAS E FATORES DE CRESCIMENTO
EM ENDOFTALMITE INFECCIOSA AGUDA PÓS-FACECTOMIA**



Universidade Federal de Pernambuco
Centro de Ciências da Saúde
Programa de Pós-Graduação em Cirurgia

Paulo Henrique Gonçalves Escarião

ANÁLISE DE CITOCINAS, QUIMIOCINAS E FATORES DE CRESCIMENTO EM ENDOFTALMITE INFECCIOSA AGUDA PÓS-FACECTOMIA

Tese apresentada ao Colegiado do Programa de Pós-Graduação em Cirurgia do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Pernambuco, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Cirurgia.

Orientador

Dr. Carlos Teixeira Brandt

Prof. Titular do Depto de Cirurgia, CCS-UFPE

Coorientadora

Dra. Célia M. Machado Barbosa de Castro

Profa. de Microbiologia e Imunologia, CCS-UFPE

Linha de Pesquisa:

Infecção em cirurgia

Ficha catalográfica elaborada pela
Bibliotecária: Mônica Uchôa. CRBA-1010

O58c Escarião, Paulo Henrique Gonçalves

Análise de citocinas, quimiocinas e fatores de crescimento em endoftalmite infecciosas aguda pós-facectomia / Paulo Henrique Gonçalves Escarião. – 2014.

74 f.: il.; tab.; 30 cm.

Orientador: Carlos Teixeira Brandt

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco, CCS. Programa de Pós-Graduação em Cirurgia. Recife, 2014.

Inclui referências, apêndices e anexos.

1. Facectomia. 2. Endoftalmite infecciosa. 3. Infecção. I. Brandt, Carlos Teixeira (Orientador). II. Título.

612.665

CDD (23.ed)

UFPE (CCS2014-066)

"ANÁLISE DE CITOCINAS, QUIMIOCINAS E FATORES DE CRESCIMENTO EM ENDOFTALMITE INFECCIOSA AGUDA PÓS-FACECTOMIA".

PAULO HENRIQUE GONÇALVES ESCARIÃO

APROVADA EM: 12/02/2014

ORIENTADOR INTERNO: DRº. CARLOS TEIXEIRA BRANDT

COMISSÃO EXAMINADORA:

PROFº. DRº. SÍLVIO DA SILVA CALDAS NETO (PRESIDENTE). CCS/UFPE

PROFº. DRº. RODRIGO PESSOA CAVALCANTI LIRA - CCS/UFPE

PROFº. DRº. DIEGO NERY BENEVIDES GADELHA - CCS/UFPE

PROFº. DRº. TIAGO EUGÊNIO FÁRIA E ARANTES - FAV

PROFª. DRª. VIRGINIA LAURA LUCAS TORRES - UFPE

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIRURGIA**



REITOR

Prof. Anísio Brasileiro de Freitas Dourado

VICE-REITOR

Prof. Sílvio Romero de Barros Marques

PRÓ-REITOR PARA ASSUNTOS DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO

Prof. Francisco de Souza Ramos

CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

DIRETOR

Prof. Nicodemos Teles de Pontes Filho

HOSPITAL DAS CLÍNICAS

DIRETOR SUPERINTENDENTE

Prof. George da Silva Telles

DEPARTAMENTO DE CIRURGIA

CHEFE

Prof. Saulo Monteiro dos Santos

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIRURGIA

NÍVEL MESTRADO E DOUTORADO

COORDENADOR

Prof. Álvaro Antônio Bandeira Ferraz

VICE-COORDENADOR

Prof. José Lamartine de Andrade Aguiar

CORPO DOCENTE

Prof. Álvaro Antônio Bandeira Ferraz

Prof. Carlos Teixeira Brandt

Prof. Cláudio Moura Lacerda de Melo

Prof. Edmundo Machado Ferraz

Prof. Fábio de Oliveira Vilar

Prof. Fernando Ribeiro de Moraes Neto

Prof. José Lamartine de Andrade Aguiar

Prof. Josemberg Marins Campos

Prof. Lúcio Vilar Rabelo Filho

Profa. Magdala de Araújo Novaes

Prof. Salvador Vilar Correia Lima

Prof. Sílvio Caldas Neto

Dedico esta tese

*Aos meus queridos filhos, **Henrique** e **Marina**, pelo amor, carinho e paciência durante a realização desta pós-graduação. Que esta Tese seja um exemplo da importância da formação profissional.*

*À minha amada esposa, **Ana Cecília**, exemplo de caráter e bondade, pelo amor, carinho, incentivo e apoio sempre presente em nossas vidas.*

*Aos meus queridos pais, **Francisco Pojucan** e **Ana Heloísa**, por todos os ensinamentos dedicados a mim desde a infância e sempre terem propiciado um ambiente favorável para meu desenvolvimento educacional.*

*Ao meu irmão **Abelardo** e sua esposa **Andréia**, pela amizade e companheirismo.*

*Ao meu inesquecível avô, **Abelardo Gonçalves de Lima** (“in Memoriam”) pelas histórias de medicina contadas na infância que me fizeram chegar até aqui e pelo exemplo de conquistas ao trilhar novos caminhos.*

AGRADECIMENTOS

Ao **Prof. Dr. Carlos Teixeira Brandt**, Prof. Titular do Departamento de Cirurgia da UFPE, orientador desta tese e principal idealizador do estudo ao sugerir a idéia de avaliar citocinas em processos inflamatórios oculares. Grato pelos ensinamentos éticos e científicos dispensados a mim desde a Graduação em Medicina.

À **Profa. Dra Célia Castro e Profa. Fátima Diniz**, por toda ajuda científica do estudo e logística no armazenamento das citocinas no Laboratório de Imunopatologia Keiso Asami – LIKA.

Ao **Dr. Tiago Arantes** e à **Profa. Alessandra Commodaro** pelas contribuições e enriquecimento desta tese.

À **Universidade Federal de Pernambuco - UFPE**, por ter novamente participado da minha formação, agora como aluno do Programa de Pós-Graduação em Cirurgia.

Aos **pacientes** que confiaram nessa pesquisa e voluntariamente dispuseram-se a participar do estudo.

Aos **Drs. Liana e Marcelo Ventura** e **Drs. Elani e Ronald Cavalcanti**, por todo o aprendizado e incentivo científico e pelo apoio a esta pesquisa. Ajudaram na minha formação como oftalmologista e sempre incentivaram a participação de suas instituições em pesquisas científicas.

À **Fundação Altino Ventura** e **Hospital de Olhos de Pernambuco**, fonte dos pacientes participantes deste estudo e local onde realizei minha residência em oftalmologia.

A todos os **residentes da Fundação Altino Ventura**, nominalmente ao **Dr. Vasco Bravo Filho** e **Dr. Flávio Bezerra**, por terem ajudado na captação dos pacientes.

A **Kátia Liu**, chefe do bloco cirúrgico da Fundação Altino Ventura, por toda participação na coleta do material para análise.

A **Roberta Facioli**, biomédica, e ao **Laboratório Science Pro** em São Paulo, pela dosagem das citocinas.

Aos **Profs. Drs. Rodrigo Lira** e **Sílvio Caldas** pelas valiosas contribuições na revisão do estudo.

Ao **Prof. Edmilson Mazza**, pela avaliação estatística dos resultados.

Ao **Prof. Dr. Stanley Chang** por todos os ensinamentos científicos e éticos, e por ter incentivado meu desenvolvimento científico.

A **Carlos Weber**, pela sua contribuição no armazenamento e transporte do material coletado para o Laboratório Science Pro.

A **Isabela Pimentel**, secretária da pós-graduação em cirurgia, pelo auxílio e empenho no cumprimento dos trâmites formais do processo desta dissertação.

Aos **Professores** e **colegas** do programa de pós-graduação em Cirurgia, pela convivência, amizade e ajuda na formação do espírito crítico.

A **Márcia** e **Mércia Virgínio**, pelo auxílio na formatação e editoração gráfica deste trabalho.

À **CAPES**, pelo papel fundamental que desempenha na formação de pesquisadores.

A **todos**, que de alguma forma, colaboraram com a realização deste trabalho.

RESUMO

OBJETIVO. Analisar a participação de citocinas, quimiocinas e fatores de crescimento em endoftalmite infecciosa aguda pós-facectomia.

MÉTODOS. Amostras de humor vítreo de 18 pacientes com endoftalmite foram coletadas e armazenadas a -80°C . IL-1ra, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-12 (p70), IL-13, IL-15, IL-17, FGF básico, Eotaxina, G-CSF, GM-CSF, IFN- γ , MCP-1, MIP-1a, MIP-1b, PDGF-BB, RANTES, TNF- α e VEGF foram dosadas pela técnica de Bioplex e comparadas com 39 pacientes submetidos a vitrectomia por doença não-infecciosa (controle).

RESULTADOS. As concentrações de IL-1ra, IL-2, IL-4, IL-6, IL-8, IL-9, IL-10, IL-15, IL-17, eotaxina, FGF Básico, G-CSF, GM-CSF, IFN- γ , MCP-1, MIP-1a, MIP-1b, PDGF-bb, RANTES e TNF- α foram significativamente maiores ($p < 0.05$) em olhos com endoftalmite. Não houve diferença significativa entre os grupos em relação à concentração de IL-5, IL-12 (p70), IL-13 e VEGF. A concentração de IL-7 foi superior no grupo controle ($p = 0.0229$). Considerando-se os diferentes diagnósticos do grupo controle, apenas IL-5 não apresentou diferença significativa entre os grupos ($p = 0.1764$). Foi observada correlação positiva entre TNF- α e eotaxina, IL-8, MIP-1a, MIP1b e RANTES. Observou-se correlação positiva moderada entre TNF- α e acuidade visual inicial ($r = 0.59$, $p = 0.0096$). Não se encontrou correlação entre acuidade visual inicial ou final entre os demais fatores dosados.

CONCLUSÕES. A endoftalmite infecciosa pós-facectomia estimula a produção de citocinas, quimiocinas e fatores de crescimento. Os níveis de TNF- α podem estar relacionados com a gravidade do processo inflamatório inicial. Não foi encontrado fator inflamatório preditivo para a acuidade visual final.

Palavras-chave: Citocinas, Endoftalmite, Extração de Catarata, Quimiocinas, Fatores de Crescimento

ABSTRACT

Purpose. To analyze the involvement of cytokines, chemokines and growth factors in acute infectious endophthalmitis following cataract extraction surgery.

Methods. Vitreous humor samples were collected from 18 patients with infectious endophthalmitis. The Bio-Plex technique was used to measure IL-1ra, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-12 (p70), IL-13, IL-15, IL-17, basic FGF, eotaxin, G-CSF, GM-CSF, IFN- γ , MCP-1, MIP-1a, MIP-1b, PDGF-BB, RANTES, TNF- α and VEGF for comparison with levels in 39 patients undergoing vitrectomy for a non-infectious disease (control).

Results. IL-1ra, IL-2, IL-4, IL-6, IL-8, IL-9, IL-10, IL-15, IL-17, eotaxin, bFGF, G-CSF, GM-CSF, IFN- γ , MCP-1, MIP-1a, MIP-1b, PDGF-BB, RANTES and TNF- α levels were significantly higher ($p < 0.05$) in eyes with endophthalmitis. There were no significant differences between groups for IL-5, IL-12 (p70), IL-13 and VEGF levels. IL-7 levels were higher in the control group ($p = 0.0229$). Considering the different diagnosis in the control group, only IL-5 was not significantly different between groups ($p = 0.1764$). There were positive correlations between TNF- α and eotaxin, IL-8, MIP-1a, MIP1b and RANTES, and a moderate positive correlation between TNF- α and the initial visual acuity ($r = 0.59$, $p = 0.0096$). There was no correlation with the initial or final visual acuity for the other factors measured.

Conclusions. Infectious endophthalmitis following cataract extraction stimulates the production of cytokines, chemokines and growth factors. Levels of TNF- α may be related to the severity of the initial inflammatory processes. No inflammatory factor that could predict the final visual acuity was evident.

Key Words: Cytokines, Endophthalmitis, Cataract Extraction, Chemokines, Growth Factors

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1	Procedimento de aspiração do humor vítreo com vitreófago	16
Figura 2	Kit <i>Bio-Plex Pro™ Human Cytokine Assay</i> (BIO-RAD®, Hercules, EUA) - fonte autor	17
Figura 3	Concentrações (pg/mL) de fatores de crescimento (A), quimiocinas (B) e citocinas (C) no humor vítreo de pacientes com endoftalmite aguda <i>versus</i> grupo controle.	19

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Características demográficas do grupo caso	21
Tabela 2	Comparação das concentrações (pg/ml) de citocinas entre os grupos caso e controle	21
Tabela 3	Comparação das concentrações (pg/ml) de citocinas entre os grupos caso e controle, separando os pacientes do grupo controle de acordo com o diagnóstico	22
Tabela 4	Correlação entre TNF- α e quimiocinas	24
Tabela 5	Teste de correlação entre as citocinas, quimiocinas e fatores de crescimento em relação à acuidade visual inicial e final.	

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AVL	acuidade visual para longe
BM	buraco macular
CINC	citocina indutora de quimioatração de neutrófilos
DR	descolamento de retina
EPM	erro padrão da média
EPR	epitélio pigmentar da retina
et al	e outros, do latim et alli
EUA	Estados Unidos da América
EVS	<i>Early Vitrectomy Study</i>
FGF Básico	fator de crescimento básico de fibroblastos
G-CSF	fator estimulador de crescimento de granulócitos
GM-CSF	fator estimulador de crescimento de granulócitos-monócitos
HIV	vírus da imunodeficiência humana
IgA	imunoglobulina A
IgE	imunoglobulina E
IL-1ra	antagonista do receptor de IL-1
IL-2	interleucina-2
IL-4	interleucina-4
IL-5	interleucina-5
IL-6	interleucina-6
IL-7	interleucina-7
IL-8	interleucina-8
IL-9	interleucina-9
IL-10	interleucina-10
IL-12 (p70)	interleucina-12
IL-13	interleucina-13
IL-15	interleucina-15
IL-17	interleucina-17
INF-γ	interferon gama
IV	intravítrea
KC	quimiocina de ceratinócitos

kD	<i>kilodaltons</i>
LIKA	Laboratório de Imunopatologia Keiso Asami
logMAR	logaritmo do ângulo mínimo de resolução
MCP-1	proteína quimiotática de monócitos
MER	membrana epirretiniana
MHC	complexo principal de histocompatibilidade
MIP-1a	proteína inflamatória de macrófagos-1a
MIP-1b	proteína inflamatória de macrófagos-1b
ml	mililitro
MM	movimento de mãos
NK	células <i>natural killer</i>
NLM	<i>National Library of Medicine</i>
PDGF-BB	fator de crescimento derivado de plaquetas subunidade BB
pg	picogramas
PL	percepção luminosa
RANTES	quimiocina regulada sob ativação normalmente expressada e ativada por células T
RDP	retinopatia diabética proliferativa
SPL	sem percepção luminosa
SPSS	<i>Statistical Package for the Social Science</i>
STATA	<i>Data Analysis and Statistical Software</i>
TASS	<i>Toxic Anterior Segment Syndrome</i>
TLR	receptor <i>toll-like</i>
TLR-2	receptor <i>toll-like</i> tipo 2
TNF-α	fator de necrose tumoral alfa
VEGF	fator de crescimento derivado do endotélio
VPP	vitrectomia posterior <i>parsplana</i>

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	01
1.1 Apresentação do problema.....	01
1.2 Justificativa da investigação.....	02
1.3 Objetivos.....	02
1.3.1 Geral.....	02
1.3.2 Específicos.....	02
2. LITERATURA.....	03
2.1 Endoftalmite: características gerais.....	03
2.2 Diagnóstico diferencial.....	03
2.3 Tratamento.....	04
2.4 Citocinas, quimiocinas e fatores de crescimento.....	05
3. MÉTODOS.....	14
3.1 Local de estudo.....	
3.2 Tipo de estudo.....	14
3.3 Seleção.....	14
3.3.1 Critérios de inclusão.....	14
3.3.2 Critérios de exclusão.....	15
3.4 Procedimentos.....	
3.4.1 Procedimentos técnicos.....	15
3.4.2 Procedimentos analíticos.....	17
3.4.3 Procedimentos éticos.....	18
4. RESULTADOS.....	19
5. DISCUSSÃO.....	27
6. CONCLUSÕES.....	34
REFERÊNCIAS.....	35
APÊNDICE.....	45
APÊNDICE A – Artigo Original.....	45
APÊNDICE B – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.....	
APÊNDICE C – Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa.....	48



1. INTRODUÇÃO

1.1 Apresentação do problema

A endoftalmite caracteriza-se como inflamação intraocular, secundária a proliferação de bactérias ou fungos na cavidade vítrea, após procedimentos cirúrgicos, trauma ou disseminação endógena.¹⁻⁹ Sua incidência após cirurgia de catarata varia entre 0,087 e 0,265%.^{1,10-15} Também pode ser decorrente de processos não-infecciosos, como reações do sistema imunológico por auto-imunidade, agentes tóxicos presentes em determinadas formulações medicamentosas, vasculites ou neoplasias.^{1,10,16-21} A evolução pode ser grave com potencial risco para causar perda de visão e atrofia bulbar. O tratamento consiste na rápida instituição de antibióticos intravítreo ou procedimento de vitrectomia posterior.^{2,12,22,23}

