

RESSALVA

Atendendo solicitação do(a)
autor(a), o texto completo
desta tese será
disponibilizado somente
a partir de 06/03/2020.



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Campus de São José do Rio Preto

Alessandro Garcia Lopes

Análise genética e molecular do Ceratocone envolvendo os genes
VSX1, *SOD1*, *TIMP3* e *LOX*

São José do Rio Preto
2018

Alessandro Garcia Lopes

Análise genética e molecular do Ceratocone envolvendo os genes
VSX1, SOD1, TIMP3 e LOX

Tese apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Biociências, junto ao Programa de Pós-Graduação em Biociências, do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Câmpus de São José do Rio Preto.

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Lilian Castiglioni

Financiadoras:

CAPES

FAPESP – Processo: 2015/17226-7

São José do Rio Preto
2018

Lopes, Alessandro Garcia.

Análise genética e molecular do Ceratocone envolvendo os genes VSX1, SOD1, TIMP3 e LOX / Alessandro Garcia Lopes. -- São José do Rio Preto, 2018
133 f. : il., tabs.

Orientador: Lilian Castiglioni
Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas

1. Genética humana. 2. Polimorfismo (Genética) 3. Córnea – Doenças - Aspectos genéticos. 4. Análise de DNA. I. Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho". Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas. II. Título.

CDU – 575

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca do IBILCE
UNESP - Câmpus de São José do Rio Preto

Alessandro Garcia Lopes

Análise genética e molecular do Ceratocone envolvendo os genes
VSX1, SOD1, TIMP3 e LOX

Tese apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Biociências, junto ao Programa de Pós-Graduação em Biociências, do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Câmpus de São José do Rio Preto.

Comissão Examinadora

Prof^a. Dr^a. Lilian Castiglioni
UNESP – São José do Rio Preto/SP
Orientadora

Prof^a. Dr^a. Patricia Simone Leite Vilamaior
UNESP – São José do Rio Preto/SP

Prof^a. Dr^a. Maria Tercília Vilela de Azeredo Oliveira
UNESP – São José do Rio Preto/SP

Prof^a. Dr^a. Orfa Yineth Galvis Alonso
FAMERP – São José do Rio Preto/SP

Prof. Dr. Luis Gustavo da Conceição Galego
UFTM – Uberaba/MG

São José do Rio Preto
06 de março de 2018

Dedico este trabalho a minha irmã Vânia Garcia Lopes e também ao meu pai Marcilio Garcia Lopes os quais, após um ano de luta, nos deixaram em julho de 2017 e agosto de 2017 respectivamente e não puderam, fisicamente, compartilhar este momento comigo.

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar eu agradeço a DEUS por tudo e por sempre estar do meu lado em todos os momentos bons e também em momentos de dificuldades. Agradeço a DEUS por ter me mostrado que não houve glórias e sim superação, e também pelo fortalecimento da fé e humildade.

Agradeço intensamente a minha orientadora Profa. Dra. Lilian Castiglioni, pelo total apoio, carinho, compreensão, paciência, ensinamentos e por ter acreditado em mim desde o começo (desde a graduação), apesar de às vezes não eu não me sentir digno. "Professora muito obrigado por tudo e mais um pouco!!!"

Agradeço intensamente ao Prof. Dr. Luiz Carlos de Mattos e a Profa. Dra. Cinara de Cassia Brandão de Mattos pela confiança em mim e em nosso projeto e por ter aberto as portas do laboratório de Imunogenética, no qual este trabalho foi desenvolvido. Agradeço também pelo constante apoio, carinho e ensinamentos.

Agradeço ao Prof. Dr. Gildásio Castello de Almeida Júnior pela ideia e pela ajuda na concepção do projeto. Agradeço a parceria durante esses anos pelas análises clínicas e obtenção das amostras para que este trabalho fosse realizado. "Dr. Muito obrigado!!!"

Agradeço também a dois professores doutores muito especiais em minha vida: Patricia Vilamaior e Fabiano Taddei. Para mim, esses professores são ícones e exemplos a serem seguidos. Eu os admiro muito!!!

Agradeço muito ao Prof. Dr. Carlos Roberto Ceron, meu orientador de mestrado, pelo carinho, ajuda, compreensão e valiosos ensinamentos.

Agradeço a Profa. Dra. Lilian Madi Ravazzi pelo apoio e ajuda para conosco desde o começo, também pelo carinho e ensinamentos.

Agradeço às organizações CAPES e FAPESP pelo apoio financeiro (bolsa de estudos e auxílio à pesquisa).

Agradeço aos meus amigos do laboratório de Imunogenética:

- Márcio por ter sido o primeiro a ter me apoiado e me ajudado dentro do laboratório;
- Cidinha pela ajuda constante e ensinamentos durante esses anos;
- Regina por toda ajuda, carinho e atenção;

-Ricardo e Warllen por todo apoio, ajuda, amizade e companherismo;
-Chris pelos conselhos, ensinamentos e carinho;
-Minha amiga Mirele (a Mirelê) pela amizade, carinho, conversas, desabafos e pelos momentos de cafezinhos e cigarrinhos;
-Geraldo pelo companherismo todas as vezes que trabalhamos à noite e por aceitar minha ajuda em seu artigo;
-Agradeço muito ao meu amigo e companheiro de laboratório Marcos Miola, por toda a ajuda durante as análises moleculares e também pela parceria no desenvolvimento de técnicas e adaptações de protocolos para nossos estudos;
-Agradeço também a Val, a Nati, a Fabi, Fran, Ronan e Rodolfo pelo apoio, ajuda e amizade.

Agradeço a dois grandes amigos meus: Alexandre Vidotto e Ana Letícia Guerra pela ajuda, amizade, carinho e companherismo desde a época de mestrado. "I love you guys!!!"

Agradeço a minha família pelo apoio, carinho e compreensão durante todos esses anos de pós-graduação.

LÊ, te agradeço muito pelo companherismo, apoio, carinho e amor. "I love you...thank you for ev'rything!!!"

Finalmente agradeço a mim mesmo pela coragem, perseverança e garra para seguir e não desistir!!!

“Somos fontes de energia no corpo físico, portanto não há nada que não possamos fazer, ter ou ser”

ABRAHAM HICKS

Tudo o que nossa mente é capaz de criar, podemos realizar, basta apenas compreendermos a sutil diferença entre “querer” e “ter” e, então, mergulharmos na importante arte de permitir...