A capacidade da bactéria para causar o processo inflamatório na cavidade vítrea está na dependência da virulência do microrganismo, como sua rápida replicação e produção de toxinas que produzem inflamação. Existem moléculas na parede bacteriana com atividade pró-inflamatória, como o ácido lipotecóico, peptidoglicanos e polissacarídeos.^{11,24,25} Essas moléculas são capazes de induzir o processo inflamatório mesmo se o microrganismo estiver inativo. As bactérias podem produzir diversas enzimas, como proteases, collagenases, hialuronidases, que causam lesão nos tecidos do hospedeiro.¹¹ Além da lesão tecidual causada pelo crescimento bacteriano e produção de toxinas, a resposta excessiva do sistema imunológico e inflamação pode ser responsável pelos danos intraoculares, incluindo dano direto aos fotorreceptores, lesão do endotélio da córnea, bloqueio pupilar com glaucoma e descolamento de retina.^{11,26,27} Atualmente, os corticoides são as únicas medicações utilizadas na modulação do sistema imunológico em endoftalmite infecciosa aguda.^{26,28}

A resposta do sistema imunológico conta com a participação da imunidade natural através de receptores *toll-like* (TLR).²⁸⁻³³ A ativação destes receptores por

antígenos bacterianos pode levar a produção de fatores inflamatórios, conhecidos como citocinas, que participam da reação do hospedeiro, sendo sua liberação crítica para a eliminação do agente infeccioso.^{30,31,33-40} São produzidas por macrófagos, linfócitos, células *natural killer* (NK), células do epitélio pigmentar da retina (EPR) e outras células imunológicas, em resposta a determinados estímulos.⁴¹⁻⁴⁵ Participam de várias ações na defesa do hospedeiro, como reconhecimento do agente infeccioso, recrutamento de leucócitos (quimiocinas) e reparo de tecidos lesados (fatores de crescimento).⁴⁶⁻⁴⁸ Estudos experimentais em endoftalmite infecciosa identificaram a expressão de citocinas na cavidade vítrea, como fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) e interferon gama (INF- γ).^{46,49-52}

O TNF- α participa já da fase inicial da resposta imunológica, através do reconhecimento do agente invasor. Uma de suas principais funções é o recrutamento de leucócitos para o local da infecção, estimulando a produção de quimiocinas.^{11,50,53} Os níveis de TNF- α e INF- γ também podem estar relacionados com a intensidade do processo inflamatório inicial.⁴⁶ Entretanto, a produção de citocinas, quimiocinas e fatores de crescimento em seres humanos, portadores de endoftalmite infecciosa aguda, é pouco conhecida.^{1,11,30}

A dosagem de citocinas também pode, em determinadas situações, fornecer informações a respeito da gravidade de infecções. A concentração plasmática de TNF- α pode ser preditiva do prognóstico de infecções graves com sepse.⁵⁴ A relação entre citocinas e gravidade da endoftalmite ainda não está bem definida.^{1,50}

1.2 Justificativa da investigação

Pouco se sabe sobre a expressão de citocinas em portadores de endoftalmite aguda. A análise desses fatores inflamatórios e angiogênicos em endoftalmite infecciosas *in vivo* pode contribuir para melhor entendimento do funcionamento dos mecanismos de defesa ocular contra microrganismos, bem como a gravidade da endoftalmite. Poderá fornecer informações sobre determinadas substâncias que servirão de base para: possíveis alvos terapêuticos no futuro, determinar a resposta ao tratamento, possibilitando a utilização de antibioticoterapia e manejo terapêutico de modo mais racional, como necessidade de corticoterapia, frequência de injeções intravítreas de antibióticos ou cirurgia de vitrectomia posterior.

1.3 Objetivos

1.3.1 Geral

Analisar a participação de citocinas, quimiocinas e fatores de crescimento em portadores de endoftalmite infecciosa aguda pós-facectomia.

1.3.2 Específicos

- ❖ Determinar a concentração de citocinas (IL-1ra, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-10, IL-12, IL-13, IL-15, IL-17, TNF- α e IFN- γ), quimiocinas (IL-8, Eotaxina, MCP-1, MIP-1a, MIP-1b e RANTES) e fatores de crescimento (G-CSF, GM-CSF, FGF básico, PDGF, VEGF e IL-7) no humor vítreo de portadores de endoftalmite infecciosa aguda pós-facectomia através da técnica Bioplex/Multiplex e comparar com pacientes submetidos à vitrectomia posterior por doença não-infecciosa (grupo controle).
- ❖ Relacionar os níveis de TNF- α com as quimiocinas dosadas.
- ❖ Relacionar a concentração de citocinas, quimiocinas e fatores de crescimento com a gravidade da endoftalmite, através da correlação com a medida da melhor acuidade visual inicial e final.



2. LITERATURA

2.1 Endoftalmite: características gerais

Caracteriza-se como processo inflamatório grave com envolvimento do corpo vítreo. Em geral, é causada por uma infecção exógena ou endógena, por vírus, bactérias, fungos e protozoários. Pode ser decorrente de cirurgia ocular para tratamento de catarata, estando o *Staphylococcus epidermidis* como agente etiológico mais frequente.^{3,5,12,25} Em alguns casos, uma disseminação endógena pela corrente sanguínea, a partir de um sítio distante do globo ocular, como abscesso hepático por *Klebsiella* ou endocardite, poderia ser causa para endoftalmite.^{2-4,55}

A endoftalmite não é necessariamente decorrente de um processo infeccioso, sendo nesses casos denominada endoftalmite estéril. Várias causas poderiam levar à inflamação do corpo vítreo, entre elas: substâncias tóxicas presentes em algumas formulações, como triancinolona; ruptura de cápsula posterior com luxação de fragmentos nucleares para o vítreo, síndrome tóxica do segmento anterior (*Toxic Anterior Segment Syndrome* - TASS).^{17-19,21,56}

Em relação à endoftalmite pós-facectomia, quando o desenvolvimento do quadro clínico ocorre dentro de seis semanas da cirurgia, classifica-se como endoftalmite aguda. Nestes casos os agentes mais frequentes são: *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus ssp* e *Pseudomonas aeruginosa*. Na endoftalmite crônica, quando os sintomas aparecem após seis semanas, os agentes mais envolvidos são: *Propionibacterium acnes*, *Staphylococcus epidermidis*, *Streptococcus ssp* e fungos.^{5,6,8,23}

A incidência de endoftalmite pós-catarata varia entre 0,087 e 0,265%. Acredita-se que o número de casos aumentou na última década a partir da introdução da técnica por incisão na córnea clara.^{10,11,14,15} Entretanto, devido à raridade na ocorrência desta complicação após cirurgia de catarata, há dificuldade em se determinar sua incidência precisa. Fatores como tamanho da amostra podem

dificultar comparações entre dados.¹⁵

2.2 Diagnóstico diferencial

O diagnóstico e tratamento da endoftalmite aguda infecciosa pós-facectomia é baseado em critérios clínicos, já que a confirmação pela cultura não é possível em todos os casos. Além do que, o início do tratamento deve ser imediato, não sendo viável o tempo de espera para crescimento bacteriano no meio de cultura.^{9,12} Utilizam-se, então, antibióticos de amplo espectro diante da suspeita clínica da doença. Entretanto, os sinais e sintomas da endoftalmite infecciosa são bem característicos. A presença de sintomas de dor e baixa de acuidade visual, associados a sinais de hiperemia conjuntival, reação grave de câmara anterior com formação de fibrina e hipópio e inflamação da cavidade vítrea (vitrite), devem levar ao diagnóstico clínico de endoftalmite.^{2,22}

O principal diagnóstico diferencial da endoftalmite infecciosa é com a TASS.⁵⁷ Esta síndrome caracteriza-se como processo inflamatório grave que se inicia no primeiro dia de cirurgia. A inflamação é limitada ao segmento anterior do olho, estando a vitrite em geral ausente e, quando presente, de baixa intensidade. Cultura e baciloscopia são negativos e apresenta boa resposta aos corticoides.^{58,59} O principal sintoma é a baixa de acuidade visual que pode ou não vir acompanhada por dor.^{59,60} Suas causas estão relacionadas à entrada na câmara anterior, durante o ato operatório, de substâncias tóxicas às estruturas do segmento anterior. Quando ocorre a suspeita de um quadro de TASS, deve ser instituído tratamento com corticoide tópico imediato, a cada hora, para se evitar danos a estruturas intraoculares.^{57,61}

2.3 Tratamento

Uma vez diagnosticada endoftalmite após a cirurgia de catarata, o quadro deve ser considerado como uma emergência médica e o tratamento deve ser instituído o mais rápido possível. Os princípios do tratamento são baseados no estudo *Early Vitrectomy Study* (EVS), que foi conduzido entre janeiro de 1990 e janeiro de 1994, sendo prospectivo, randomizado, multicêntrico e incluiu 420 olhos de portadores de endoftalmite aguda pós-facectomia. O objetivo do estudo foi

responder se o uso de antibióticos sistêmicos traria benefício para o tratamento e quando deveria ser indicada a cirurgia de vitrectomia posterior.¹²

Através da análise dos resultados do EVS, concluiu-se que o uso de antibióticos sistêmicos não trazia benefício para o resultado visual final e que, o momento apropriado para a indicação da cirurgia de vitrectomia posterior primária seria apenas para pacientes que apresentavam acuidade visual de percepção luminosa no momento do diagnóstico.¹²

2.4 Citocinas, quimiocinas e fatores de crescimento

As citocinas, quimiocinas e fatores de crescimento são moléculas protéicas, produzidas por células que participam da imunidade natural e adquirida do organismo, como macrófagos, células *NK* e linfócitos T. São produzidas em resposta a presença de microrganismos ou antígenos protéicos. Quando a síntese é iniciada, essas substâncias são rapidamente liberadas e não ficam armazenadas como moléculas pré-formadas. Para ocorrer nova síntese, é necessário também nova transcrição de genes a partir da ativação da célula por um determinado estímulo. Seu sítio de ação é extremamente variado, podendo atuar inclusive sobre a própria célula que a produz (ação autócrina). Em geral, atuam localmente, mas podem também entrar na circulação e agir distante da célula produtora.^{34,62,63}

As propriedades se caracterizam pelo pleiotropismo, onde uma mesma citocina pode exercer vários efeitos em mais de um tipo celular. Participam da ativação de macrófagos, proliferação de células B, produção de IgE, diferenciação de células T em T_H1 e T_H2 , aumento da expressão de moléculas de histocompatibilidade, entre outras. Tanto podem participar da regulação da atividade do sistema imunológico como também atuar como moléculas efetoras na defesa do organismo. Dependendo de sua categoria funcional, podem ser classificadas em três categorias: mediadoras e reguladoras da imunidade natural, mediadoras e reguladoras da imunidade adquirida e estimuladoras da hematopoiese.^{35,64}

As citocinas mediadoras e reguladoras da imunidade natural atuam principalmente em células endoteliais e leucócitos, estimulando reações iniciais aos microrganismos. São produzidas por fagócitos mononucleares e células *NK*. As citocinas mediadoras e reguladoras da imunidade adquirida são produzidas por linfócitos T, ao reconhecerem determinados antígenos específicos. Participam

principalmente da diferenciação dos linfócitos T em diferentes populações linfocitárias. Também participam do recrutamento e ativação de neutrófilos e fagócitos mononucleares, com o objetivo de eliminação do antígeno.^{41,42,65,66} Suas ações ocorrem a partir da ligação com receptores presentes em células-alvo. Os receptores se caracterizam como proteínas transmembrana plasmática, com uma porção extracelular, que se liga a citocina e outra porção intracelular, que dá início a sinalização dentro da célula. Dependendo dos domínios extracelulares de ligação e dos mecanismos de sinalização intracelular, os receptores podem ser agrupados e classificados em 05 grupos: tipo I, tipo II, receptores da família IL-1, receptores de TNF e receptores transmembrana de sete α -hélices.^{53,63,65,67}

Interleucina-2 (IL-2). É uma glicoproteína de 14 a 17kD, produzida por linfócitos T CD4. Estimula a proliferação e diferenciação de células T ativadas por antígenos e células NK. Pode também atuar sobre células B, estimulando a síntese de anticorpos.⁶⁸

Interleucina-4 (IL-4) e **interleucina-13** (IL-13). São citocinas estrutural e funcionalmente semelhantes que atuam na defesa contra helmintos e em processos alérgicos. A IL-4 tem como principal fonte celular as células T CD4, subgrupo T_H2 , tendo como função estimular o crescimento dessas células diferenciadas (função autócrina). Atua também sobre macrófagos, por uma via distinta do $INF-\gamma$, estimulando a fagocitose de microrganismos. A IL-13 é produzida por células T CD4, subgrupo T_H2 , células T CD8 e células NK. Estimula a inflamação através da expressão de moléculas de adesão endotelial e quimiocinas. Tem função também fibrogênica em estados inflamatórios crônicos.⁶⁹

Interleucina-17 (IL-17). Glicoproteína de estrutura homodimérica com 20 – 30kD, produzida por células T CD4 que constituem uma linhagem distinta de células T_H1 e T_H2 , denominadas T_H17 . Participam da imunidade adquirida, principalmente contra patógenos extracelulares.⁷⁰

Interleucina-5 (IL-5). Polipeptídeo que contém um domínio com quatro α -hélices, é produzida pelo subgrupo T_H2 de células T CD4 e por mastócitos ativados. Atua sobre eosinófilos, estimulando seu crescimento e diferenciação. Também estimula a proliferação de células B e produção de anticorpos IgA.^{71,72}

Interferon gama ($INF-\gamma$). Homodímero de 50 kD, caracteriza-se como principal citocina ativadora de macrófagos para destruir os microrganismos fagocitados. É produzido por células NK, células T_H1 CD4 e células T CD8.^{36,73}

Fator de necrose tumoral alfa (TNF- α). Proteína transmembrana que quando clivada por uma metaloproteinase, libera um polipeptídeo de 17kD. Três dessas cadeias de polipeptídeos podem se polimerizar para formar uma proteína circulante com 51kD. É produzido por macrófagos ativados e neutrófilos. Sua principal função é estimular a migração de neutrófilos e monócitos para o local da infecção e ativar essas células para destruir os microrganismos.^{45,64}

Antagonista do receptor de interleucina-1 (IL-1ra). É uma proteína da família da citocina IL-1 capaz de se ligar ao seu receptor, mas não o ativa. Inibe a atividade de IL-1 α e IL-1 β , constituindo um inibidor natural das atividades pró-inflamatórias da IL-1.⁷⁴

Interleucina-6 (IL-6). Proteína com 19 – 26kD, produzida por macrófagos, células endoteliais e células T. Estimula a proliferação de células B, com consequente aumento na produção de anticorpos.⁽⁵⁸⁾

Interleucina-10 (IL-10). É caracterizada como proteína anti-inflamatória, atuando como inibidor de macrófagos ativados, para terminar a resposta do sistema imunológico à medida que o microrganismo é destruído. Inibe a produção de IL-12 e expressão de moléculas do complexo principal de histocompatibilidade (MHC).⁵¹

Interleucina-12 (IL-12). Proteína constituída por duas subunidades diferentes (35 e 40kD) ligadas por dissulfeto. Produzida por macrófagos ativados e células dendríticas, tem como função principal a erradicação de microrganismos intracelulares, através da estimulação da produção de INF- γ e diferenciação de células T CD4 auxiliares em células T_H1.^{51,76}

Interleucina-15 (IL-15). Glicoproteína de 15 kD produzida por fagócitos mononucleares que participa da regulação da ativação e proliferação de células T e NK.³⁸

Interleucina-7 (IL-7), **fator estimulador de colônias de granulócitos-monócitos** (GM-CSF) e **fator estimulador de colônias de granulócitos** (G-CSF). Fatores de crescimento produzidos nas respostas imunes natural e adquirida que estimulam o crescimento e diferenciação de células progenitoras na medula óssea. A IL-7 tem como principal fonte celular as células estromais da medula óssea e atua sobre a proliferação de precursores linfóides imaturos de células T e B. G-CSF e GM-CSF podem ser produzidos por macrófagos, células T ativadas, células endoteliais e também por células do estroma da medula óssea.^{71,75,77}

Interleucina-8 (IL-8), **proteína quimiotática de monócitos** (MCP-1), **proteína inflamatória de macrófagos 1a** (MIP-1a), **proteína inflamatória de macrófagos 1b** (MIP-1b), **quimiocina regulada sob ativação normalmente expressada e ativada por células T** (RANTES) e **eotaxina**. Fazem parte do grupo das quimiocinas, que estimulam e regulam a migração de leucócitos do sangue para os tecidos. Podem ser produzidas por macrófagos, células epiteliais e células endoteliais. RANTES também participa da migração de basófilos e eosinófilos.^{34,39,63}

Fator de crescimento derivado do endotélio (VEGF), **fator de crescimento derivado de plaquetas subunidade B** (PDGF-BB) e **fator de crescimento básico de fibroblastos** (FGF básico). São proteínas que estimulam o crescimento celular em resposta a variados estímulos. Podem levar a formação de vasos sanguíneos (angiogênese). O VEGF é produzido por células do epitélio pigmentar da retina (EPR) e por células endoteliais em resposta à hipóxia e produção de IL-6. Estimula a neovascularização em degeneração macular, retinopatia diabética e oclusões venosas retinianas. Também pode aumentar a permeabilidade vascular com consequente formação de edema macular.^{78,79}

Dependendo da fase do processo inflamatório, as citocinas podem ser agrupadas nas seguintes categorias: reconhecimento (TNF- α), recrutamento/quimiocinas (IL-8, eotaxina, MCP-1, MIP-1a, MIP-1b, RANTES), remoção (IFN-g, IL-2, IL-6), reparo (FGF básico, VEGF, G-CSF, GM-CSF, PDGF-bb) e citocinas anti-inflamatórias (IL-1ra, IL-4, IL-6, IL-10, IL-11, IL-13).¹¹

Os TLR são glicoproteínas presentes na membrana celular que reconhecem diversos padrões expressos por microrganismos e desempenham importantes funções na resposta imune natural. A ativação desses receptores leva a expressão de determinados genes que codificam moléculas da resposta natural, incluindo citocinas, como o fator de necrose tumoral e IL-1. Os TLR já foram identificados em diversas células oculares, entre elas o epitélio pigmentar da retina, astrócitos, epitélio corneal, epitélio iriano, micróglia e células de Muller.^{30,33}

Modelos experimentais de endoftalmite, constituídos por ratos deficientes de TLR2, apresentaram diminuição dos níveis de citocinas e quimiocinas, além de diminuição do recrutamento de células inflamatórias. Como consequência, houve diminuição do processo inflamatório, preservação da arquitetura retiniana e discreta melhora de sua função quando comparados com o grupo controle.³⁰



3. MÉTODOS

3.1 Local de estudo

Laboratório de Imunopatologia Keiso Asami (LIKA) da Universidade Federal de Pernambuco, Departamento de Cirurgia da Universidade Federal de Pernambuco, Departamento de Retina e Vítreo da Fundação Altino Ventura e Hospital de Olhos de Pernambuco.

3.2 Tipo de estudo

Estudo observacional, analítico e longitudinal.

3.3 Amostra

Foram selecionados para o estudo pacientes com diagnóstico clínico compatível com endoftalmite infecciosa aguda pós-facectomia, baseado nos critérios do EVS¹² que procuraram a emergência da Fundação Altino Ventura entre março de 2011 e outubro de 2012, com idade superior a 18 anos e acompanhamento de 06 meses após o diagnóstico da endoftalmite.

Foram excluídos pacientes que apresentavam história prévia de uveíte, pacientes que desenvolveram sintomas no mesmo dia do procedimento de facectomia (quadro clínico compatível com TASS), rotura de cápsula posterior com luxação nuclear para o vítreo e pacientes submetidos a procedimento cirúrgico ocular prévio.

Para o grupo controle, foram coletadas amostras de pacientes submetidos a vitrectomia posterior por doença não-infecciosa no mesmo dia da coleta de amostras dos pacientes com endoftalmite.

3.4 Procedimentos

3.4.1 Procedimentos técnicos

O material utilizado para dosagem das citocinas foi coletado a partir de amostras de humor vítreo durante o procedimento de injeção do antibiótico intravítreo ou vitrectomia posterior. O procedimento foi realizado com técnica de assepsia e antissepsia, sob anestesia local com colírio anestésico de proximetacaína (Anestalcon®, Alcon, Brasil) e anestesia loco-regional com lidocaína sob injeção peribulbar. A técnica de coleta foi constituída por: peritomia, esclerotomia, aspiração de 0,3mL de humor vítreo com vitreófago (Accurus®, Alcon, EUA) de 20 gauge, baixo corte (600 cortes/min), sutura escleral com vicryl (Ethicon®, Johnson&Johnson, EUA) 6.0 e, apenas para os pacientes do grupo caso, injeção intravítrea de vancomicina (Vancocina®, ABL, Brasil) 1,0mg/0,1mL, ceftazidima (Fortaz®, GlaxoSmithKline, Brasil) 2,25mg/0,1mL e dexametasona (Decadron®, Aché, Brasil) 0,4mg/0,1mL. Figura 1. A opção de tratamento inicial entre injeção de antibiótico intravítreo ou vitrectomia posterior foi baseada nos critérios do EVS.¹²

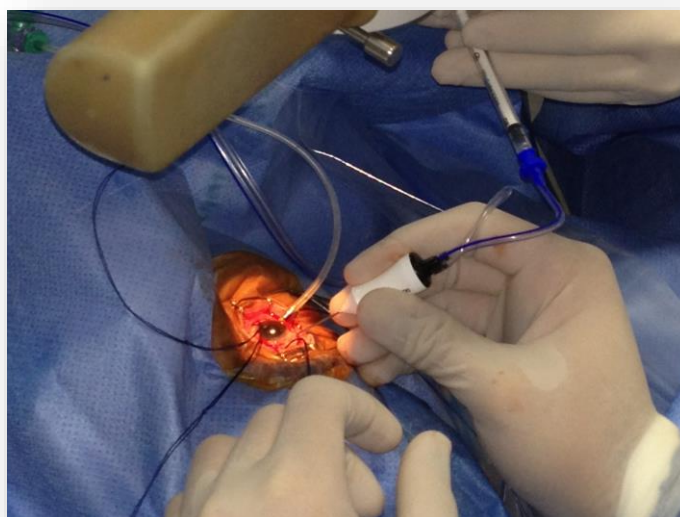


Figura 1. Procedimento de aspiração do humor vítreo com vitreófago. Paciente 4.

A amostra foi centrifugada a 5000 rpm por 10 minutos e então armazenada sob refrigeração de -80°C, até o momento de dosagem. Foi utilizado o kit *Bio-Plex Pro™ Human Cytokine Assay* (BIO-RAD®, Hercules, EUA), para dosagem das

seguintes citocinas: IL-1ra, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-12 (p70), IL-13, IL-15, IL-17, fator de crescimento básico de fibroblastos (FGF básico), eotaxina, fator estimulador de crescimento de granulócitos (G-CSF), fator estimulador de crescimento de granulócitos-monócitos (GM-CSF), interferon gama (INF- γ), proteína quimiotática de monócitos (MCP-1), proteína inflamatória de macrófagos-1a (MIP-1a), proteína inflamatória de macrófagos-1b (MIP-1b), fator de crescimento derivado de plaquetas subunidade BB (PDGF-BB), RANTES (reguladas pela ativação, expressas e secretadas pelas células T normais), fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) e fator de crescimento derivado do endotélio (VEGF). Figura 2.



Figura 2. Kit *Bio-Plex Pro™ Human Cytokine Assay*
(BIO-RAD®, Hercules, EUA)

O exame oftalmológico foi realizado na Fundação Altino Ventura e Hospital de Olhos de Pernambuco, sendo constituído por medida da acuidade visual corrigida com conversão para logMAR⁸⁰, utilizando-se tabela de Snellen, biomicroscopia com lâmpada de fenda de segmento anterior e posterior, medida da pressão intraocular através da tonometria de aplanção de Goldmann, mapeamento de retina sob midríase com oftalmoscópio binocular indireto e ultrassonografia ocular. O exame microbiológico foi realizado no LIKA.

3.4.2 Procedimentos analíticos

Os resultados das variáveis contínuas foram expressos por suas medidas de tendência central (médias) e por suas medidas de grau de dispersão (erro padrão da média). As variáveis categóricas foram expressas por suas frequências absolutas e relativas.

Na análise de variáveis contínuas não-paramétricas, não-pareadas, foi utilizado o teste de Mann-Whitney. Para avaliação da correlação entre variáveis contínuas utilizou-se o teste de Spearman. Para a comparação entre as concentrações de citocinas do grupo caso com cada subgrupo do controle foi utilizado o teste de Kruskal-Wallis e, no caso de diferença significativa, foi realizado o pós-teste de Duncan. A hipótese de normalidade dos dados foi verificada através do teste de Shapiro-Wilk.

Foi estabelecido o valor de $p < 0,05$ para rejeição da hipótese de nulidade. Os cálculos estatísticos foram realizados no software *Statistical Package for the Social Science* (SPSS) na versão 21.0 e o *Data Analysis and Statistical Software* (STATA) na versão 11.0.

3.3.5 Procedimentos éticos

O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos da Universidade Federal de Pernambuco (registro nº 032/10) (APÊNDICE C). Todos os indivíduos que participaram do estudo foram previamente esclarecidos sobre o objetivo e o método do estudo e assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (APÊNDICE B). A intervenção diagnóstica para dosagem das citocinas foi realizada durante a intervenção cirúrgica para o tratamento da endoftalmite ou para tratamento de doença vítreo-retiniana não-infecciosa, não trazendo riscos adicionais ao paciente.



4. RESULTADOS

4.1 Dados demográficos

Foram incluídos 18 pacientes com diagnóstico de endoftalmite. Entre esses pacientes, nove (50,0%) eram do sexo masculino. A idade variou entre 48 e 86 anos ($66,4 \pm 2,51$). Dez (55,6%) pacientes apresentavam acometimento do olho direito. seis (33,3%) pacientes eram portadores de diabetes mellitus.

O tempo decorrido entre a cirurgia e o início dos sintomas variou entre 3 e 40 dias ($13,6 \pm 2,61$). A AVL inicial, ou seja, no momento do diagnóstico da endoftalmite (pré-operatória) variou entre 20/150 e percepção luminosa ($2,3 \pm 0,087$ logMAR). Oito (44,4%) pacientes apresentavam AVL de percepção luminosa. O tempo de armazenamento das amostras a -80°C variou entre 24 e 594 dias ($371,5 \pm 49,53$).

Oito (44,4%) pacientes foram tratados com vitrectomia posterior e injeção de antibióticos intravítreo. Dez (55,6%) pacientes foram tratados apenas com injeção de antibióticos intravítreo sem a realização de vitrectomia posterior. Entre os pacientes tratados com vitrectomia posterior, três (37,5%) receberam óleo de silicone como substituto vítreo.

O resultado da cultura foi positivo para 11 (64,7%) pacientes, sendo o *Staphylococcus epidermidis* o agente encontrado em nove (81,8% entre os que apresentavam cultura positiva) casos. Uma cultura foi positiva para *Staphylococcus aureus* e outra para *Streptococcus viridans*.

Em relação à AVL final, medida após seis meses do diagnóstico da endoftalmite, houve variação entre: sem percepção luminosa (SPL) e 20/25 ($0,92 \pm 0,217$ logMAR). Dezesesseis (88,9%) pacientes apresentaram melhora da visão após o tratamento. Treze (72,2%) pacientes apresentaram visão melhor ou igual a 20/100. Um paciente evoluiu com atrofia bulbar e visão sem percepção luminosa e um paciente manteve a AVL de percepção luminosa. Tabela 1.

Tabela 1. Características demográficas do grupo caso: idade, sexo, AVL inicial (pré-operatória), AVL final (pós-operatória), tempo (dias) entre cirurgia e realização do primeiro exame, cultura microbiológica, tipo de tratamento.

Paciente	Idade/ sexo	AVL		Tempo (dias) cirurgia - exame	Cultura	Tratamento
		inicial	final			
1	82/M	PL	20/60	30	negativa	VPP + Injeção IV (2)
2	70/F	PL	MM	6	negativa	VPP + Injeção IV (1)
3	62/F	MM	20/40	14	<i>S. epidermidis</i>	Injeção IV (1)
4	60/F	PL	20/40	8	<i>S. epidermidis</i>	VPP + Injeção IV (1)
5	72/F	PL	20/40	6	<i>S. epidermidis</i>	VPP + Injeção IV (1)
6	62/F	PL	20/25	3	<i>S. viridans</i>	VPP + Injeção IV (2)
7	75/M	PL	PL	40	negativa	VPP
8	72/F	MM	20/160	30	negativa	Injeção IV (1)
9	51/F	20/150	20/100	14	negativa	Injeção IV (2)
10	48/M	MM	20/100	10	<i>S. epidermidis</i>	Injeção IV (2)
11	62/M	MM	20/50	7	negativa	Injeção IV (1)
12	56/M	MM	20/100	5	<i>S. epidermidis</i>	Injeção IV (3)
13	86/M	PL	MM	5	<i>S. aureus</i>	VPP + Injeção IV (1)
14	72/M	MM	20/25	6	<i>S. epidermidis</i>	Injeção IV (3)
15	75/F	CD	20/100	16	<i>S. epidermidis</i>	Injeção IV (2)
16	54/M	MM	20/30	12	negativa	Injeção IV (2)
17	76/F	PL	SPL	29	<i>S. epidermidis</i>	VPP
18	61/M	MM	20/60	4	<i>S. epidermidis</i>	Injeção IV (3)

AVL: acuidade visual para longe; PL: percepção luminosa; MM: movimento de mãos; CD: conta dedos; VPP: vitrectomia posterior pars plana; IV: intravítrea

Para o grupo controle, foram coletadas amostras de 39 pacientes (relação de caso para controle de 1 : 2,17). A idade dos pacientes variou entre 23 e 83 anos ($59,3 \pm 2,2$). Dezesete (43,6%) pacientes eram do sexo masculino com envolvimento do olho esquerdo em 20 (51,3%). Dezoito (46,1%) pacientes eram portadores de diabetes mellitus.

A doença que levou à necessidade de vitrectomia posterior entre os pacientes do grupo controle foi o descolamento de retina (DR) em 17 (43,6%) pacientes, maculopatia tipo membrana epirretiniana (MER) ou buraco macular (BM) em sete (17,9%) e retinopatia diabética proliferativa (RDP) em 15 (38,5%).

4.2 Níveis de citocinas, quimiocinas e fatores de crescimento

Verificou-se que os níveis de fatores de crescimento, G-CSF, GM-CSF FGF básico e PDGF-BB foram significativamente mais elevados em pacientes com endoftalmite (Figura 3A). Do mesmo modo, os níveis de quimiocinas, eotaxina, IL-8, MCP-1, MIP-1a, MIP-1b e RANTES, também foram significativamente mais elevados em pacientes com endoftalmite em comparação com o grupo controle (Figura 3B). No que diz respeito ao perfil de citocinas, observou-se aumento dos níveis de IL-1ra, IL-2, IL-4, IL-6, IL-9, IL-10, IL-15, IL-17, IFN- γ e TNF- α no humor vítreo de pacientes com endoftalmite comparado ao grupo controle (Figura 3C). Em contraste, os níveis de IL-7 foi significativamente mais elevado em pacientes com doença não-infecciosa (Figura 3C). Tabela 2.

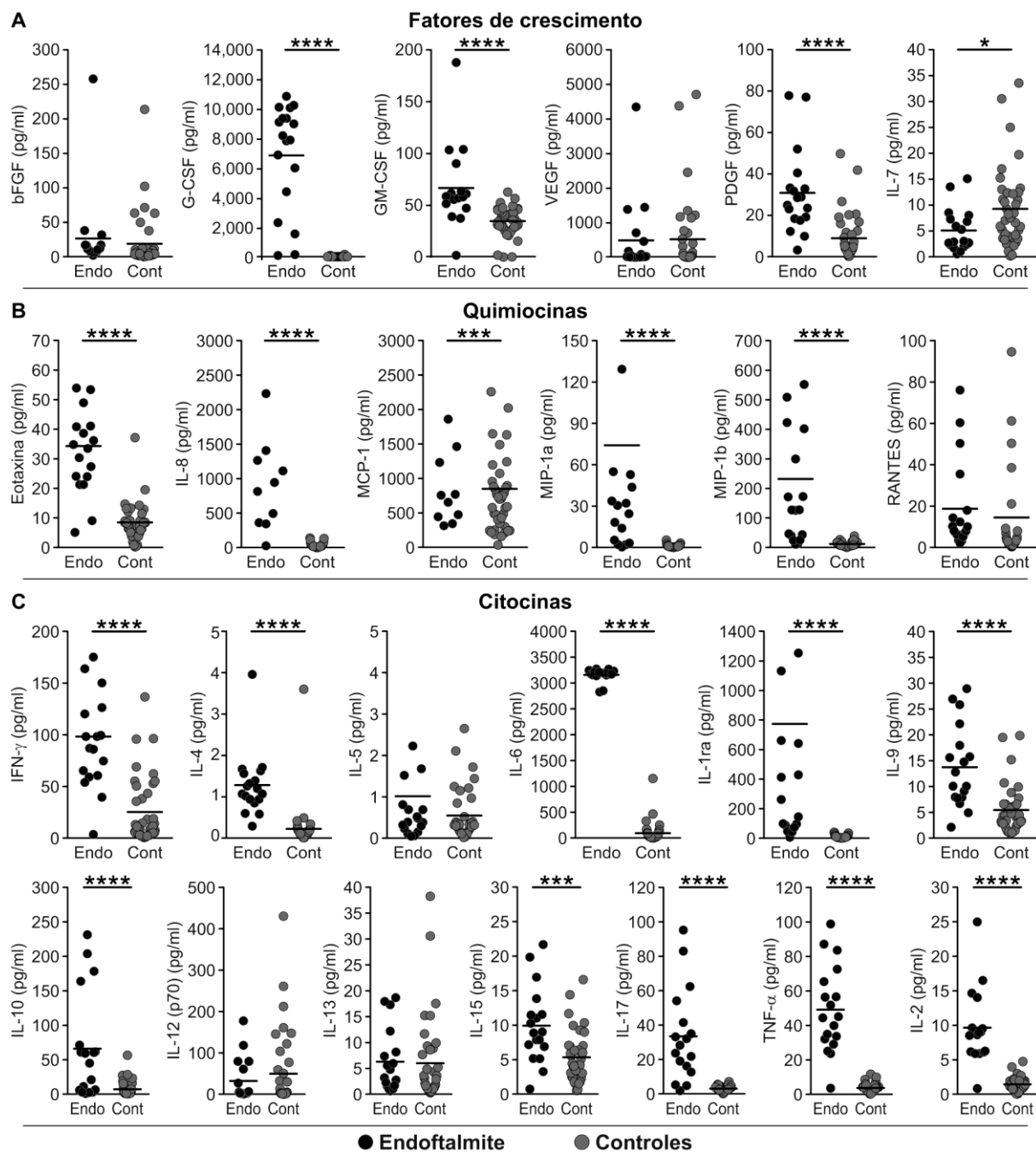


Figura 3. Concentrações (pg/mL) de fatores de crescimento (A), quimiocinas (B) e citocinas (C) no humor vítreo de pacientes com endoftalmite aguda (n=18) versus grupo controle (n=39).