O autor

RESUMO

O ceratocone é uma doença comum que acomete a córnea, afetando ambos os gêneros em todas as etnias e que pode se manifestar bilateralmente, de forma assimétrica. Por tratar-se de uma doença degenerativa, sua progressão pode ser rápida em diversas situações, acometendo 1 a cada 2.000 pessoas e resultando em severas alterações estruturais da córnea, as quais diminuem sua espessura e modificam sua curvatura normal para um formato mais cônico. O quadro clínico é composto por sintomas variados, destacando-se miopia e astigmatismo. Atualmente sabe-se que fatores genéticos e ambientais estão envolvidos no surgimento do ceratocone. Recentemente vários estudos genéticos têm como objetivo a identificação de mutações em genes que estejam diretamente ligados à doença, bem como seus papéis fisiológicos. Contudo, apesar dos esforços direcionados para o conhecimento dos aspectos genéticos, envolvendo diversos genes, ainda existem muitas dúvidas a respeito dos papéis destes na etiologia desta anomalia ocular. Assim, neste estudo, pretendeu-se identificar a presença de mutações e/ou polimorfismos nos genes *VSX1*, *SOD1*, *TIMP3* e *LOX*, importantes candidatos à origem e desenvolvimento desta doença, a partir da análise pareada das sequências nucleotídicas de tecido da córnea e sangue periférico dos pacientes portadores desta patologia. As avaliações oftalmológicas incluíram exame clínico, topografia e tomografia. As amostras de DNA foram extraídas de sangue periférico e de fragmentos de córnea e as regiões codificantes dos genes foram amplificadas por reação em cadeia da polimerase (PCR), desnaturadas e submetidas a eletroforese em gel de poliacrilamida. Então, o rastreamento mutacional foi realizado através da técnica de SSCP (*Single-Strand Conformation Polymorphism*) seguido de sequenciamento direto. A metodologia específica de pesquisa utilizando-se fragmentos de córnea, desenvolvida para este estudo, é algo inédito, diante dos trabalhos os quais utilizam apenas sangue. Alguns SNPs (polimorfismos de nucleotídeo único) foram detectados nas regiões codificantes dos genes *VSX1*, *SOD1* e *TIMP3*, em ambos os tecidos, mas esses SNPs não promovem alterações patogênicas nas estruturas das proteínas codificadas por esses genes, correspondendo a apenas trocas sinônimas de aminoácidos. Quanto ao gene *LOX*, foi detectado a ausência de qualquer polimorfismo, tanto em gel como no sequenciamento. Em relação aos polimorfismos encontrados, eles estavam concordantes em ambos os tecidos analisados, córnea e sangue. A ausência de alterações patogênicas nestes genes, obtida por este estudo em população brasileira, aliada aos resultados obtidos em outros estudos envolvendo outras populações mundiais, os quais também não encontraram mutações nestes genes,

sugerem que outros fatores genéticos possam estar implicados no surgimento do ceratocone, sendo importante ressaltar também os fatores ambientais e comportamentais envolvidos tais como atopia, ato de coçar os olhos, luz ultravioleta e o uso excessivo de lentes de contato.

Palavras-chave: Ceratocone, Córnea, *VSX1*, *TIMP3*, *SOD1*, *LOX*, Miopia, Astigmatismo

ABSTRACT

Keratoconus is a common disease that affects the cornea in both genders in all ethnic groups and it can manifest asymmetrically and bilaterally in patients. Keratoconus due to a degenerative disease and its progression can be fast in various situations, affecting 1 in 2,000 people, what results in severe structural changes of the cornea, which reduce its thickness and modify its normal curvature to a more conical shape. The clinical picture consists of varied symptoms, such as myopia and astigmatism. Currently it is known that genetic and environmental factors are involved in the disease emergence. Recently several genetic studies have aimed to identify mutations in genes which are directly linked to Keratoconus, as well as their physiological roles. However, despite the efforts directed towards the understanding of the genetic aspects of this disease, involving many genes, there are still many questions about the role of these genes in Keratoconus etiology. Thus, the present study aimed to identify the presence of mutations or polymorphisms in *VSX1*, *SOD1*, *TIMP3* and *LOX* genes, which are considered important candidates for the origin and development of this eye anomaly, using their nucleotide sequences in paired-like analysis of the corneal tissue and peripheral blood from Keratoconus patients. Ophthalmologic evaluations included a clinical examination, topography and tomography. DNA samples were extracted from peripheral blood and from corneal fragments and all coding regions of the genes were amplified by polymerase chain reaction (PCR), denatured and subjected to polyacrylamide gel electrophoresis. Thus, the mutational screening was performed by *Single-Strand Conformation Polymorphism* (SSCP) and direct DNA sequencing. The specific research methodology developed for this study, using cornea fragments, is something new in the field of Keratoconus research, in which only blood has been used. Some heterozygous Single-Nucleotide Polymorphisms (SNPs) were found during the screening of the coding regions of the *VSX1*, *SOD1* and *TIMP3* genes but all of them do not promote any pathogenic alteration in the protein structures, so that, corresponding to synonymous exchanges of amino acids only. In the *LOX* gene, no polymorphisms were detected either in the gels or in the nucleotide sequence analysis. In relation to the polymorphisms found, they were in concordance in both analyzed tissues, cornea and blood. The absence of pathogenic alterations in these genes obtained by this study of a Brazilian cohort, combined with data from other studies involving different cohorts around the world that did not identify mutations in these genes, suggest that other genetic factors may be implicated in the onset of keratoconus. It is also important to remember possible environmental and behavioral

factors involved, such as atopy, eye rubbing, ultraviolet light and excessive use of contact lenses.