Tabela 2. Comparação das concentrações (pg/mL) de citocinas entre os grupos caso e controle.

Citocinas, quimiocinas e fatores de crescimento	Grupos (Média±EPM)		Valor p§
	Caso (n=18)	Controle (n=39)	
IL-1ra	774,0 ± 245,6	9,3 ± 1,4	<0,0001
IL-2	9,7 ± 1,2	1,4 ± 0,2	<0,0001
IL-4	1,3 ± 0,2	0,2 ± 0,1	<0,0001
IL-5	1,0 ± 0,4	0,5 ± 0,1	0,3170
IL-6	3158,3 ± 28,9	95,3 ± 31,8	<0,0001
IL-7	5,1 ± 1,0	9,2 ± 1,2	0,0229
IL-8	5022,5 ± 1305,5	31,5 ± 5,4	<0,0001
IL-9	13,7 ± 1,9	5,4 ± 0,8	<0,0001
IL-10	66,0 ± 17,8	7,0 ± 1,9	<0,0001
IL-12 (p70)	31,9 ± 12,0	49,6 ± 14,9	0,452
IL-13	6,3 ± 1,5	6,0 ± 1,4	0,3283
IL-15	9,9 ± 1,3	5,3 ± 0,6	<0,0001
IL-17	89,7 ± 56,5	3,1 ± 0,2	<0,0001
Eotaxina	34,3 ± 3,9	8,5 ± 1,0	<0,0001
FGF Básico	26,6 ± 13,8	18,8 ± 6,4	0,005
G-CSF	6906,8 ± 847,6	11,7 ± 4,0	<0,0001
GM-CSF	66,9 ± 9,6	34,7 ± 2,3	<0,0001
IFN-γ	98,3 ± 12,1	25,3 ± 5,1	<0,0001
MCP-1	4498,5 ± 1428,4	850,6 ± 143,2	0,0036
MIP-1a	74,1 ± 27,8	0,9 ± 0,2	<0,0001
MIP-1b	231,9 ± 64,2	11,9 ± 1,4	<0,0001
PDGF-bb	30,8 ± 4,8	8,8 ± 1,8	<0,0001
RANTES	18,8 ± 5,1	14,5 ± 6,0	0,0004
TNF-α	49,1 ± 5,9	3,7 ± 0,4	<0,0001
VEGF	491,7 ± 251,6	523,1 ± 178,5	0,6930

§-teste de Mann-Whitney

Foi utilizado o teste de Kruskal-Wallis, seguido do pós-teste de Duncan para avaliar se existe diferença estatisticamente significativa entre os pacientes com endoftalmite e os pacientes do grupo controle, considerando-se os diferentes diagnósticos deste grupo (DR, BM/MER e RDP). Apenas a IL-5 não apresentou diferença estatisticamente significativa entre os grupos. Tabela 3.

Tabela 3. Comparação das concentrações (pg/mL) de citocinas entre os grupos caso e controle, separando os pacientes do grupo controle de acordo com o diagnóstico.

Citocinas, quimiocinas e fatores de crescimento	Endoftalmite (Média ± EPM) n=18	Grupo controle (Média±EPM)			Valor p §
		DR n=17	BM/MER n=7	RDP n=15	
IL-1ra	774,0 ± 245,6	12,2 ± 2,9*	3,8 ± 0,8*	8,6 ± 1,3*	< 0,0001
IL-2	9,7 ± 1,2	1,3 ± 0,1*	0,6 ± 0,2*	1,9 ± 0,3*	< 0,0001
IL-4	1,3 ± 0,2	0,3 ± 0,2*	0,1 ± 0,0*	0,2 ± 0,0*	< 0,0001
IL-5	1,0 ± 0,4	0,4 ± 0,1	0,3 ± 0,0	0,8 ± 0,2	0,1764
IL-6	3158,3 ± 28,9	151,1 ± 69,1*	8,0 ± 3,8*	72,8 ± 20,4*	< 0,0001
IL-7	5,1 ± 1,0	8,2 ± 1,6	3,8 ± 1,0	13,0 ± 2,2*	0,0013
IL-8	5022,5 ± 1305,5	24,9 ± 5,0*	8,5 ± 2,1*	49,8 ± 11,4*	< 0,0001
IL-9	13,7 ± 1,9	4,0 ± 0,5*	2,5 ± 0,6*	8,5 ± 1,6	< 0,0001
IL-10	66,0 ± 17,8	2,2 ± 0,5*	0,7 ± 0,1*	15,7 ± 4,1	< 0,0001
IL-12 (p70)	31,9 ± 12,0	12,4 ± 4,8	0,5 ± 0,1*	112,1 ± 31,7	< 0,0001
IL-13	6,3 ± 1,5	3,3 ± 0,9	0,9 ± 0,1*	11,6 ± 2,9	0,0002
IL-15	9,9 ± 1,3	5,8 ± 1,2	3,0 ± 0,5*	5,9 ± 0,7	0,0018
IL-17	89,7 ± 56,5	3,4 ± 0,4*	2,8 ± 0,8*	2,8 ± 0,3*	< 0,0001
Eotaxina	34,3 ± 3,9	6,5 ± 1,0*	6,0 ± 0,6*	11,8 ± 2,2*	< 0,0001
FGF básico	26,6 ± 13,8	39,3 ± 13,2	1,5 ± 0,4*	3,6 ± 0,6*	< 0,0001
G-CSF	6906,8 ± 847,6	20,5 ± 9,2*	5,9 ± 1,0*	11,5±6,3*	< 0,0001
GM-CSF	66,9 ± 9,6	33,5 ± 3,0*	33,1 ± 6,1*	36,9 ± 4,0*	0,0002
IFN-γ	98,3 ± 12,1	16,3 ± 3,5*	2,7 ± 0,7*	46,1 ± 10,7*	< 0,0001
MCP-1	4498,5 ± 1428,4	1035,4 ± 291,3	256,5 ± 66,0*	918,4 ± 138,2	0,0006
MIP-1a	74,1 ± 27,8	1,2 ± 0,3*	0,3 ± 0,0*	1,0 ± 0,1*	< 0,0001
MIP-1b	231,9 ± 64,2	15,2 ± 2,4*	4,0 ± 0,9*	12,1 ± 1,7*	< 0,0001
PDGF-bb	30,8 ± 4,8	10,1 ± 3,7*	2,7 ± 0,5*	10,4 ± 2,1*	< 0,0001
RANTES	18,8 ± 5,1	20,7 ± 12,3	1,0 ± 0,2*	13,6 ± 7,0	< 0,0001
TNF-α	49,1 ± 5,9	3,4 ± 0,6*	3,3 ± 0,6*	4,2 ± 0,8*	< 0,0001
VEGF	491,7 ± 251,6	116,5 ± 49,0	3,7 ± 0,9*	1199,1 ± 395,3*	< 0,0001

§-teste de Kruskal-Wallis

* Estatisticamente significativa em relação ao grupo com endoftalmite ($p < 0,05$; Teste de Duncan)

Encontrou-se correlação positiva entre a concentração de TNF-α e as quimiocinas eotaxina, IL-8, MIP-1a, MIP1b e RANTES. Não foi encontrada correlação entre o TNF-α e MCP-1. Tabela 4.

Tabela 4. Correlação entre TNF- α e quimiocinas

<u>Quimiocinas</u>	Valor R (valor <i>p</i>)
Eotaxina	0.8611 (<0.0001)
IL-8	0.7172 (0.0008)
MCP-1	0.1785 (0.4784)
MIP-1a	0.5562 (0.0165)
MIP-1b	0.6037 (0.008)
RANTES	0.5315 (0.0232)

4.3 Relação entre a concentração de fatores inflamatórios e de crescimento e acuidade visual

Os pacientes do grupo caso apresentaram média da acuidade visual pré-operatória de $2,3 \pm 0,087$, e pós-operatória de $0,92 \pm 0,217$, com diferença estatisticamente significativa ($p=0,0001$).

Observou-se uma correlação positiva moderada da concentração de TNF- α com a acuidade visual inicial expressa em logMAR ($r= 0,59$, $p=0,0096$ - Spearman). Para as demais citocinas, não encontrou-se correlação entre acuidade visual inicial e sua concentração. Também não se observou correlação entre a concentração de citocinas com a acuidade visual final. Tabela 5.

Tabela 5. Teste de correlação entre as citocinas, quimiocinas e fatores de crescimento em relação à acuidade visual inicial e final.

Citocinas, quimiocinas e fatores de crescimento	AVL inicial Valor r (valor p)	AVL final Valor r (valor p)
IL-1ra	0,24 (0,3268)	-0,10 (0,6811)
IL-2	0,38 (0,1162)	-0,11 (0,6403)
IL-4	0,26 (0,2927)	0,11 (0,6702)
IL-5	0,22 (0,3772)	-0,11 (0,6375)
IL-6	0,10 (0,6801)	-0,09 (0,7178)
IL-7	-0,06 (0,7883)	-0,24 (0,3323)
IL-8	0,22 (0,3650)	-0,18 (0,4516)
IL-9	0,29 (0,2438)	0,21 (0,3881)
IL-10	0,19 (0,4321)	0,09 (0,6963)
IL-12 (p70)	0,13 (0,6023)	0,10 (0,6855)
IL-13	0,11 (0,6636)	0,23 (0,3475)
IL-15	0,16 (0,5081)	-0,24 (0,3372)
IL-17	0,14 (0,5775)	-0,26 (0,2833)
Eotaxina	0,40 (0,0930)	-0,11 (0,6648)
FGF Básico	-0,23 (0,3429)	-0,08 (0,7394)
G-CSF	0,36 (0,1319)	-0,25 (0,3155)
GM-CSF	0,10 (0,6959)	-0,24 (0,3456)
IFN- γ	0,41 (0,0852)	-0,06 (0,8110)
MCP-1	0,26 (0,2825)	-0,05 (0,8311)
MIP-1a	0,17 (0,4907)	0,02 (0,9347)
MIP-1b	0,20 (0,4056)	-0,20 (0,4145)
PDGF-bb	0,29 (0,2364)	0,21 (0,3930)
RANTES	-0,08 (0,7370)	-0,03 (0,8956)
TNF- α	0,59 (0,0096)*	-0,07 (0,7762)
VEGF	0,19 (0,4375)	0,19 (0,4416)

*estatisticamente significante; §teste de correlação de Spearman



5. DISCUSSÃO

O processo inflamatório gerado durante a endoftalmite é fundamental para a eliminação do agente infeccioso. O reconhecimento do microrganismo com consequente ativação de células do sistema imunológico leva à secreção de fatores inflamatórios que estão envolvidos na eliminação do patógeno bem como modulação do sistema imune.¹¹ Este é o primeiro estudo *in vivo* a avaliar a resposta inflamatória através da dosagem de citocinas, quimiocinas e fatores de crescimento em pacientes portadores de endoftalmite infecciosa aguda pós-facectomia.

Estudos experimentais já evidenciaram que a endoftalmite infecciosa pode induzir a expressão de citocinas.^{46,49-52} Através da inoculação de cepas de *Staphylococcus epidermidis* em olhos de ratos *Lewis* foram quantificadas as citocinas TNF- α , IL-1 β e IFN- γ , comparando-se com a intensidade do processo inflamatório. Encontrou-se relação entre o processo inflamatório e a concentração das citocinas. Não foi possível a detecção dessas citocinas no sangue, sugerindo a produção apenas local.⁴⁶ Foram utilizadas colônias viáveis de *Staphylococcus aureus* para induzir endoftalmite em olhos de ratos e estudar a produção de TNF- α , IL-1 β , citocina indutora de quimioatração de neutrófilos (CINC) e IFN- γ . A CINC seria equivalente a IL-8 em seres humanos. Observou-se o aumento das quatro citocinas estudadas, encontrando relação com o processo inflamatório.⁴⁹

No presente estudo, observou-se maior produção de citocinas, quimiocinas e fatores de crescimento que estão envolvidos em várias fases do processo inflamatório: reconhecimento do microrganismo, recrutamento de leucócitos, eliminação do patógeno e reparação tecidual.

Na fase inicial de reconhecimento do patógeno há participação da imunidade natural através dos TLR.^{28-31,33} Já foi evidenciada, em tecidos do segmento posterior do olho, como epitélio pigmentar da retina e coroide, a expressão de receptores TLR tipo 2, 4 e 9. Sugere-se sua participação como mediadores na invasão do segmento posterior por patógenos.²⁹

Já foi evidenciado que o receptor TLR-2 é um componente importante na resposta inicial da endoftalmite causada por *Bacillus cereus*.³⁰ Strunk et al.³¹ analisaram a participação do receptor TLR-2 em infecções por *Staphylococcus epidermidis* e concluíram que a produção de citocinas e quimiocinas era mediada por sua ativação. Ratos deficientes em receptores TLR-2 apresentaram diminuição da produção de IL-6, IL-10, G-CSF e TNF- α com menor migração de leucócitos e menor capacidade para eliminar o agente infeccioso. A ativação dos receptores TLR-2, por antígenos bacterianos gram-positivos estimula a produção de citocinas inflamatórias, como o TNF- α e quimiocinas. Por sua vez, o aumento da secreção de TNF- α causado pela ativação desses receptores também estimula a produção de quimiocinas que promovem a quimiotaxia de leucócitos e seu recrutamento para o sítio da infecção.^{30,31}

Encontrou-se correlação entre TNF- α e todas as quimiocinas dosadas, à exceção de MCP-1 (Tabela 5). Como o TNF- α é uma das citocinas produzidas precocemente durante o processo inflamatório e que tem a capacidade de estimular a produção de outras citocinas,^{50,53} os resultados sugerem a possibilidade do TNF- α estar estimulando a produção dessas quimiocinas ou de um estímulo em comum para essa produção, que poderia ser a ativação do TLR. Não houve correlação entre o TNF- α e MCP-1, sugerindo a possibilidade de uma outra via para a produção dessa quimiocina.

Das vinte e cinco citocinas dosadas, catorze (IL-1ra, IL-2, IL-4, IL-6, IL-8, IL-17, Eotaxina, G-CSF, GM-CSF, IFN- γ , MIP-1a, MIP-1b, PDGF-BB, TNF- α) apresentaram concentrações superiores aos três diagnósticos do grupo controle. Com exceção da IL-7 (superior em pacientes com retinopatia diabética) e IL-5, todas as outras citocinas apresentaram maior concentração nos pacientes com endoftalmite, quando comparados com pacientes do grupo controle portadores de maculopatia. Pacientes portadores de buraco macular idiopático ou membrana epirretiniana associada à alterações da interface vítreo-retiniana não apresentam alterações intraoculares inflamatórias significativas ou isquemia retiniana.⁴⁰

Não foi encontrada diferença estatisticamente significativa na concentração de IL-5 entre os grupos estudados, sugerindo que esta citocina não apresenta participação na endoftalmite infecciosa aguda. IL-5 é produzida por linfócitos T_H2 em resposta a estimulação por alérgenos, *Mycobacterium tuberculosis*, *Toxocara canis*. Estimula a diferenciação e proliferação de eosinófilos, caracterizando-se como

mediador de processos alérgicos.⁸¹ Como a endoftalmite aguda tem como agente principal o *Staphylococcus epidermidis*, é provável não haver participação significativa da IL-5 na resposta imunológica ocular.