Key-words: Keratoconus, Cornea, *VSX1*, *TIMP3*, *SOD1*, *LOX*, Myopia, Astigmatism

LISTA DE FIGURAS

Figura 1A-B: Esquemas da estrutura da córnea normal e ceratoconizada. (A) córnea normal em formato esférico ao longo de sua curvatura, da base ao ápice. (B) formato da córnea ceratoconizada, onde pode-se observar o típico formato de cone formado pelo afinamento da córnea e posterior processo de protrusão ou ectasia. (Fonte: <http://queratocone.blogspot.com.br/2012/02/saiba-mais-sobre-o-ceratocone.html#links>; Acesso em 15 de agosto de 2017).....18

Figura 2A-B: Diagramas esquemáticos das camadas e estruturas constituintes do olho. (A) A parede do olho é composta por três túnicas concêntricas. (1) uma túnica de sustentação, a corneoescleral (branco e azul); (2) túnica vascular ou úvea (rosa); (3) túnica fotossensível, a retina (amarelo). (B) Conjunto de estruturas que compoem o olho. Em destaque a **córnea**, o principal elemento refrativo com índice de refração de 1,376 (maior que o ar, cujo índice de refração é de 1,0). (Adaptado de ROSS e PAWLINA, 2008).....21

Figura 3 A-B: Fotomicrografias de um corte por toda a espessura da córnea, mostrando suas camadas constituintes. Note o estroma e as superfícies corneais revestidas por dois tipos de epitélios. O estroma corneal não contém vasos sanguíneos nem linfáticos. **A:** Fotomicrografia mostrando a superfície anterior da córnea, mostrando o estroma corneal revestido por um epitélio corneal estratificado pavimentoso. As células basais que repousam sobre a membrana de Bowman, a qual é uma camada condensada homogênea do estroma corneal, são colunares baixas em contraste com as células pavimentosas superficiais (aumento 280x). **B:** Fotomicrografia da superfície posterior da córnea revestida por uma fina camada de epitélio simples pavimentoso, o endotélio corneal. Estas células estão em contato direto com o humor aquoso da câmara anterior do olho. Note a membrana de Descemet bem espessa, a qual é uma lâmina basal acomodando as células do endotélio (aumento 280x). (Adaptado de ROSS e PAWLINA, 2008).....25

Figura 1 (Manuscrito 2): Eletroferograma mostrando o SNP c.63530 G>A (seta) encontrado no éxon 5 do gene *TIMP3*, ainda não documentado no GenBank NCBI.....85

Figura 1 (Manuscrito 3): Eletroforese em gel de agarose a 2,5% do fragmento que compreende parte da região do íntron 2 e parte da região do éxon 2 do gene *SOD1*. As bandas indicam fragmentos de aproximadamente 218 pb que foram previamente tratados com a enzima de restrição HpyCH₄ III e que não apresentaram polimorfismos de restrição. LD: DNA *ladder* (100 pb). Amostras de sangue (013,014,015,02,05,012,017,106) e córnea (065,088,070,052,051,099,114,140) ceratoconizadas. C1,C2,C3: controles positivos da reação (fragmento do grupo sanguíneo ABO, o qual contém o sítios de restrição par a enzima HpyCH₄ III).....102

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Oligonucleotídeos (*primers*) utilizados para a amplificação dos éxons dos genes *VSX1*, *SOD1*, *TIMP3* e *LOX*.....52

Tabela 2: Padrões de bandamento obtidos por PCR-SSCP para os genes *VSX1*, *SOD1*, *TIMP3* e *LOX*. Estão listados os padrões de bandamento considerados referências, obtidos através das amostras do grupo controle.....56

Tabela 1 (Manuscrito 1): Primers used for the amplification of the five exons of the *VSX1* and *SOD1* genes.....64

Tabela 2 (Manuscrito 1): Description of the Single-Nucleotide Polymorphisms (SNPs) found in the *SOD1* and *VSX1* genes in the corneal and blood samples in both Keratoconus and control groups.....66

Tabela 1 (Manuscrito 2): Oligonucleotídeos (*primers*) utilizados para a amplificação dos éxons dos genes *TIMP3* e *LOX*.....83

Tabela 2 (Manuscrito 2): Descrição dos SNPs encontrados no gene *TIMP3* nas amostras de córnea e sangue correspondente, em pacientes ceratoconizados e no grupo controle.....84

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

ART: Ambrosio's Relative Thickness
BFS: Best Fit Sphere
CLEK: Collaborative Longitudinal Evaluation of Keratoconus
DNA: Ácido Desoxirribonucleico
EDTA: Ethylenediamine Tetraacetic Acid
GWAS: Genome-Wide Association Study
kb: quilobase
KMI: Keratoconus Match Index
KMP: Keratoconus Match Probability
LASIK: Laser-Assisted in Situ Keratomileusis
LOX: Lisil Oxidase
mg: miligramas
ml: mililitro
mm: milímetro
mM: milimolar
mRNA: RNA mensageiro
NCBI: National Center for Biotechnology Information
ng: nanograma
nm: nanômetro
OMIM: Online Mendelian Inheritance in Man
pb: par de bases
PCR: Polymerase Chain Reaction
pH: potencial Hidrogeniônico
pM: picomol
PRK: Photorefractive Keratectomy
RFLP: Restriction Fragment Length Polymorphism
RNA: Ácido Ribonucleico
SNP: Single Nucleotide Polymorphism
SOD1: Superóxido Dismutase 1

SSCP: Single-Strand Conformation Polymorphism

TBE: tris-borato-EDTA

TCLE: Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

TIMP3: Tissue Inhibitor of Metalloproteinase 3

U: unidade

UTR: Untranslated Region

V: volt

VSX1: Visual System Homeobox 1

μ: micra

μl: microlitro

μm: micrômetro

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	17
1.1 O olho e a estrutura da córnea	19
1.2 Ceratocone: aspectos fisiológicos e bioquímicos	26
1.3 Fisiopatologia, aspectos clínicos e tratamento	28
1.4 Ceratocone: aspectos genéticos.....	34
2 OBJETIVOS	45
2.1 Objetivo geral	45
2.2 Objetivos específicos.....	45
3 MATERIAIS E MÉTODOS	46
3.1 Obtenção e descrição das amostras, critérios de inclusão e exclusão dos pacientes e procedimentos clínicos	46
3.2 Procedimento das coletas	49
3.3 Extração de DNA	49
3.4 Oligonucleotídeos iniciadores, condições para a amplificação e padronização da PCR e análise por RFLP (<i>Restriction Fragment Length Polymorphism</i>).....	50
3.5 Condições da análise por SSCP (<i>Single-Strand Conformation Polymorphism</i>).....	53
3.6 Sequenciamento de DNA	53
4 RESULTADOS	55
4.1 CAPÍTULO 1: MANUSCRITO # 1	58
4.2 CAPÍTULO 2: MANUSCRITO # 2.....	75
4.3 CAPÍTULO 3: MANUSCRITO # 3.....	95
5 DISCUSSÃO GERAL	109
6 CONCLUSÕES	114
7 REFERÊNCIAS	115
ANEXOS	127

1 INTRODUÇÃO

O ceratocone (OMIM 148300) foi descrito há mais de três séculos por Benedict Dudell, entretanto John Nottingham é que em 1854 fez uma descrição mais abrangente sobre a doença, sendo corroborado pelo seu contemporâneo Sir Willian Bowman (MCGHEE, 2008; GRZYBOWSKI; MCGHEE, 2013). O termo é derivado a partir das palavras gregas *kerato* (córnea) e *conus* (cone) (WHEELER et. al., 2013).

O ceratocone acomete 1 a cada 2.000 pessoas em todo o mundo e caracteriza-se por ser uma anomalia ocular progressiva, não inflamatória e assimetricamente bilateral que acomete a córnea, caracterizada pelo afinamento do estroma central, durante o qual a córnea perde sua forma normal esférica e passa a desenvolver uma forma mais cônica devido à degradação de fibras de colágeno, elastina e gelatina e também à perda de queratócitos. Esse processo que envolve modificações anatômicas da córnea, as quais resultam em projeção desta, é denominado de protrusão ou ectasia (EL-TARRAS et al., 2015; GHASSEMBAGLOU; DJALILIAN, 2016; NADERAN et al., 2016; LISKOVA et al., 2017; MOUSSA et al., 2017) (Figura 1A-B).

Essa anomalia ocular, apesar de ter sido reportada na literatura há muitos anos, afetando milhões de pessoas em todo o mundo, de ambos os gêneros e em todas as etnias, ainda apresenta sua etiologia indefinida (SUGAR; MACSAI, 2012; NADERAN et al., 2016).

Os sintomas dessa doença são muito variados e dependem de seu estágio de progressão. No início pode haver nenhum sintoma, mas assim que a doença avança começam a surgir distorções em relação à visão. O quadro clínico assemelha-se com sintomas de miopia e astigmatismo irregular, devido à irregularidade da curvatura apresentada pela córnea durante o processo de ectasia. Essa doença manifesta-se na puberdade e progride até a terceira ou quarta década de vida onde se estabiliza, sendo que aproximadamente 20% dos casos

evoluem até o estágio de transplante de córnea ou ceratoplastia (JEOUNG et al., 2012; WHEELER et al., 2013; LECHNER et al., 2014; FARJADNIA et al., 2015; WANG et al., 2016; GHASSEMBAGLOU; DJALILIAN, 2016; MOUSSA et al., 2017).

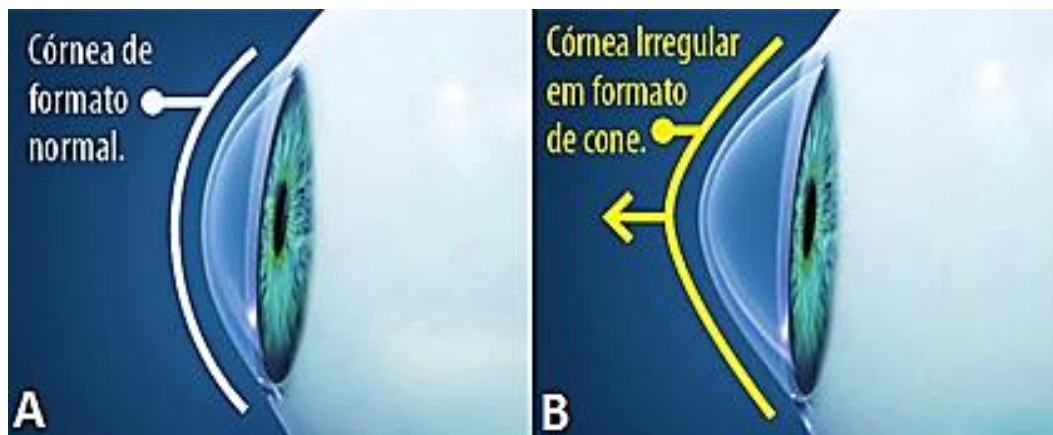


Figura 1A-B: Esquemas da estrutura da córnea normal e ceratoconizada. (A) córnea normal em formato esférico ao longo de sua curvatura, da base ao ápice. (B) formato da córnea ceratoconizada, onde pode-se observar o típico formato de cone formado pelo afinamento da córnea e posterior processo de protrusão ou ectasia. (Fonte: <http://queratocone.blogspot.com.br/2012/02/saiba-mais-sobre-o-ceratocone.html#links>; Acesso em 15 de agosto de 2017)

Algumas pesquisas realizadas em diferentes populações ao redor do mundo envolvendo campos de estudo tais como genéticos, genômicos, análises de biomoléculas e expressão gênica, apontam que a doença é de origem multifatorial, apresentando fatores ambientais, comportamentais e genéticos associados ao seu surgimento e progressão, destacando-se fatores como atopia, o ato de coçar os olhos, uso excessivo de lentes de contato dentre outros (GHOSH et al., 2013; GODEFROOIJ et al., 2016).

A atopia, por mais de cinco décadas, tem sido relacionada ao ceratocone devido à altas taxas de imunoglobulina E (IgE) encontradas em grande parte de pacientes ceratoconizados. Mas como pacientes portadores de doenças alérgicas apresentam o hábito de coçar os olhos excessivamente, torna-se meio conflitante sobre qual destes fatores está

realmente associado diretamente à doença (GALVIS et al., 2015). Mas de acordo com estudos de Bawazeer et al. (2000), o ato de coçar os olhos ainda é um fator muito importante associado ao desenvolvimento dessa anomalia ocular e que ainda a atopia pode estar relacionada ao ceratocone indiretamente, graças a suas irritações oculares, as quais levam ao ato de coçar os olhos.

1.1 O olho e a estrutura da córnea

Antes de detalharmos a córnea e suas camadas constituintes, faz-se necessário a apresentação de um panorama geral do olho. O texto a seguir apresenta-se como um resumo dessas estruturas baseado nos livros de Gartner e Hiatt (2007), Ross e Pawlina (2008), Gartner e Hiatt (2011) e Junqueira e Carneiro (2013) (Figura 2A-B).

O olho é o órgão sensorial responsável pelo sentido da visão, mede aproximadamente 25 mm e está amparado na cavidade óssea orbital por seis músculos extrínsecos, os quais são responsáveis pelos movimentos oculares, juntamente com uma camada de tecido adiposo, a qual acomoda o olho enquanto este se move dentro da órbita.

Histologicamente, a parede do olho é constituída por três túnicas concêntricas: a túnica corneoescleral (camada fibrosa), a túnica vascular ou úvea e a retina.

A túnica corneoescleral consiste da córnea e da esclera. A córnea é uma estrutura superficial transparente que recobre um sexto da porção anterior do olho, apresentando uma forma convexa e continuada com a esclera. A esclera (parte branca) é constituída de tecido conjuntivo fibroso denso, oferecendo assim suporte para a fixação da musculatura do olho.