IL-7 caracteriza-se como fator de crescimento hematopoiético, sendo produzido pelas células estromais do tecido linfóide no timo e medula óssea, e participa da expansão de precursores imaturos de linfócitos T e B.⁷⁵ Tem participação na resposta imunológica ao HIV e processos neoplásicos como linfoma e leucemia linfóide aguda. Não foram encontradas evidências neste estudo de que a IL-7 tenha participação na endoftalmite infecciosa aguda pós-facectomia. Foi encontrado, neste estudo, aumento na concentração vítrea de portadores de retinopatia diabética.

O G-CSF e o GM-CSF também são consideradas citocinas hematopoiéticas e atuam em progenitores da medula óssea para estimular a produção de leucócitos. G-CSF pode ser produzido no local da infecção e atua como um hormônio endócrino na medula óssea.⁷⁷ Células T ativadas, macrófagos, células endoteliais podem expressar ambas as citocinas. Encontrou-se aumento na concentração de G-CSF e GM-CSF em portadores de endoftalmite infecciosa aguda, sugerindo sua participação no processo inflamatório. É citada a IL-17 como indutor da produção de G-CSF e GM-CSF.^{77,82}

Observou-se uma correlação positiva entre a acuidade visual inicial e a concentração vítrea do TNF- α . Em um paciente com endoftalmite infecciosa, a acuidade visual pode refletir a intensidade do processo inflamatório. Quanto maior a reação inflamatória na cavidade vítrea e na câmara anterior, maior será a opacidade de meios, dificultando a passagem da luz para a retina, diminuindo a acuidade visual. Em estudo experimental, foi observada a relação entre os níveis de TNF- α no humor vítreo e a intensidade do processo inflamatório.⁴⁶

A acuidade visual inicial é fator determinante da opção de tratamento nesses pacientes. O estudo EVS, realizado na década de 90 e utilizado até os dias de hoje, concluiu que pacientes com visão igual ou melhor que movimento de mãos deveriam ser tratados com injeção de antibióticos intravítreo. Pacientes com visão de percepção luminosa, devem ser tratados com vitrectomia posterior associada à injeção de antibióticos intravítreo.¹² Se os níveis de TNF- α relacionam-se com a acuidade visual inicial e intensidade do processo inflamatório, pode futuramente

constituir-se num marcador para ajudar o retinólogo na decisão terapêutica entre vitrectomia posterior ou injeção intravítrea.

O processo inflamatório pode ocasionar lesão do endotélio corneano com formação de opacidade grave que pode requerer transplante de córnea, bloqueio pupilar por formação de fibrina e sinéquias posteriores com desenvolvimento de glaucoma, proliferação vítreo-retiniana grave em pacientes que apresentam descolamento de retina. É possível realizar-se farmacologicamente o controle do processo inflamatório. Frequentemente, utilizam-se corticoides intravítreo nos casos de endoftalmite infecciosa aguda bacteriana, já que a própria reação do sistema imunológico pode danificar as estruturas oculares.²⁶

Medicações que bloqueiam o TNF- α , constituídos por anticorpos monoclonais, como infliximab, adalimumab, certolizumab, também estão disponíveis. São utilizadas no tratamento de doenças autoimunes como artrite reumatóide e seus benefícios já demonstrados em alguns estudos.^{45,73,83} Se, por um lado essas medicações podem reduzir o processo inflamatório em determinadas doenças, seus benefícios em endoftalmite infecciosa aguda não estão bem definidos.

Em estudo experimental, foi avaliado o papel do TNF- α na patogênese da endoftalmite induzida por *Bacillus cereus*. Para isso, utilizou-se uma linhagem de ratos não-produtores de TNF- α para comparação com ratos controle. Concluiu-se que ratos não-produtores de TNF- α , mesmo com aumento na síntese de IL-6, quimiocina de ceratinócitos (KC), MIP-1a e IL-1 β , apresentaram redução na migração de leucócitos polimorfonucleares com consequente menor processo inflamatório nesses olhos. Entretanto, a avaliação histológica demonstrou uma significativa perda e atrofia da arquitetura retiniana, comparado com ratos produtores de TNF- α . Sugere-se que ratos não-produtores de TNF- α , apesar do menor processo inflamatório, podem apresentar um curso mais grave da infecção com maior perda visual, devido ao maior dano retiniano.⁵⁰

Observou-se, em modelos experimentais, a destruição de fotorreceptores e degeneração retiniana em ratos que haviam recebido IFN- γ por via intravítrea. O IFN- γ induziu as células gliais a expressarem antígenos do MHC classes I e II, além de induzirem também as células do epitélio pigmentar da retina a expressarem antígenos do MHC tipo II. A ativação das células do epitélio pigmentar da retina poderia aumentar a fagocitose sobre fotorreceptores, induzindo sua perda.⁵²

Entretanto, não foi encontrado correlação do TNF- α , IFN- γ ou qualquer outra citocina com a acuidade visual final. Neste estudo, a dosagem de citocinas não mostrou utilidade como marcador de prognóstico na endoftalmite infecciosa.

Como limitações do estudo pode-se citar a presença no grupo controle de doenças que podem aumentar os níveis de citocinas como descolamento de retina e retinopatia diabética; a inclusão de pacientes com diagnóstico clínico de endoftalmite, mas com cultura negativa.



6. CONCLUSÕES

A análise dos resultados encontrados no presente estudo permite concluir que:

- 1- A endoftalmite infecciosa aguda pós-facectomia aumenta a concentração de citocinas (IL-1ra, IL-2, IL-4, IL-6, IL-9, IL-10, IL-15, IL-17, IFN- γ e TNF- α), quimiocinas (eotaxina, IL-8, MCP-1, MIP-1a, MIP-1b e RANTES) e fatores de crescimento (G-CSF, GM-CSF, FGF básico e PDGF-BB) em comparação com o grupo controle.
- 2- Observou-se correlação positiva entre a concentração de TNF- α e as quimiocinas eotaxina, IL-8, MIP-1a, MIP1-b e RANTES.
- 3- Observou-se correlação positiva moderada apenas da concentração de TNF- α com a acuidade visual inicial. Não se observou correlação entre a concentração de citocinas com a acuidade visual final, não sendo encontrado um fator inflamatório preditivo para a acuidade visual final.



REFERÊNCIAS

1. Callegan MC, Engelbert M, Parke DW, Jett BD, Gilmore MS. Bacterial Endophthalmitis: Epidemiology, Therapeutics, and Bacterium-Host Interactions. *Clin Microbiol Rev.* 2002 Jan 1;15(1):111–24.
2. Aaberg TM, Flynn HW, Schiffman J, Newton J. Nosocomial acute-onset postoperative endophthalmitis survey. A 10-year review of incidence and outcomes. *Ophthalmology.* 1998 Jun;105(6):1004–10.
3. Barza M, Pavan PR, Doft BH, Wisniewski SR, Wilson LA, Han DP, et al. Evaluation of microbiological diagnostic techniques in postoperative endophthalmitis in the Endophthalmitis Vitrectomy Study. *Arch Ophthalmol.* 1997 Sep;115(9):1142–50.
4. Dickey JB, Thompson KD, Jay WM. Anterior chamber aspirate cultures after uncomplicated cataract surgery. *Am J Ophthalmol.* 1991 Sep 15;112(3):278–82.
5. Microbiologic factors and visual outcome in the endophthalmitis vitrectomy study. *Am J Ophthalmol.* 1996 Dec;122(6):830–46.
6. Han DP, Wisniewski SR, Wilson LA, Barza M, Vine AK, Doft BH, et al. Spectrum and susceptibilities of microbiologic isolates in the Endophthalmitis Vitrectomy Study. *Am J Ophthalmol.* 1996 Jul;122(1):1–17.
7. Montero JA, Ruiz-Moreno JM, Rodríguez AE, Ferrer C, Sanchis E, Alio JL. Endogenous endophthalmitis by *Propionibacterium acnes* associated with leflunomide and adalimumab therapy. *Eur J Ophthalmol.* 2006;16(2):343–5.

8. Vilela RC, Vilela L, Vilela P, Vilela R, Motta R, Pôssa AP, et al. Etiological agents of fungal endophthalmitis: diagnosis and management. *Int Ophthalmol*. 2013 Oct 1;
9. Pathengay A, Flynn HW, Isom RF, Miller D. Endophthalmitis outbreaks following cataract surgery: causative organisms, etiologies, and visual acuity outcomes. *J Cataract Refract Surg*. 2012 Jul;38(7):1278–82.
10. Taban M, Behrens A, Newcomb RL, Nobe MY, Saedi G, Sweet PM, et al. Acute endophthalmitis following cataract surgery: a systematic review of the literature. *Arch Ophthalmol*. 2005 May;123(5):613–20.
11. Vallejo-Garcia JL, Asencio-Duran M, Pastora-Salvador N, Vinciguerra P, Romano MR. Role of inflammation in endophthalmitis. *Mediators Inflamm*. 2012 Jan;2012:196094.
12. Results of the Endophthalmitis Vitrectomy Study. A randomized trial of immediate vitrectomy and of intravenous antibiotics for the treatment of postoperative bacterial endophthalmitis. Endophthalmitis Vitrectomy Study Group. *Arch Ophthalmol*. 1995 Dec;113(12):1479–96.
13. Callegan MC, Engelbert M, Li DWP, Jett BD, Gilmore MS. Bacterial Endophthalmitis: Epidemiology, Therapeutics, and Bacterium-Host Interactions. 2002;15(1):111–24.
14. Nagaki Y, Hayasaka S, Kadoi C, Matsumoto M, Yanagisawa S, Watanabe K, et al. Bacterial endophthalmitis after small-incision cataract surgery. effect of incision placement and intraocular lens type. *J Cataract Refract Surg*. 2003 Jan;29(1):20–6.
15. Cooper BA, Holekamp NM, Bohigian G, Thompson PA. Case-control study of endophthalmitis after cataract surgery comparing scleral tunnel and clear corneal wounds. *Am J Ophthalmol*. 2003 Aug;136(2):300–5.
16. Kinnear FB, Kirkness CM. Advances in rapid laboratory diagnosis of infectious endophthalmitis. *J Hosp Infect*. 1995 Jun;30 Suppl:253–61.

17. Bodnar Z, Clouser S, Mamalis N. Toxic anterior segment syndrome: Update on the most common causes. *J Cataract Refract Surg.* 2012 Nov;38(11):1902–10.
18. Otsuka H, Kawano H, Sonoda S, Nakamura M, Sakamoto T. Particle-induced endophthalmitis: possible mechanisms of sterile endophthalmitis after intravitreal triamcinolone. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2013 Mar;54(3):1758–66.
19. Marticorena J, Romano V, Gómez-Ulla F. Sterile endophthalmitis after intravitreal injections. *Mediators Inflamm.* 2012 Jan;2012:928123.
20. Furst DE, Breedveld FC, Burmester GR, Crofford L, Emery P, Feldman M, et al. Access to disease modifying treatments for rheumatoid arthritis patients. *Ann Rheum Dis.* 1999 Dec;58 Suppl 1:I129–30.
21. Schaal S, Barr CC. Management of retained lens fragments after cataract surgery with and without pars plana vitrectomy. *J Cataract Refract Surg.* 2009 May;35(5):863–7.
22. Krause L, Bechrakis NE, Heimann H, Kildal D, Foerster MH. Incidence and outcome of endophthalmitis over a 13-year period. *Can J Ophthalmol.* 2009 Feb;44(1):88–94.
23. Aldave AJ, Stein JD, Deramo VA, Shah GK, Fischer DH, Maguire JI. Treatment strategies for postoperative *Propionibacterium acnes* endophthalmitis. *Ophthalmology.* 1999 Dec;106(12):2395–401.
24. Howes EL, Cole PW, Adair TM, Cruse VK, Pollycove M. Cellular and vascular responses in acute experimental ocular inflammation. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1994 Nov;35(12):4031–8.
25. Callegan MC, Booth MC, Jett BD, Gilmore MS. Pathogenesis of gram-positive bacterial endophthalmitis. *Infect Immun.* 1999 Jul;67(7):3348–56.
26. Saleh M, Jehl F, Prevost G, Speeg-Schatz C, Bourcier T. Intérêt des corticoïdes dans la prise en charge de l'endophtalmie postopératoire aiguë bactérienne. *J Fr Ophtalmol.* 2008 Oct;31(8):825–33.

27. Rachitskaya A V, Flynn HW, Fisher YL, Ayres B. Correlation between baseline echographic features of endophthalmitis, microbiological isolates, and visual outcomes. *Clin Ophthalmol*. 2013 Jan;7:779–85.
28. Kumar A, Shamsuddin N. Retinal Muller glia initiate innate response to infectious stimuli via toll-like receptor signaling. *PLoS One*. 2012 Jan;7(1):e29830.
29. Kumar A, Singh CN, Glybina I V, Mahmoud TH, Yu F-SX. Toll-like receptor 2 ligand-induced protection against bacterial endophthalmitis. *J Infect Dis*. 2010 Jan 15;201(2):255–63.
30. Novosad BD, Astley R a, Callegan MC. Role of Toll-like receptor (TLR) 2 in experimental *Bacillus cereus* endophthalmitis. *PLoS One*. 2011 Jan;6(12):e28619.
31. Strunk T, Power Coombs MR, Currie AJ, Richmond P, Golenbock DT, Stoler-Barak L, et al. TLR2 mediates recognition of live *Staphylococcus epidermidis* and clearance of bacteremia. *PLoS One*. 2010 Jan;5(4):e10111.
32. Kumar A, Pandey RK, Miller LJ, Singh PK, Kanwar M. Muller glia in retinal innate immunity: a perspective on their roles in endophthalmitis. *Crit Rev Immunol*. 2013 Jan;33(2):119–35.
33. Kochan T, Singla A, Tosi J, Kumar A. Toll-like receptor 2 ligand pretreatment attenuates retinal microglial inflammatory response but enhances phagocytic activity toward *Staphylococcus aureus*. *Infect Immun*. 2012 Jun;80(6):2076–88.
34. Zlotnik A, Yoshie O. Chemokines: a new classification system and their role in immunity. *Immunity*. 2000 Feb;12(2):121–7.
35. Schett G, Elewaut D, McInnes IB, Dayer J-M, Neurath MF. How cytokine networks fuel inflammation: Toward a cytokine-based disease taxonomy. *Nat Med*. 2013 Jul;19(7):822–4.

36. Hooks JJ, Chan CC, Detrick B. Identification of the lymphokines, interferon-gamma and interleukin-2, in inflammatory eye diseases. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1988 Sep;29(9):1444–51.
37. Feys J, Emond JP, Salvanet-Bouccara A, Dublanchet A. [Interleukin-6 and other cytokines in the aqueous humor in uveitis and endophthalmitis]. *J Fr Ophtalmol.* 1994 Jan;17(11):634–9.
38. Perera P-Y, Lichy JH, Waldmann TA, Perera LP. The role of interleukin-15 in inflammation and immune responses to infection: implications for its therapeutic use. *Microbes Infect.* 2012 Mar;14(3):247–61.
39. Kawashima H. Chemokines--their role in immunotherapy for intraocular inflammation. *Ocul Immunol Inflamm.* 2003 Jun;11(2):83–90.
40. Yoshimura T, Sonoda K, Sugahara M, Mochizuki Y, Enaida H, Oshima Y, et al. Comprehensive analysis of inflammatory immune mediators in vitreoretinal diseases. *PLoS One.* 2009 Jan;4(12):e8158.
41. Campbell KS, Hasegawa J. Natural killer cell biology: an update and future directions. *J Allergy Clin Immunol.* 2013 Sep;132(3):536–44.
42. Kerdiles Y, Ugolini S, Vivier E. T cell regulation of natural killer cells. *J Exp Med.* 2013 Jun 3;210(6):1065–8.
43. Hatvani I, Alberth B. Local lymphokine production in ocular inflammatory diseases. *Can J Ophthalmol.* 1979 Jul;14(3):173–5.
44. Gundorova RA, Makarov P V, Slepova OS, Bordiugova GG, Gankovskaia L V, Kovalchuk L V, et al. [Clinical and immunological criteria of the activity of inflammatory reaction and autolymphokine therapy in penetrating wounds of the eye]. *Vestn Oftalmol.* 1996;112(3):19–21.
45. Horiuchi T, Mitoma H, Harashima S, Tsukamoto H, Shimoda T. Transmembrane TNF-alpha: structure, function and interaction with anti-TNF agents. *Rheumatology (Oxford).* 2010 Jul;49(7):1215–28.