A úvea é constituída principalmente pela corióide, uma camada composta de vasos sanguíneos os quais oferecem nutrientes à retina e também é rica em melanina, com a função de absorção de luz que fica dispersa dentro do olho, evitando assim a ofuscação.

A parte anterior da úvea forma outras duas estruturas, o corpo ciliar e a íris. O corpo ciliar constitui-se de uma dilatação que abriga o músculo ciliar, o qual é um músculo liso com a função de acomodar a lente. A contração do músculo ciliar propicia a modificação do formato da lente, permitindo a captação de luz de diferentes ângulos para a retina. A íris é uma estrutura em forma de diafragma posicionada sobre a superfície anterior da lente. A íris apresenta músculo liso e células pigmentadas com melanina ao longo do tecido conjuntivo, e, também, possui uma abertura central, a pupila, a qual altera-se de tamanho para controlar a entrada de luz (de acordo com a intensidade desta) durante o processo de adaptação aos diferentes ambientes.

A retina é uma camada fina composta por duas estruturas: a retina neural e o epitélio pigmentado da retina (RPE – *Retinal Pigment Epithelium*). A retina neural contém receptores sensíveis à luz e redes neuronais complexas. Consiste principalmente em células fotorreceptoras, denominadas cones e bastonetes, além de interneurônios. A informação codificada por estas células é enviada ao cérebro via nervo óptico, em forma de impulsos. Já o RPE é uma camada de epitélio simples composta por células pigmentadas com melanina.

As camadas do olho junto com a lente oferecem limites para três câmaras do olho: a câmara anterior, espaço entre a córnea e a íris; a câmara posterior, espaço entre a íris e a face anterior da lente; e a câmara vítrea, espaço entre a face posterior da lente e a retina neural.

Os raios luminosos quando passam através do olho, sofrem refração. Quatro componentes transparentes denominados meios refrativos alteram os raios luminosos. São eles: córnea, janela anterior do olho; humor aquoso, líquido que preenche as câmaras anterior e posterior; lente, estrutura bicôncava cristalina e transparente suspensa por fibras radiais, denominadas zônula ciliar; corpo vítreo, constituído por substância gelatinosa e transparente composta por 99% de água, proteínas, glicoproteínas e fibras de colágeno. O corpo vítreo preenche a

câmara vítrea e protege a retina por absorver choques durante o movimento ocular. O corpo vítreo, além de transmitir a luz, ajuda a manter a forma do olho, a posição da lente e a retina neural em contato com o RPE.

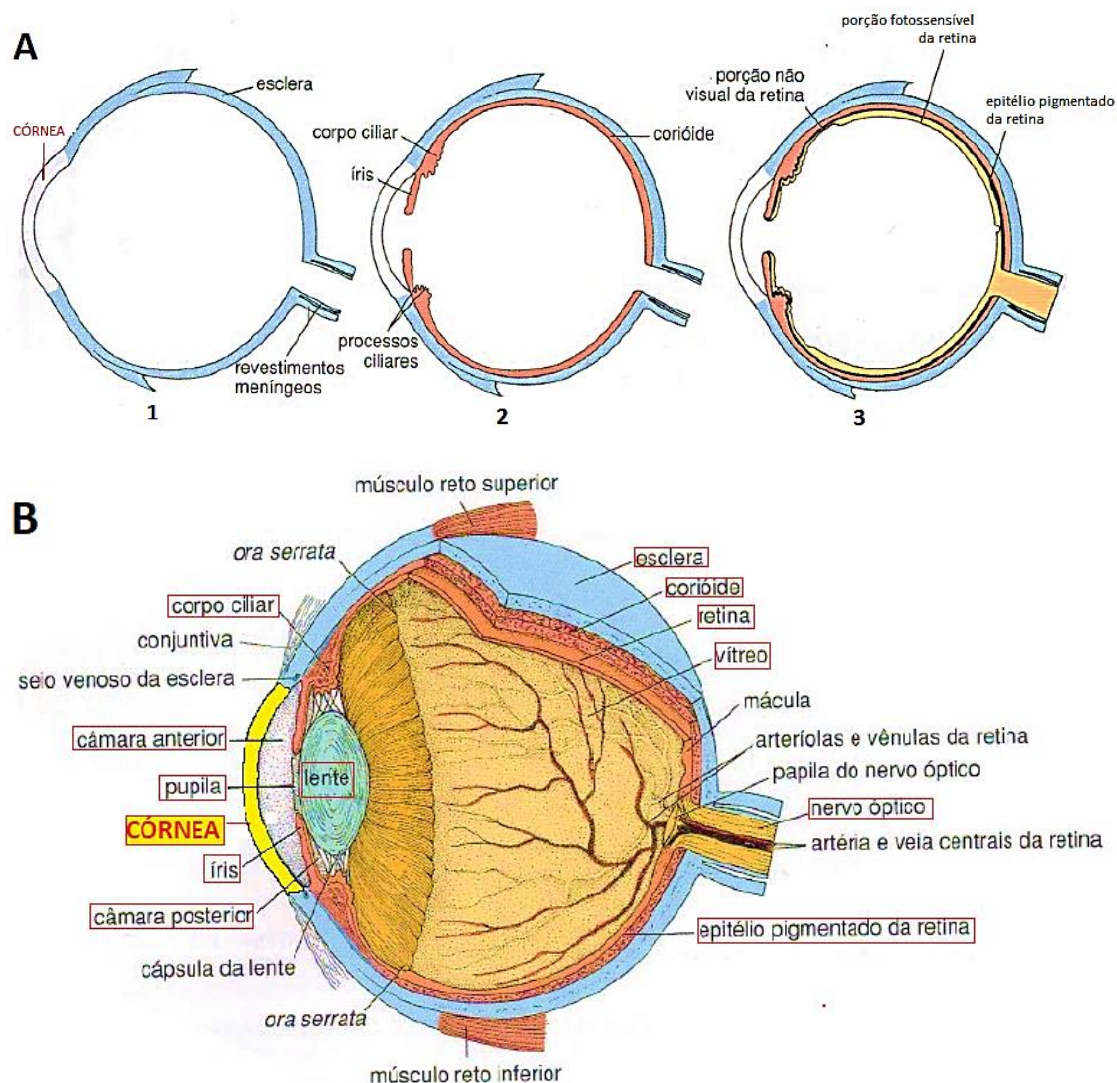


Figura 2A-B: Diagramas esquemáticos das camadas e estruturas constituintes do olho. (A) A parede do olho é composta por três túnica concêntricas. (1) uma túnica de sustentação, a corneoescleral (branco e azul); (2) túnica vascular ou úvea (rosa); (3) túnica fotossensível, a retina (amarelo). (B) Conjunto de estruturas que compoem o olho. Em destaque a **córnea**, o principal elemento refrativo com índice de refração de 1,376 (maior que o ar, cujo índice de refração é de 1,0). (Adaptado de ROSS e PAWLINA, 2008).