46. Petropoulos IK, Vantzou C V, Lamari FN, Karamanos NK, Anastassiou ED, Pharmakakis NM. Expression of TNF-alpha, IL-1beta, and IFN-gamma in Staphylococcus epidermidis slime-positive experimental endophthalmitis is closely related to clinical inflammatory scores. Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol. 2006 Oct;244(10):1322–8.
47. Abram M, Vu ković D, Wraber B, Dorić M. Plasma cytokine response in mice with bacterial infection. Mediators Inflamm. 2000 Jan;9(5):229–34.
48. Ooi KG-J, Galatowicz G, Calder VL, Lightman SL. Cytokines and chemokines in uveitis: is there a correlation with clinical phenotype? Clin Med Res. 2006 Dec;4(4):294–309.
49. Giese MJ, Sumner HL, Berliner JA, Mondino BJ. Cytokine expression in a rat model of Staphylococcus aureus endophthalmitis. Invest Ophthalmol Vis Sci. 1998 Dec;39(13):2785–90.
50. Ramadan RT, Moyer AL, Callegan MC. A role for tumor necrosis factor-alpha in experimental Bacillus cereus endophthalmitis pathogenesis. Invest Ophthalmol Vis Sci. 2008 Oct;49(10):4482–9.
51. Hessle C, Andersson B, Wold AE. Gram-Positive Bacteria Are Potent Inducers of Monocytic Interleukin-12 (IL-12) while Gram-Negative Bacteria Preferentially Stimulate IL-10 Production Anaerobic. 2000;68(6):3581–6.
52. Geiger K, Howes E, Gallina M, Huang XJ, Travis GH, Sarvetnick N. Transgenic mice expressing IFN-gamma in the retina develop inflammation of the eye and photoreceptor loss. Invest Ophthalmol Vis Sci. 1994 May;35(6):2667–81.
53. Bazzoni F, Beutler B. The tumor necrosis factor ligand and receptor families. N Engl J Med. 1996 Jul 27;334(26):1717–25.
54. Casey LC, Balk RA, Bone RC. Plasma cytokine and endotoxin levels correlate with survival in patients with the sepsis syndrome. Ann Intern Med. 1993 Oct 15;119(8):771–8.

55. Abdul-Hamid A, Bailey S-J. Klebsiella pneumoniae liver abscess and endophthalmitis. *BMJ Case Rep.* 2013 Jan;2013.
56. Modi YS, Epstein A, Smiddy WE, Murray TG, Feuer W, Flynn HW. Retained lens fragments after cataract surgery: outcomes of same-day versus later pars plana vitrectomy. *Am J Ophthalmol.* 2013 Sep;156(3):454–9.e1.
57. Holland SP, Morck DW, Lee TL. Update on toxic anterior segment syndrome. *Curr Opin Ophthalmol.* 2007 Feb;18(1):4–8.
58. Sengupta S, Chang DF, Gandhi R, Kenia H, Venkatesh R. Incidence and long-term outcomes of toxic anterior segment syndrome at Aravind Eye Hospital. *J Cataract Refract Surg.* 2011 Sep;37(9):1673–8.
59. Park Y-H. Toxic anterior segment syndrome after uncomplicated cataract surgery. *Eur J Ophthalmol.* 20(6):1089; author reply 1089–90.
60. Kutty PK, Forster TS, Wood-Koob C, Thayer N, Nelson RB, Berke SJ, et al. Multistate outbreak of toxic anterior segment syndrome, 2005. *J Cataract Refract Surg.* 2008 Apr;34(4):585–90.
61. Ozcelik ND, Eltutar K, Bilgin B. Toxic anterior segment syndrome after uncomplicated cataract surgery. *Eur J Ophthalmol.* 20(1):106–14.
62. Peplow P V, Chatterjee MP. A review of the influence of growth factors and cytokines in in vitro human keratinocyte migration. *Cytokine.* 2013 Apr;62(1):1–21.
63. Rossi D, Zlotnik A. The biology of chemokines and their receptors. *Annu Rev Immunol.* 2000 Jan;18:217–42.
64. Locksley RM, Killeen N, Lenardo MJ. The TNF and TNF receptor superfamilies: integrating mammalian biology. *Cell.* 2001 Feb 23;104(4):487–501.
65. Li J, Yin Q, Wu H. Structural basis of signal transduction in the TNF receptor superfamily. *Adv Immunol.* 2013 Jan;119:135–53.

66. Wahren-Herlenius M, Dörner T. Immunopathogenic mechanisms of systemic autoimmune disease. *Lancet*. 2013 Aug 31;382(9894):819–31.
67. Gadina M, Hilton D, Johnston JA, Morinobu A, Lighvani A, Zhou YJ, et al. Signaling by type I and II cytokine receptors: ten years after. *Curr Opin Immunol*. 2001 Jun;13(3):363–73.
68. Mahmud SA, Manlove LS, Farrar MA. Interleukin-2 and STAT5 in regulatory T cell development and function. *JAK-STAT*. 2013 Jan 1;2(1):e23154.
69. Van Dyken SJ, Locksley RM. Interleukin-4- and interleukin-13-mediated alternatively activated macrophages: roles in homeostasis and disease. *Annu Rev Immunol*. 2013 Jan;31:317–43.
70. Zhu S, Qian Y. IL-17/IL-17 receptor system in autoimmune disease: mechanisms and therapeutic potential. *Clin Sci (Lond)*. 2012 Jun;122(11):487–511.
71. Broughton SE, Dhagat U, Hercus TR, Nero TL, Grimbaldston MA, Bonder CS, et al. The GM-CSF/IL-3/IL-5 cytokine receptor family: from ligand recognition to initiation of signaling. *Immunol Rev*. 2012 Nov;250(1):277–302.
72. Akatsu BKT. Review Interleukin-5 and IL-5 receptor in health and diseases. 2011;87(8).
73. Blouin CM, Lamaze C. Interferon Gamma Receptor: The Beginning of the Journey. *Front Immunol*. 2013 Jan;4:267.
74. Ishigame H, Nakajima A, Saijo S, Komiyama Y, Nambu A, Matsuki T, et al. The role of TNFalpha and IL-17 in the development of excess IL-1 signaling-induced inflammatory diseases in IL-1 receptor antagonist-deficient mice. *Ernst Schering Res Found Workshop*. 2006 Jan;(56):129–53.
75. Ceredig R, Rolink AG. The key role of IL-7 in lymphopoiesis. *Semin Immunol*. 2012 Jul;24(3):159–64.

76. Vignali DAA, Kuchroo VK. IL-12 family cytokines: immunological playmakers. *Nat Immunol.* 2012 Aug;13(8):722–8.
77. Bonig H, Papayannopoulou T. Mobilization of hematopoietic stem/progenitor cells: general principles and molecular mechanisms. *Methods Mol Biol.* 2012 Jan;904:1–14.
78. Koss MJ, Pfister M, Koch FH. Inflammatory and angiogenic protein detection in the human vitreous: cytometric bead assay. *J Ophthalmol.* 2011 Jan;2011:459251.
79. Simó R, Carrasco E, García-Ramírez M, Hernández C. Angiogenic and antiangiogenic factors in proliferative diabetic retinopathy. *Curr Diabetes Rev.* 2006 Feb;2(1):71–98.
80. Schulze-Bonsel K, Feltgen N, Burau H, Hansen L, Bach M. Visual acuities “hand motion” and “counting fingers” can be quantified with the freiburg visual acuity test. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2006 Mar;47(3):1236–40.
81. Kouro T, Takatsu K. IL-5- and eosinophil-mediated inflammation: from discovery to therapy. 2009;21(12):1303–9.
82. Fossiez F, Djossou O, Chomarat P, Flores-Romo L, Ait-Yahia S, Maat C, et al. T cell interleukin-17 induces stromal cells to produce proinflammatory and hematopoietic cytokines. *J Exp Med.* 1996 Jul 1;183(6):2593–603.
83. Okada A a, Goto H, Ohno S, Mochizuki M. Multicenter study of infliximab for refractory uveoretinitis in Behçet disease. *Arch Ophthalmol.* 2012 May 1;130(5):592–8.



APÊNDICES

ARTIGO ORIGINAL

Analysis of Cytokines, Chemokines and Growth Factors in Acute Infectious Endophthalmitis Following Cataract Extraction

Paulo Escarião^{1,2,3}, Alessandra Goncalves Commodaro⁴, Tiago Arantes^{2,3}, Célia M.
M. B. de Castro⁵, Maria de Fátima A. Diniz⁵, Carlos Teixeira Brandt¹

¹Department of Surgery, Federal University of Pernambuco, Brazil;

²Altino's Ventura Foundation, Recife, Pernambuco, Brazil;

³Pernambuco Eye Hospital, Brazil;

⁴Department of Ophthalmology, Federal University of Sao Paulo, Sao Paulo, Brazil.

⁵Laboratory of Immunopathology Keiso Asami (LIKA), Federal University of Pernambuco, Brazil.

Addresses for correspondence: Paulo Escarião

E-mail: phescario@hotmail.com

Tel: +55 (81) 2126.8000

Universidade Federal de Pernambuco - UFPE

Av. Prof. Moraes Rego, 1235 - Cidade Universitária

Recife - PE CEP 50670-901

Abstract

Purpose. To analyze the involvement of cytokines, chemokines and growth factors in acute infectious endophthalmitis following cataract extraction surgery.

Methods. Vitreous humor samples were collected from 18 patients. The Bio-Plex technique was used to measure IL-1ra, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-12 (p70), IL-13, IL-15, IL-17, basic FGF, eotaxin, G-CSF, GM-CSF, IFN- γ , MCP-1, MIP-1a, MIP-1b, PDGF-BB, RANTES, TNF- α and VEGF for comparison with levels in 39 patients undergoing vitrectomy for a non-infectious disease (control).

Results. IL-1ra, IL-2, IL-4, IL-6, IL-8, IL-9, IL-10, IL-15, IL-17, eotaxin, bFGF, G-CSF, GM-CSF, IFN- γ , MCP-1, MIP-1a, MIP-1b, PDGF-BB, RANTES and TNF- α levels were significantly higher ($p < 0.05$) in eyes with endophthalmitis. There were no significant differences between groups for IL-5, IL-12 (p70), IL-13 and VEGF levels. IL-7 levels were higher in the control group ($p = 0.0229$). Considering the different diagnoses in the control group, only IL-5 was not significantly different between groups ($p = 0.1764$). There were strong positive correlations between TNF- α and IFN- γ , IL-2 and eotaxin ($r > 0.8$, $p < 0.05$) and a moderate positive correlation between TNF- α and the initial visual acuity ($r = 0.59$, $p = 0.0096$). There was no correlation with the initial or final visual acuity for the other factors measured.

Conclusions. Infectious endophthalmitis following cataract extraction stimulates the production of cytokines, chemokines and growth factors. Levels of TNF- α may be related to the severity of the initial inflammatory processes. No inflammatory factor that could predict the final visual acuity was evident in the present study.

Introduction

Infectious endophthalmitis is characterized by an inflammation of the intraocular tissues as a result of bacterial or fungal proliferation in the vitreous cavity following surgical procedures, trauma or endogenous dissemination.¹ Its incidence after cataract surgery varies between 0.087% and 0.265%.^{2,3} It can also be caused by non-infectious processes, such as immune system reactions resulting from autoimmunity, toxic agents in certain drug formulations, vasculitis or neoplasms.^{1,2,4} The progression of this condition can be serious, including the potential risk of vision loss and bulbar atrophy. Treatment consists of the rapid administration of intravitreal antibiotics or posterior vitrectomy procedures.⁵

The ability of bacteria to cause inflammation in the vitreous cavity is dependent on the virulence of the microorganism, such as rapid replication and the production of toxins that cause inflammation. The bacterial cell wall contains molecules with pro-inflammatory activity, such as lipoteichoic acid, peptidoglycan and polysaccharides.^{3,6,7} These molecules are capable of inducing inflammatory processes even if the microorganism is quiescent. Bacteria can produce various enzymes, such as proteases, collagenases and hyaluronidases, which can damage the host tissues.³ In addition to tissue injury caused by bacterial growth and the production of toxins, excessive immune responses and inflammation may also be responsible for damage to intraocular tissues, including direct damage to the photoreceptors, injury to the corneal endothelium, pupillary-block glaucoma, and retinal detachment.⁸

The response of the innate immune system to recognizing bacterial antigens includes the activation of toll-like receptors (TLRs), including TLR-2.⁹ These receptors have been identified in retinal cells such as the retinal pigment epithelium, iris epithelium and Muller cells.¹⁰ TLR activation can lead to the production of inflammatory factors, known as cytokines, that participate in the host response and whose release is critical for the elimination of infectious agents and consequent smaller tissue damage. Cytokines are produced by macrophages, lymphocytes, natural killer cells, retinal pigment epithelial (RPE) cells and other immune cells in response to certain stimuli. They participate in various activities in host defense, including the recognition of infectious agents, leukocyte recruitment, the repair of damaged tissue and the breakdown of the blood-retinal barrier.¹¹⁻¹³

Experimental studies of infectious endophthalmitis have shown that cytokines, including tumor necrosis factor alpha (TNF- α) and interferon gamma (IFN- γ), are expressed in the vitreous cavity.^{11,14-17} However, little is known about cytokine expression in humans suffering from acute infectious endophthalmitis.¹ The objective of this study was to analyze the involvement of inflammatory factors and growth factors in acute post-infectious endophthalmitis in humans using the Bio-Plex/ multiplex technique.

Methods

Study population

Vitreous humor samples were collected from 18 patients examined in the emergency department at the Altino Ventura Foundation (Fundação Altino Ventura – Recife-PE, Brazil) who presented with clinical signs consistent with acute endophthalmitis following cataract extraction between March 2011 and October 2012. An ophthalmologic examination was performed by measuring the corrected visual acuity using the Snellen chart (with conversion to the logMAR),¹⁸ slit-lamp biomicroscopy of the anterior and posterior segments and indirect ophthalmoscopy. For a diagnosis of endophthalmitis, the clinical criteria established by the Endophthalmitis Study Group were used.¹⁹ The cultures were positive for 11 patients (64.7%), in which *Staphylococcus epidermidis* was the infectious agent in nine cases (81.8% of those with positive cultures). One culture was positive for *Staphylococcus aureus*, and one culture was positive for *Streptococcus viridans*. The characteristics of the study population are summarized in Table 1. Samples were collected from 39 patients undergoing vitrectomy for non-infectious diseases (RD: retinal detachment, MH/ERM: macular hole/epirretinal membrane and DR: diabetic retinopathy) and were included in the study as controls. The study was approved by the Ethics Committee of the Federal University of Pernambuco [Universidade Federal de Pernambuco], and adhered to the tenets of the Declaration of Helsinki. All patients provided written informed consent.

Bio-Plex

The samples were centrifuged at 5,000 rpm for 10 minutes and then stored at -80°C until the analysis. The Bio-Plex Pro™ Human Cytokine Assay kit (BIO-RAD®, Hercules, VA) was used and was able to identify the following cytokines: interleukin (IL)-1ra, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-12 (p70), IL-13, IL-15, IL-17, basic fibroblast growth factor (bFGF), eotaxin, granulocyte colony-stimulating growth factor (G-CSF), granulocyte-macrophage colony-stimulating growth factor (GM-CSF), interferon- γ (IFN- γ), monocyte chemotactic protein (MCP-1), macrophage inflammatory protein-1 α (MIP-1a), macrophage inflammatory protein-1 β (MIP-1b), platelet-derived growth factor-BB (PDGF-BB), RANTES (regulated on activation,

normal T cell expressed and secreted), tumor necrosis factor- α (TNF- α) and vascular endothelial growth factor (VEGF).

Statistical analysis

The nonparametric Mann-Whitney U test was used to analyze the cytokines data between the study and the control groups. To analyze the correlation between parametric variables it was used the Pearson's test and for nonparametric or nonlinear variables, the Spearman test. To compare cytokines concentrations in the study group with each control subgroup (RD, MH/ERM and DR) it was used the Kruskal-Wallis test and the Duncan *post hoc* test. The Shapiro-Wilk test was performed to verify the assumption of data's normally distribution. The p -value < 0.05 was considered statistically significant to reject the null hypothesis. Statistical calculations were performed with SPSS (Statistical Package for Social Science) version 21.0 and STATA version 11.0.

Results

Levels of cytokines, chemokines and growth factors

The levels of growth factors G-CSF, GM-CSF and PDGF-BB were found to be significantly higher in patients with endophthalmitis compared to the non-infectious eye disease/control group (Figure 1A). Similarly, the levels of chemokines eotaxin, IL-8, MCP-1, MIP-1a and MIP-1b were also significantly higher in patients with endophthalmitis compared to all of the control groups together (Figure 1B). In regard to the cytokine profile, we observed increased levels of IL-2, IL-1ra, IFN- γ , IL-4, IL-10, IL-15, IL-17 and TNF- α in the vitreous humor from patients with endophthalmitis compared to the control group (Figure 1C). In contrast, the levels of IL-7 were significantly higher in the control group (Figure 1C). Table 2.

The Kruskal-Wallis test was used, followed by Duncan's post-hoc test, to evaluate potential statistically significant differences between patients with endophthalmitis and patients in each control group, considering the different diagnoses in this group. Only IL-5 showed no statistically significant difference between groups (Table 3).

There was a positive correlation between the levels of TNF- α and inflammatory cytokines (IFN- γ , IL-2, IL-6 and IL-17), chemokines (IL-8, eotaxin, MIP-1a, MIP-1b, RANTES), repair cytokines (VEGF), anti-inflammatory cytokines (IL-1ra, IL-4, IL-10 and IL-13) and hematopoietic cytokines (IL-9) (Table 4).