A córnea é a principal estrutura de refração do olho seguida da lente. Graças a sua elasticidade, a lente pode sofrer alterações provocadas pelo músculo ciliar, as quais permitem uma focalização mais apurada. Já o humor aquoso também tem a função de oferecer nutrientes para a córnea e a lente, as quais são estruturas avascularizadas.

A córnea, quanto as suas dimensões, apresenta aproximadamente as medidas de 10,6 mm verticalmente e ao redor de 11,7 mm horizontalmente, destacando-se que essas medidas variam de um indivíduo para outro e, de um modo geral, apresenta-se mais fina no centro, medindo 0,5 a 0,6 mm, sendo mais espessa na periferia, medindo cerca de 0,7 mm (SNELL; LEMP, 1998; WASILEWSKI, 2010).

Histologicamente, a córnea é constituída de cinco camadas, da anterior para a posterior, são elas: epitélio, membrana de Bowman, estroma, membrana de Descemet e endotélio (Figura 3A-B).

O epitélio é classificado como estratificado pavimentoso não queratinizado e consiste de cinco camadas de células, medindo aproximadamente 50 μm de espessura. As células aderem-se umas às outras através de estrutura denominadas desmossomos.

As células desse epitélio se proliferam a partir de uma camada basal, cujas células são colunares apresentando núcleos ovoides e redondos, enquanto as células que vão se localizando em direção à superfície, apresentam-se, gradualmente, em forma pavimentosa contendo núcleos achatados. Assim que as células vão migrando para a superfície, as organelas citoplasmáticas começam a desaparecer, ocorrendo assim a queda de atividade metabólica.

A capacidade de regeneração do epitélio, diante lesões, é bem rápida, levando cerca de apenas sete dias. As inúmeras terminações nervosas existentes ao longo do epitélio corneal conferem-lhe grande sensibilidade ao toque, de modo que, quando ocorre o contato com corpos estranhos, iniciam-se constantes movimentos de piscar de

pálpebras, dor e maior produção de lágrimas. As microvilosidades da superfície das células promovem a retenção do líquido lacrimal, o que mantém a córnea sempre úmida.

A membrana de Bowman apresenta-se como uma lâmina fibrilar homogênea, medindo, aproximadamente, 10 μm de espessura, ocupando o espaço entre o epitélio e o estroma. A membrana de Bowman não se regenera quando lesada. As fibrilas de colágeno que a compõem estão orientadas aleatoriamente e juntas medem cerca de 18 nm.

A membrana de Bowman apresenta funções como reforço da córnea e principalmente age como uma barreira, evitando infecções.

O estroma é a camada mais volumosa da córnea, composto por cerca de sessenta lamelas constituídas de feixes paralelos de fibrilas de colágeno e, mergulhados entre essas lamelas, encontram-se os fibroblastos, também denominados queratócitos. Além destes constituintes, o estroma apresenta proteoglicanos corneais, as quais são glicosaminoglicanos sulfatadas ligadas covalentemente.

Acredita-se que o arranjo formado pelas fibrilas de colágeno das lamelas seja o responsável pela transparência da córnea.

O espaçamento típico e preciso das fibrilas de colágeno de toda a trama que compõe o estroma é mantido devido à presença das proteoglicanos e colágeno tipo V.

Como a córnea é uma estrutura avascularizada, a resposta inflamatória ocorre através da migração de neutrófilos e linfócitos provenientes de vasos sanguíneos do limbo corneoescleral, os quais penetram entre as lamelas.

A membrana de Descemet é a lâmina basal entre o estroma e as células do endotélio, a qual mede cerca de 10 μm de espessura, apresentando-se como uma malha constituída de fibras e poros. Essa lâmina regenera-se facilmente após lesão e é produzida continuamente.

A membrana de Descemet estende-se por sob a esclera como uma malha, formando o ligamento pectinado. Faixas desse ligamento penetram no músculo ciliar e esclera, com a função de ajudar a manter a curvatura normal da córnea.

O endotélio é formado por uma única camada de células pavimentosas, revestindo a superfície interna da córnea, voltada para a câmara anterior. As células do endotélio estão unidas entre si por zônulas de adesão, junções oclusivas e desmossomos. Praticamente todas as trocas de moléculas necessárias para o metabolismo da córnea são realizadas via endotélio.

As células do endotélio apresentam muitas mitocôndrias, vesículas e retículo endoplasmático rugoso e aparelho de Golgi bem desenvolvidos, para comportar a intensa atividade endocitótica.

A regulação precisa da quantidade de água no estroma também é responsável pela transparência da córnea, então de um modo geral, lesões físicas ou metabólicas no endotélio podem causar danos, levando à opacidade da córnea. O endotélio possui capacidade de proliferação celular limitada, assim, se a lesão for grave, o único meio reparador dá-se por transplante de córnea.