Visual acuity

The patients in the case group had a mean pre-operative logMAR visual acuity of 2.3 ± 0.087 and a post-operative logMAR visual acuity of 0.92 ± 0.217 , a statistically significant ($p = 0.0001$) difference.

There was a moderate positive correlation between the levels of TNF- α and the initial visual acuity expressed in logMAR ($r = 0.59$, $p = 0.0096$ - Spearman). For the other cytokines, there was no correlation between their levels and the initial visual acuity. There was also no correlation between the cytokine levels and the final visual acuity.

Discussion

The inflammatory process generated during endophthalmitis is critical for elimination of the infectious agent. Recognition of the microorganism and the subsequent activation of immune cells lead to the secretion of inflammatory factors that are involved in the clearance of the pathogen as well as the modulation of the immune system.³ This project is the first *in vivo* study to evaluate the inflammatory response through the measurement of cytokine levels in patients with acute endophthalmitis following cataract extraction.

This study analyzed the profile of growth factors, chemokines and cytokines in the vitreous humor of patients with endophthalmitis. Experimental studies have already shown that infectious endophthalmitis can induce the expression of cytokines.^{11,14-17} Petropoulos et al.¹¹ inoculated *Staphylococcus epidermidis* strains into the eyes of *Lewis* rats and quantified the cytokines TNF- α , IL-1 β and IFN- γ , comparing their levels with the intensity of the inflammatory process. The relationship between the inflammatory process and cytokine levels was also observed in the present study. These cytokines could not be detected in the blood, suggesting that their production is local. Giese et al.¹⁴ used viable colonies of *Staphylococcus aureus* to induce endophthalmitis in the eyes of rats and studied the production of TNF- α , IL-1 β , cytokine-induced neutrophil chemoattractant (CINC) and IFN- γ . CINC is the equivalent of IL-8 in humans. The study showed an increase in the four cytokines studied, showing a relationship with the inflammatory process.

We observed higher production of cytokines, chemokines and growth factors involved in several phases of the inflammatory process: recognition of the microorganism, leukocyte recruitment, pathogen clearance and tissue repair. TNF- α

is one of the cytokines that emerge early during the inflammatory process and has the ability to stimulate other cytokines.^{1,2} The correlation between production of TNF- α , IFN- γ , IL-1ra, IL-2, IL-4, IL-6, IL-17, IL-8, eotaxin, MIP-1a, MIP-1b, VEGF, IL-12 and IL-13 could suggest that the same stimulus is leading to the production of these factors or even that TNF- α itself could be stimulating their production.

Toll-like receptors (TLRs) play a critical role in the early innate immune response to invading pathogens by sensing microorganisms.³⁻⁷ TLRs 2, 4 and 9 have been shown to be expressed in certain tissues of the posterior segment of the eye, such as the retinal pigment epithelium and the choroid, suggesting that they participate as mediators of bacterial invasion of the posterior segment.⁹

Novosad et al.²² observed that TLR-2 receptors were an important component in the initial response to endophthalmitis caused by *B. cereus*. Strunk et al.²³ analyzed the involvement of the TLR-2 receptors in infections caused by *S. epidermidis* and reported that cytokine and chemokine production was mediated by TLR-2 activation. TLR-2-deficient mice showed decreased IL-6, IL-10, G-CSF and TNF- α production, decreased leukocyte migration and a reduced ability to eliminate infectious agents. The activation of TLR-2 receptors by Gram-positive bacterial antigens stimulates the production of inflammatory cytokines such as TNF- α and chemokines. In turn, the increase in TNF- α secretion caused by the activation of these receptors also stimulates the production of chemokines that promote chemotaxis and the recruitment of leukocytes to the infection site.^{22,23}

There was a correlation between the TNF- α levels and all of the chemokines assayed, except for MCP-1 ($r = 0.1785$, $p = 0.4784$). PDGF-BB is considered an inducer of MCP-1 production by astrocytes.²⁴ There was no correlation between TNF- α and PDGF-BB or MCP-1, suggesting that there is another pathway for the production of these cytokines.

Fourteen of the 25 measured cytokines (IL-1ra, IL-2, IL-4, IL-6, IL-8, IL-17, eotaxin, G-CSF, GM-CSF, IFN- γ , MIP-1a, MIP-1b, PDGF-BB and TNF- α) had higher levels when compared to the three diagnosis of the control group. With the exception of IL-7 (higher in patients with diabetic retinopathy) and IL-5, all of the other cytokines had higher levels in patients with endophthalmitis compared to control patients suffering from maculopathy. Patients with idiopathic macular holes or epiretinal membranes associated with changes in the vitreoretinal interface did not present with significant intraocular inflammatory changes or retinal ischemia.²⁵

No statistically significant differences in the IL-5 levels were observed between groups, suggesting that this cytokine does not participate in acute infectious endophthalmitis. IL-5 is produced by Th2 lymphocytes in response to stimulation by allergens, *Mycobacterium tuberculosis* and *Toxocara canis*, and it stimulates the differentiation and proliferation of eosinophils, which are characterized as a mediator of allergic processes such as asthma.²⁶ Because the primary causative agent of acute endophthalmitis is *Staphylococcus epidermidis*, it is not likely that IL-5 has any significant involvement in ocular immune responses.

IL-7 is a hematopoietic growth factor that is produced by stromal cells in lymphoid tissue in the thymus and bone marrow and that participates in the expansion of the immature precursors of T and B lymphocytes.²⁷ IL-7 participates in the immune response to HIV and neoplastic processes such as lymphoma and acute lymphoblastic leukemia. There was no evidence in this study that IL-7 plays a role in acute infectious endophthalmitis. There was, however, an increase in the vitreous levels of IL-7 in patients with diabetic retinopathy.

G-CSF and GM-CSF are also considered hematopoietic cytokines and act on bone marrow progenitors to stimulate leukocyte production. G-CSF can also be produced at the infection site and acts as an endocrine hormone in the bone marrow.²⁸ Activated T-cells, macrophages and endothelial cells can express both these cytokines. There was an increase in the G-CSF and GM-CSF levels in patients with acute infectious endophthalmitis, suggesting their involvement in the inflammatory process. IL-17 has been shown to induce the production of G-CSF and GM-CSF.^{28,29}

There was a positive correlation between the initial visual acuity and the vitreous levels of TNF- α . In one patient with infectious endophthalmitis, the visual acuity may reflect the intensity of the inflammatory process. As the inflammatory reaction in the vitreous cavity and the anterior chamber increases, the media opacity also increases, hindering the passage of light to the retina and decreasing visual acuity. In one experimental study, a relationship between the levels of TNF- α in the vitreous humor and the intensity of the inflammatory process was observed.¹¹

The initial visual acuity is a determining factor in the selection of treatment for these patients. The Endophthalmitis Vitrectomy Study (EVS), developed in the 1990s and still used today, concluded that patients whose visual acuity was hand motions or better should be treated with the injection of intravitreal antibiotics. Patients with

light perception vision should be treated with vitrectomy combined with the injection of intravitreal antibiotics.¹⁹ If the TNF- α levels are related to the initial visual acuity and the intensity of the inflammatory process, it may eventually be used as a marker to help retinologists decide between treatment with posterior vitrectomy or intravitreal injection.

The inflammatory process can damage the corneal endothelium through the formation of a severe opacity, which may require corneal transplantation, a fibrin pupillary block and posterior synechiae, including the development of glaucoma, and severe vitreoretinal proliferation in patients with retinal detachment. It is possible to pharmacologically control the inflammatory process. Intravitreal corticosteroids are frequently used in cases of bacterial acute infectious endophthalmitis because the immune reaction itself may damage the ocular structures.⁸

Medications that block TNF- α , which consist of monoclonal antibodies including infliximab, adalimumab and certolizumab, are also available. These medications are used in the treatment of autoimmune diseases such as rheumatoid arthritis, and their benefits have already been demonstrated in several studies.³⁰ Although these medications can reduce the inflammation associated with certain pathologies, their benefits in acute infectious endophthalmitis are not well defined.

In an experimental study, Ramadan et al.¹⁵ evaluated the role of TNF- α in the pathogenesis of *Bacillus cereus*-induced endophthalmitis. In that study, the authors used a TNF- α non-producing mouse strain and compared it to control mice. The authors concluded that the TNF- α non-producing mice had decreased migration of polymorphonuclear leukocytes, despite the increased synthesis of IL-6, keratinocyte chemokine (KC), MIP-1 α and IL-1 β , resulting in reduced ocular inflammation. However, a histological evaluation showed a significant loss and atrophy of the retinal architecture compared to TNF- α -producing mice. These data suggest that TNF- α -non-producing mice may have a more severe disease course, including greater vision loss due to the increased retinal damage, despite the reduced inflammation.

In an experimental model, Geiger et al.¹⁷ reported the destruction of photoreceptors and retinal degeneration in mice that received IFN- γ by an intravitreal route. IFN- γ induced glial cells to express class I and II major histocompatibility complex (MHC) antigens and induced retinal pigment epithelial cells to express class

II MHC antigens. The activation of retinal pigment epithelial cells could increase the phagocytosis and subsequent loss of photoreceptors.

However, there was no correlation between TNF- α , IFN- γ or any other cytokine with the final visual acuity. In this study, the cytokine levels could not be used as a prognostic marker for infectious endophthalmitis.

Acknowledgments

The authors thank Roberta Facioli, technical and scientific advisor in the Science Pro Laboratory, São Paulo, Brazil, for the measurement of cytokine levels; Professor Edmilson Mazza of the Federal University of Pernambuco [Universidade Federal de Pernambuco], Brazil, for his assistance with the statistical analysis; and Dr. Vasco Bravo Filho for coordinating the logistics of measuring and storing the cytokines.

References

1. Callegan MC, Engelbert M, Parke DW 2nd, Jett BD, Gilmore MS. Bacterial endophthalmitis: epidemiology, therapeutics, and bacterium-host interactions. *Clin Microbiol Rev.* 2002;15:111-124.
2. Taban M, Behrens A, Newcomb RL, et al. Acute endophthalmitis following cataract surgery: a systematic review of the literature. *Arch Ophthalmol.* 2005;123:613-620.
3. Vallejo-Garcia JL, Asencio-Duran M, Pastora-Salvador N, Vinciguerra P, Romano MR. Role of inflammation in endophthalmitis. *Mediators Inflamm.* 2012;2012:196094.
4. Kinnear FB, Kirkness CM. Advances in rapid laboratory diagnosis of infectious endophthalmitis. *J Hosp Infect.* 1995;30 Suppl:253-261.
5. Krause L, Bechrakis NE, Heimann H, Kildal D, Foerster MH. Incidence and outcome of endophthalmitis over a 13-year period. *Can J Ophthalmol.* 2009;44:88-94.

6. Howes EL Jr, Cole PW, Adair TM, Cruse VK, Pollycove M. Cellular and vascular responses in acute experimental ocular inflammation. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 1994;35:4031-4038.
7. Callegan MC, Booth MC, Jett BD, Gilmore MS. Pathogenesis of gram-positive bacterial endophthalmitis. *Infect Immun*. 1999;67:3348-3356.
8. Saleh M, Jehl F, Prevost G, Speeg-Schatz C, Bourcier T. Intérêt des corticoïdes dans la prise en charge de l'endophtalmie postopératoire aiguë bactérienne. *J Fr Ophtalmol*. 2008;31:825-833.
9. Kumar A, Singh CN, Glybina IV, Mahmoud TH, Yu FS. Toll-like receptor 2 ligand-induced protection against bacterial endophthalmitis. *J Infect Dis*. 2010;201:255-263.
10. Kumar A, Shamsuddin N. Retinal Muller glia initiate innate response to infectious stimuli via toll-like receptor signaling. *PLoS One*. 2012;7:e29830.
11. Petropoulos IK, Vantzou CV, Lamari FN, Karamanos NK, Anastassiou ED, Pharmakakis NM. Expression of TNF-alpha, IL-1beta, and IFN-gamma in Staphylococcus epidermidis slime-positive experimental endophthalmitis is closely related to clinical inflammatory scores. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*. 2006;244:1322-1328.
12. Abram M, Vu ković D, Wraber B, Dorić M. Plasma cytokine response in mice with bacterial infection. *Mediators Inflamm*. 2000;9:229-234.
13. Ooi KG, Galatowicz G, Calder VL, Lightman SL. Cytokines and chemokines in uveitis: is there a correlation with clinical phenotype? *Clin Med Res*. 2006;4:294-309.
14. Giese MJ, Sumner HL, Berliner JA, Mondino BJ. Cytokine expression in a rat model of Staphylococcus aureus endophthalmitis. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 1998;39:2785-2790.

15. Ramadan RT, Moyer AL, Callegan MC. A role for tumor necrosis factor-alpha in experimental *Bacillus cereus* endophthalmitis pathogenesis. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2008;49:4482-4489.
16. Hessle C, Andersson B, Wold AE. Gram-positive bacteria are potent inducers of monocytic interleukin-12 (IL-12) while gram-negative bacteria preferentially stimulate IL-10 production. *Infect Immun*. 2000;68:3581-3586.
17. Geiger K, Howes E, Gallina M, Huang XJ, Travis GH, Sarvetnick N. Transgenic mice expressing IFN-gamma in the retina develop inflammation of the eye and photoreceptor loss. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 1994;35:2667-2681.
18. Schulze-Bonsel K, Feltgen N, Burau H, Hansen L, Bach M. Visual acuities “hand motion” and “counting fingers” can be quantified with the freiburg visual acuity test. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2006;47:1236-1240.
19. Results of the Endophthalmitis Vitrectomy Study. A randomized trial of immediate vitrectomy and of intravenous antibiotics for the treatment of postoperative bacterial endophthalmitis. Endophthalmitis Vitrectomy Study Group. *Arch Ophthalmol*. 1995;113:1479-1496.
20. Bazzoni F, Beutler B. The tumor necrosis factor ligand and receptor families. *N Engl J Med*. 1996;334:1717-1725.
21. Kochan T, Singla A, Tosi J, Kumar A. Toll-like receptor 2 ligand pretreatment attenuates retinal microglial inflammatory response but enhances phagocytic activity toward *Staphylococcus aureus*. *Infect Immun*. 2012;80:2076-2088.
22. Novosad BD, Astley RA, Callegan MC. Role of Toll-like receptor (TLR) 2 in experimental *Bacillus cereus* endophthalmitis. *PLoS One*. 2011;6:e28619.
23. Strunk T, Power Coombs MR, Currie AJ, et al. TLR2 mediates recognition of live *Staphylococcus epidermidis* and clearance of bacteremia. *PLoS One*. 2010;5:e10111.
24. Bethel-Brown C, Yao H, Hu G, Buch S. Platelet-derived growth factor (PDGF)-BB-mediated induction of monocyte chemoattractant protein 1 in human

- astrocytes: implications for HIV-associated neuroinflammation. *J. Neuroinflammation*. 2012;9:262.
25. Yoshimura T, Sonoda K, Sugahara M, et al. Comprehensive analysis of inflammatory immune mediators in vitreoretinal diseases. *PLoS One*. 2009;4:e8158.
26. Kouro T, Takatsu K. IL-5- and eosinophil-mediated inflammation: from discovery to therapy. *Int Immunol*. 2009;21:1303-1309.
27. Ceredig R, Rolink AG. The key role of IL-7 in lymphopoiesis. *Semin Immunol*. 2012;24:159-164.
28. Bonig H, Papayannopoulou T. Mobilization of hematopoietic stem/progenitor cells: general principles and molecular mechanisms. *Methods Mol Biol*. 2012;904:1-14.
29. Fossiez F, Djossou O, Chomarat P, et al. T cell interleukin-17 induces stromal cells to produce proinflammatory and hematopoietic cytokines. *J Exp Med*. 1996;183:2593-2603.
30. Feldman M, Taylor P, Paleolog E, Brennan FM, Maini RN. Anti-TNF alpha therapy is useful in rheumatoid arthritis and Crohn's disease: analysis of the mechanism of action predicts utility in other diseases. *Transplant Proc*. 1998;30:4126-4127.

Table 1. Clinical parameters of the patients

Patients #	Sex	Age	VA before	Treatment	VA after	Time – surgery/exam (days)
1	M	82	LP	PPV + IV ATB (02)	20/60	30
2	F	70	LP	PPV + IV ATB (01)	HM	6
3	F	62	HM	IV ATB (01)	20/40	14
4	F	60	LP	PPV + IV ATB (01)	20/40	8
5	F	72	LP	PPV + IV ATB (01)	20/40	6
6	F	62	LP	PPV + IV ATB (02)	20/25	3
7	M	75	LP	PPV	LP	40
8	F	72	HM	IV ATB (01)	20/160	30
9	F	51	20/150	IV ATB (02)	20/100	14
10	M	48	HM	IV ATB (02)	20/100	10
11	M	62	HM	IV ATB (01)	20/50	7
12	M	56	HM	IV ATB (03)	20/100	5
13	M	86	LP	PPV + IV ATB (01)	HM	5



Análise de citocinas, quimiocinas e fatores de crescimento
em endoftalmite infecciosa aguda pós-facectomia

14	M	72	HM	IV ATB (03)	20/25	6
15	F	75	CF	IV ATB (02)	20/100	16
16	M	54	HM	IV ATB (02)	20/32	12
17	F	76	LP	PPV	NLP	29
18	M	61	HM	IV ATB (03)	20/63	4

VA: visual acuity; LP: light perception; HM: hands movement; CF: count fingers; PPV: posterior *pars plana* vitrectomy; IV: intravitreal; ATB: antibiotics

Table 2. Cytokines, chemokines and growth factors concentrations (pg/ml) in the endophthalmitis and control groups

Cytokines/ Chemokines and Growth Factors	Groups (mean $\pm$ SEM)		p Value
	Endophthalmitis (N=18)	Control (N=39)	
IL-1ra	774.0 $\pm$ 245.6	9.3 $\pm$ 1.4	<0.0001
IL-2	9.7 $\pm$ 1.2	1.4 $\pm$ 0.2	<0.0001
IL-4	1.3 $\pm$ 0.2	0.2 $\pm$ 0.1	<0.0001
IL-5	1.0 $\pm$ 0.4	0.5 $\pm$ 0.1	0.3170
IL-6	3158.3 $\pm$ 28.9	95.3 $\pm$ 31.8	<0.0001
IL-7	5.1 $\pm$ 1.0	9.2 $\pm$ 1.2	0.0229
IL-8	5022.5 $\pm$ 1305.5	31.5 $\pm$ 5.4	<0.0001
IL-9	13.7 $\pm$ 1.9	5.4 $\pm$ 0.8	<0.0001



Análise de citocinas, quimiocinas e fatores de crescimento
em endoftalmite infecciosa aguda pós-facectomia

IL-10	66.0 ± 17.8	7.0 ± 1.9	<0.0001
IL-12p70	31.9 ± 12.0	49.6 ± 14.9	0.452
IL-13	6.3 ± 1.5	6.0 ± 1.4	0.3283
IL-15	9.9 ± 1.3	5.3 ± 0.6	<0.0001
IL-17	89.7 ± 56.5	3.1 ± 0.2	<0.0001
Eotaxin	34.3 ± 3.9	8.5 ± 1.0	<0.0001
bFGF	26.6 ± 13.8	18.8 ± 6.4	0.005
G-CSF	6906.8 ± 847.6	11.7 ± 4.0	<0.0001
GM-CSF	66.9 ± 9.6	34.7 ± 2.3	<0.0001
IFN-γ	98.3 ± 12.1	25.3 ± 5.1	<0.0001
MCP-1	4498.5 ± 1428.4	850.6 ± 143.2	0.0036
MIP-1a	74.1 ± 27.8	0.9 ± 0.2	<0.0001
MIP-1b	231.9 ± 64.2	11.9 ± 1.4	<0.0001
PDGF	30.8 ± 4.8	8.8 ± 1.8	<0.0001
RANTES	18.8 ± 5.1	14.5 ± 6.0	0.0004
TNF-α	49.1 ± 5.9	3.7 ± 0.4	<0.0001
VEGF	491.7 ± 251.6	523.1 ± 178.5	0.6930



Table 3. Cytokines, chemokines and growth factors concentrations (pg/ml) in the endophthalmitis and each control subgroup according to diagnosis.

Cytokines/ Chemokines and Growth Factors	Endophthalmitis (mean $\pm$ SEM)	Controls (mean $\pm$ SEM)			p Value
		RD N=17	MH/ERM N=7	DR N=15	
IL-1ra	774.0 $\pm$ 245.6	12.2 $\pm$ 2.9 *	3.8 $\pm$ 0.8 *	8.6 $\pm$ 1.3 *	<0.0001
IL-2	9.7 $\pm$ 1.2	1.3 $\pm$ 0.1 *	0.6 $\pm$ 0.2 *	1.9 $\pm$ 0.3 *	<0.0001
IL-4	1.3 $\pm$ 0.2	0.3 $\pm$ 0.2 *	0.1 $\pm$ 0.0 *	0.2 $\pm$ 0.0 *	<0.0001
IL-5	1.0 $\pm$ 0.4	0.4 $\pm$ 0.1	0.3 $\pm$ 0.0	0.8 $\pm$ 0.2	0.1764
IL-6	3158.3 $\pm$ 28.9	151.1 $\pm$ 69.1 *	8.0 $\pm$ 3.8 *	72.8 $\pm$ 20.4 *	<0.0001
IL-7	5.1 $\pm$ 1.0	8.2 $\pm$ 1.6	3.8 $\pm$ 1.0	13.0 $\pm$ 2.2 *	0.0013
IL-8	5022.5 $\pm$ 1305.5	24.9 $\pm$ 5.0 *	8.5 $\pm$ 2.1 *	49.8 $\pm$ 11.4 *	<0.0001
IL-9	13.7 $\pm$ 1.9	4.0 $\pm$ 0.5 *	2.5 $\pm$ 0.6 *	8.5 $\pm$ 1.6	<0.0001
IL-10	66.0 $\pm$ 17.8	2.2 $\pm$ 0.5 *	0.7 $\pm$ 0.1 *	15.7 $\pm$ 4.1	<0.0001
IL-12p70	31.9 $\pm$ 12.0	12.4 $\pm$ 4.8	0.5 $\pm$ 0.1 *	112.1 $\pm$ 31.7	<0.0001
IL-13	6.3 $\pm$ 1.5	3.3 $\pm$ 0.9	0.9 $\pm$ 0.1 *	11.6 $\pm$ 2.9	0.0002
IL-15	9.9 $\pm$ 1.3	5.8 $\pm$ 1.2	3.0 $\pm$ 0.5 *	5.9 $\pm$ 0.7	0.0018
IL-17	89.7 $\pm$ 56.5	3.4 $\pm$ 0.4 *	2.8 $\pm$ 0.8 *	2.8 $\pm$ 0.3 *	<0.0001
Eotaxin	34.3 $\pm$ 3.9	6.5 $\pm$ 1.0 *	6.0 $\pm$ 0.6 *	11.8 $\pm$ 2.2 *	<0.0001
bFGF	26.6 $\pm$ 13.8	39.3 $\pm$ 13.2	1.5 $\pm$ 0.4 *	3.6 $\pm$ 0.6 *	<0.0001
G-CSF	6906.8 $\pm$ 847.6	20.5 $\pm$ 9.2 *	5.9 $\pm$ 1.0 *	11.5 $\pm$ 6.3 *	<0.0001
GM-CSF	66.9 $\pm$ 9.6	33.5 $\pm$ 3.0 *	33.1 $\pm$ 6.1 *	36.9 $\pm$ 4.0 *	0.0002



Análise de citocinas, quimiocinas e fatores de crescimento
em endoftalmite infecciosa aguda pós-facectomia

IFN- γ	98.3 $\pm$ 12.1	16.3 $\pm$ 3.5 *	2.7 $\pm$ 0.7 *	46.1 $\pm$ 10.7 *	<0.0001
MCP-1	4498.5 $\pm$ 1428.4	1035.4 $\pm$ 291.3	256.5 $\pm$ 66.0 *	918.4 $\pm$ 138.2	0.0006
MIP-1 α	74.1 $\pm$ 27.8	1.2 $\pm$ 0.3 *	0.3 $\pm$ 0.0 *	1.0 $\pm$ 0.1 *	<0.0001
MIP-1 β	231.9 $\pm$ 64.2	15.2 $\pm$ 2.4 *	4.0 $\pm$ 0.9 *	12.1 $\pm$ 1.7 *	<0.0001
PDGF	30.8 $\pm$ 4.8	10.1 $\pm$ 3.7 *	2.7 $\pm$ 0.5 *	10.4 $\pm$ 2.1 *	<0.0001
RANTES	18.8 $\pm$ 5.1	20.7 $\pm$ 12.3	1.0 $\pm$ 0.2 *	13.6 $\pm$ 7.0	<0.0001
TNF- α	49.1 $\pm$ 5.9	3.4 $\pm$ 0.6 *	3.3 $\pm$ 0.6 *	4.2 $\pm$ 0.8 *	<0.0001
VEGF	491.7 $\pm$ 251.6	116.5 $\pm$ 49.0	3.7 $\pm$ 0.9 *	1199.1 $\pm$ 395.3 *	<0.0001

* Statistically significant compared to the group with endophthalmitis ($p < 0.05$)



Table 4. Correlation between TNF- α and the different cytokines

Chemokines	p Value
Eotaxin	0.8611 (<0.0001)
IL-8	0.7172 (0.0008)
MCP-1	0.1785 (0.4784)
MIP-1a	0.5562 (0.0165)
MIP-1b	0.6037 (0.008)
RANTES	0.5315 (0.0232)
Growth Factors	
bFGF	0.3604 (0.1418)
G-CSF	0.3684 (0.1325)
GM-CSF	0.4583 (0.0643)
VEGF	0.6078 (0.0075)
PDGF	0.0380 (0.4923)
IL-7	-
Cytokines	
IL-2	0.8171 (<0.0001)
IL-1ra	0.6409 (0.0042)
IL-4	0.6891 (0.0016)
IL-5	-
IL-6	0.5439 (0.0196)

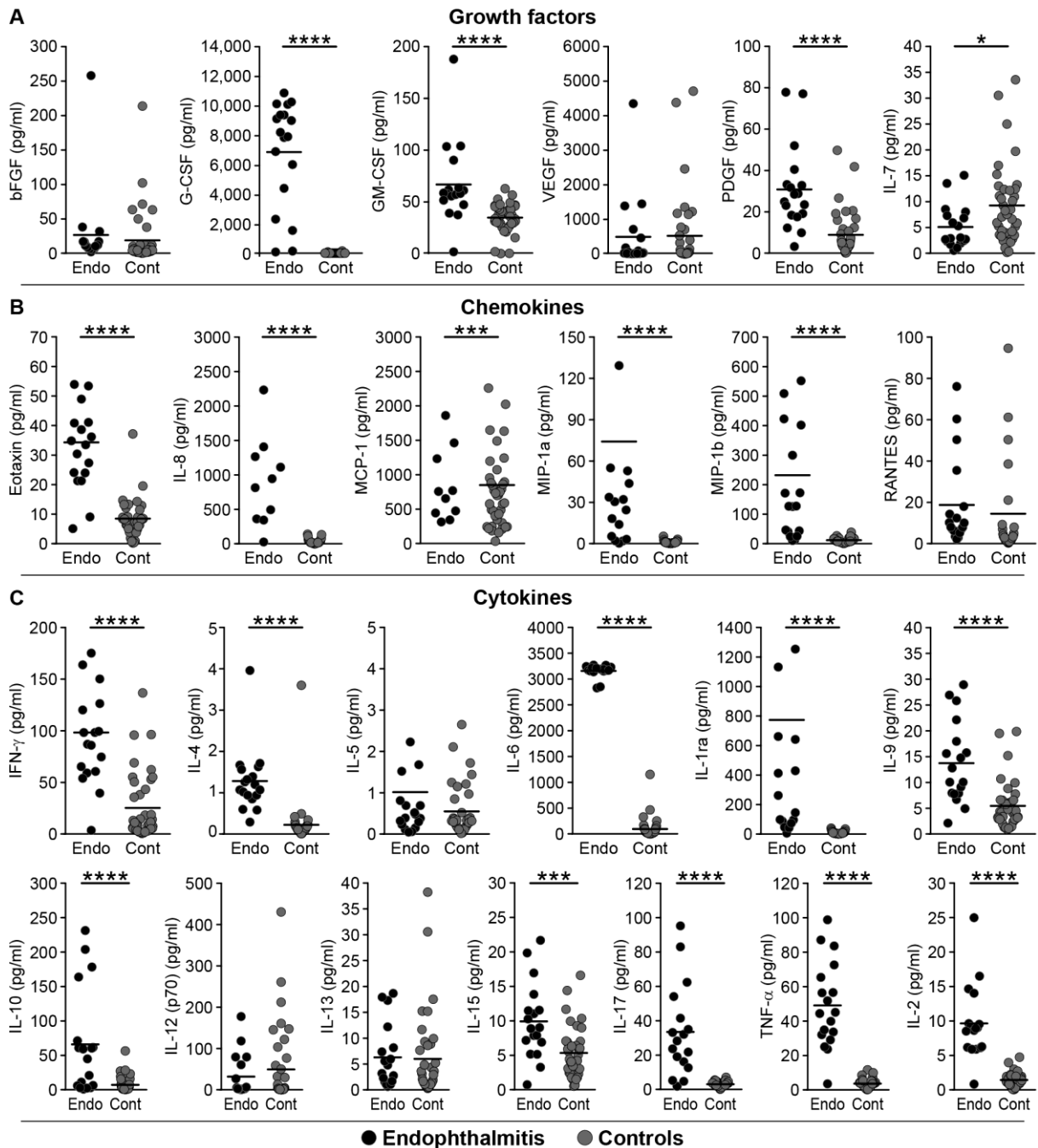


Análise de citocinas, quimiocinas e fatores de crescimento
em endoftalmite infecciosa aguda pós-facectomia

IL-9	0.5287 (0.0241)
IL-10	0.5212 (0.0266)
IL-12p70	-
IL-13	0.5686 (0.0138)
IL-15	0.4613 (0.0540)
IL-17	0.5707 (0.0134)
IFN- γ	0.9138 (<0.0001)



Figure 1. Growth factors (A), chemokines (B) and cytokines levels (pg/mL) in vitreous humor from patients with acute endophthalmitis (n=18) versus control group (n=39). Horizontal line indicates the median in each group.





APÊNDICE B

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (TCLE)

Este é um convite para você participar da pesquisa: Análise de citocinas, quimiocinas e fatores de crescimento em endoftalmite infecciosa aguda pós-facectomia, que é coordenada pelo professor Dr. Carlos Teixeira Brandt. Sua participação é voluntária, o que significa que você poderá desistir a qualquer momento, retirando seu consentimento, sem que isso lhe traga nenhum prejuízo para o senhor (a). Essa pesquisa busca ajudar na melhora do entendimento dos mecanismos envolvidos com uma infecção no olho conhecida como endoftalmite bem como identificar uma substância que determine a gravidade da infecção. Caso decida aceitar o convite, você será submetido(a) ao(s) seguinte(s) procedimentos: durante a sua cirurgia, seu médico irá remover uma quantidade muito pequena do líquido que preenche o olho internamente, sem qualquer prejuízo para o resultado da sua cirurgia. Na sua cirurgia especificamente, seu médico já remove parte desse líquido, a diferença para a pesquisa é que o material será enviado e analisado em um laboratório. Os riscos envolvidos com sua participação são: a diminuição transitória da pressão ocular, que serão minimizados através das seguintes providências: remoção de uma quantidade muito pequena do líquido. Você terá os seguintes benefícios ao participar da pesquisa: saber qual o agente infeccioso está causando seu problema ocular e tratar com um antibiótico mais específico. Todas as informações obtidas serão sigilosas e seu nome não será identificado em nenhum momento. Os dados serão guardados em local seguro e a divulgação dos resultados será feita de forma a não identificar os voluntários. Se você tiver algum gasto que seja devido à sua participação na pesquisa, você será ressarcido, caso solicite. Você ficará com uma cópia deste Termo e toda a dúvida que você tiver a respeito desta pesquisa, poderá perguntar diretamente para Dr. Paulo Escarião no telefone: (81) 92332180. Dúvidas a respeito da ética dessa pesquisa poderão ser questionadas ao Comitê de Ética em Pesquisa da UFPE, no endereço Av. Prof. Moraes Rego, s/n. Cidade Universitária, Recife-PE, CEP 50670-901, Tel: 21268588. Consentimento Livre e Esclarecido: Declaro que compreendi os objetivos desta pesquisa, como ela será realizada, os riscos e benefícios envolvidos e concordo em participar voluntariamente da pesquisa

Recife ____ de ____ de 201__

Paciente

Testemunha

Testemunha

Pesquisador



APÊNDICE C

Carta de Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa da UFPE


SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
Comitê de Ética em Pesquisa
Av. da Engenharia, s/n – 1º andar – Sala 4 – Cidade Universitária
50.740-600 Recife – PE, Tel/fax: 81. 2126.8588 – cepccs@ufpe.br

Ofício nº. 004/2014 - CEP/CCS/UFPE

Recife, 15 de janeiro de 2014.

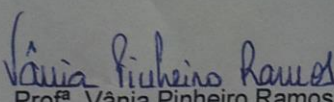
Ao
Paulo Henrique Gonçalves Escarião

Registro do SISNEP FR - 315900
CAAE – 0028.0.172.000-10
Registro CEP/CCS/UFPE Nº 032/10
Título: Avaliação de Diagnóstico e Prognóstico Visual em portadores de endoftalmites:
análise de Citocinas IL-10, IL-12, TNF- α e INF- γ
Pesquisador Responsável: Paulo Henrique Gonçalves Escarião

Senhor (a) Pesquisador (a):

O Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Pernambuco (CEP/CCS/UFPE) recebeu em 15/01/2014 o relatório final do protocolo em epígrafe e considera que o mesmo foi devidamente aprovado por este Comitê nesta data.

Atenciosamente


Profª. Vânia Pinheiro Ramos
Vice-Coordenadora do CEP/CCS/UFPE