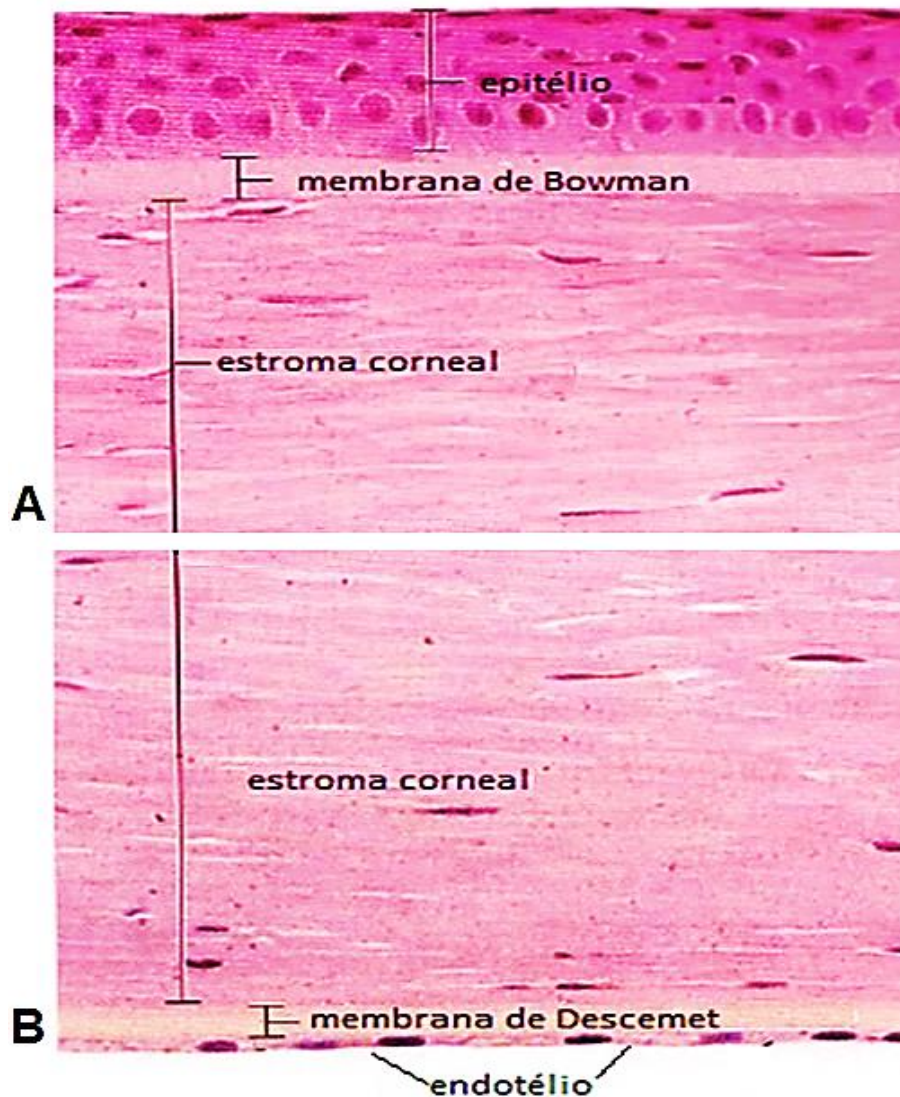


Figura 3 A-B: Fotomicrografias de um corte por toda a espessura da córnea, mostrando suas camadas constituintes. Note o estroma e as superfícies corneais revestidas por dois tipos de epitélios. O estroma corneal não contém vasos sanguíneos nem linfáticos. **A:** Fotomicrografia mostrando a superfície anterior da córnea, mostrando o estroma corneal revestido por um epitélio corneal estratificado pavimentoso. As células basais que repousam sobre a membrana de Bowman, a qual é uma camada condensada homogênea do estroma corneal, são colunares baixas em contraste com as células pavimentosas superficiais (aumento 280x). **B:** Fotomicrografia da superfície posterior da córnea revestida por uma fina camada de epitélio simples pavimentoso, o endotélio corneal. Estas células estão em contato direto com o humor aquoso da câmara anterior do olho. Note a membrana de Descemet bem espessa, a qual é uma lâmina basal acomodando as células do endotélio (aumento 280x). (Adaptado de ROSS e PAWLINA, 2008).

1.2 Ceratocone: aspectos fisiológicos e bioquímicos

Em relação aos aspectos fisiológicos, o olho humano é uma estrutura vulnerável e suscetível a danos oxidativos devido à produção de oxigênio reativo, exposição à luz e alto metabolismo enzimático (ZELKO; MARIANI; FOLZ, 2002).

A córnea possui grande quantidade de enzimas antioxidantes como a superóxido dismutase, catalase, glutathione peroxidase e glutathione reductase; todas desempenhando papel importante na eliminação de radicais livres e oxigênio reativo, gerados pela absorção da luz ultravioleta (UV) (ORTAK et al., 2012). Assim, essa desregulação enzimática representa danos ao tecido afetado por ceratocone (BEHNDIG et al., 2001).

As isoenzimas antioxidantes superóxido-dismutases catalisam a dismutação de radicais superóxidos, convertendo-os em peróxido de hidrogênio. Pois assim que o radical superóxido é formado, as enzimas superóxido-dismutases (SOD1, SOD2 e SOD3) impedem sua entrada pelas membranas, compartimentalizando-o no citoplasma, matriz extracelular e matriz mitocondrial (ZELKO; MARIANI; FOLZ, 2002). A enzima SOD1 encontra-se diferentemente distribuída em tecidos corneanos normais em comparação com tecidos corneanos acometidos por ceratocone (BEHNDIG et al., 2001; STABUC-SILIH et al., 2010).

Análises bioquímicas realizadas em córneas afetadas pelo ceratocone mostraram que o decréscimo da trama de colágeno e as alterações na atividade de diversas enzimas desempenham um papel muito importante em relação à degradação do epitélio corneano (CRITCHFIELD et al., 1988). Enzimas como fosfatases ácidas e esterases ácidas apresentam atividade aumentada no epitélio com ceratocone, assim como o aumento das atividades das catepsinas B, G e K e a tripsina-2. Já os inibidores de enzimas proteolíticas como a alfa-1

proteinase e alfa-2 macroglobulina apresentam suas atividades diminuídas (MACKIEWICZ et al., 2006; SUGAR; MACSAI, 2012).

Estudos bioquímicos demonstram sinais de anormalidade generalizada de queratócitos em tecidos comprometidos por ceratocone. A perda de queratócitos do estroma anterior, os quais acompanham o epitélio corneano, deve-se à atividade apoptótica acentuada (WILSON et al., 1996; RABINOWITZ, 1998).

A interleucina 1 (IL-1) funciona como um modulador do estroma corneal, desempenhando papel importante na regulação da proliferação, diferenciação e morte das células da córnea (WILSON et al., 1996). Ainda de acordo com Wilson et al. (1996), o epitélio corneano e o endotélio produzem interleucina 1, e que os queratócitos da córnea ceratoconizada possuem maior quantidade de receptores para a interleucina 1, acarretando maior captação dessa proteína por essas células, as quais sofrem morte celular por apoptose, colaborando para o decréscimo da massa estromal. Além disso, um aumento da liberação de interleucina 1 pelo epitélio corneano está relacionado ao ato de esfregar os olhos e o uso de lentes de contato, aumentando o risco de ceratocone. O uso frequente de lentes de contato por pessoas com ceratocone faz com que surja uma taxa maior de inflamações nessas pessoas em comparação com pessoas normais que sofrem de miopia (RABINOWITZ, 1998; SUGAR; MACSAI, 2012).

Em relação à matriz extracelular, a atividade em excesso de metaloproteinases, moduladoras da trama de colágeno, tem sido considerada como um forte fator de degradação do estroma corneal em ceratocone, associada às alterações de função dos inibidores dessas enzimas (COLLIER, 2001; MATTHEWS et al., 2007).

Alguns estudos têm destacado a ação de metaloproteinases de matriz (MMPs) na etiopatogênese do ceratocone e também os danos causados por estresse oxidativo (COLLIER, 2001; KENNEY et al., 2005). As MMPs constituem um amplo grupo de

proteases dependentes de zinco, possuindo a função de clivar e remodelar moléculas de colágeno, elastina e gelatina. Assim, são essenciais na reparação e conservação da matriz extracelular do estroma corneano (ZITKA et al., 2010). Sabe-se que o aumento indevido de proteases em córneas com ceratocone degrada a matriz extracelular (COLLIER, 2001).

Um fator que também possa estar relacionado à incidência de ceratocone é o tabagismo, talvez pelo fato deste proporcionar um aumento de *crosslinking* em genes de colágeno. Assim, pacientes fumantes podem apresentar um menor risco de desenvolvimento da doença, (SPOERL et al., 2008).

Há também hipóteses que diabetes hiperglicêmica pode proporcionar *crosslinking* em fibras de colágeno, pois pacientes com diabetes que apresentam o quadro de ceratocone, desenvolvem a doença de uma forma mais branda (SADY; KHOSROF; NAGARAJ, 1995).

1.3 Fisiopatologia, aspectos clínicos e tratamento

O ceratocone, como já mencionado, caracteriza-se por ser uma doença degenerativa, não inflamatória e progressiva, resultando em alterações na estrutura da córnea, afetando sua resistência e elasticidade (NADERAN et al., 2016). Tais alterações tornam a córnea mais fina e esse afinamento ocorre no estroma central ou paracentral (RABINOWITZ, 1998; SARAVANI et al., 2015). Também ocorre uma diminuição na densidade dos queratócitos e do número de lamelas de colágeno (ROMERO-JIMENEZ; SANTODOMINGO-RUBIDO; WOLFFSOHN, 2010; NADERAN et al., 2016; GHASSEMBAGLOU; DJALILIAN, 2016).

Outras alterações observadas são roturas na membrana de Bowman que são preenchidas por colágeno derivado do estroma e do epitélio, enquanto o centro da córnea torna-se mais fino, existindo uma correlação positiva entre essas duas alterações com o ceratocone

(RABINOWITZ, 1998; SHERWIN; BROOKES, 2004). Além disso, o afinamento corneano também é causado pela degradação dos componentes da matriz extracelular e perda dos queratócitos. Mas os fatores que causam todas essas alterações ainda não estão completamente esclarecidos (WOJCIK et al., 2014).

A redução das lamelas de colágeno é resultado da diminuição de colágeno tipo VI, VII, XII e XIII no epitélio, e de colágeno tipo I, III, V, VI e XIII no estroma (WOJCIK et al., 2014). Efeitos adicionais incluem apoptose e necrose dos queratócitos (BISCEGLIA et al., 2009; CHANG; CHODOSH, 2013).

Fatores como atopia, excessivo uso de lentes de contato e o ato de esfregar os olhos também estão relacionados a pacientes que apresentam este quadro clínico (NIELSEN et al., 2013; GODEFROOIJ et al., 2016).

A incidência dessa doença, na maioria das vezes, é considerada esporádica, mas muitos casos apresentam históricos familiares (ABU-AMERO; KALANTAN; AL-MUAMMAR, 2011).

Em relação aos sintomas, os distúrbios mais comuns que afetam a acuidade visual são opacidade, miopia e astigmatismo irregular (JEOUNG et al., 2012; WHEELER et al., 2013; LECHNER et al., 2014; FARJADNIA; NADERAN; MOHAMMADPOUR, 2015; WANG et al., 2016; GHASSEMBAGLOU; DJALILIAN, 2016).

O CLEK (*“Collaborative Longitudinal Evaluation of Keratoconus”*) estudou prospectivamente 1.209 pacientes com exames anuais por 8 anos e encontrou uma diminuição da acuidade visual com alto e baixo contraste, aumento progressivo da curvatura da córnea e com taxa de cicatriz corneana de 20% (WAGNER; BARR; ZADNIK, 2007).

O paciente com ceratocone geralmente queixa-se de uma visão borrada ou distorcida na época da adolescência e com o histórico de mudança frequente dos óculos (VAZIRANI; BASU, 2013).

Nos estágios moderado e avançado, a retinoscopia mostra um padrão de astigmatismo miópico irregular, ou seja, é quando esta apresenta um padrão em “tesoura” juntamente com o reflexo da gota de óleo (sinal de Charleux), que é muito sugestivo de ceratocone (VAZIRANI; BASU, 2013). Outros sinais mais acentuados em ceratocone avançado são a distorção em formato de “V” da pálpebra inferior, ou seja, quando o paciente olha para baixo devido à excessiva protuberância cônica da córnea (sinal de Munson); a presença de raio de luz focado próximo ao limbo nasal proveniente da iluminação lateral do cone (sinal de Rizzuti) (VAZIRANI; BASU, 2013) e o aparecimento de uma linha parcial ou completa ao redor do cone por depósito de hemosiderina (anel de Fleischer) (ROMERO-JIMÉNEZ; SANTODOMINGO-RUBIDO; WOLFFSOHN, 2010). Outra alteração encontrada na córnea são as estrias de Vogt, as quais são linhas verticais no estroma profundo e na membrana de Descemet (RABINOWITZ, 1998).

A sintomatologia exacerbada ocorre quando existe rotura e dobra na membrana de Descemet, ocasionando o quadro de edema agudo do estroma, seguido de diminuição da visão e dor (SHERWIN; BROOKES, 2004). Também em estágio avançado ou severo, os pacientes podem apresentar hidropsia corneana e edema de estroma, graças ao rompimento da membrana de Descemet (RABINOWITZ, 1998; BARR et al., 2006; MOUSSA et al., 2017).

Muitos termos têm sido empregados para descrever os estágios pré-clínicos da doença, incluindo ceratocone subclínico, ceratocone suspeito ou forma frustra de ceratocone. O termo ceratocone suspeito é reservado para as córneas com alguma alteração na topografia, mas sem a evidência clínica da doença (KLYCE, 2009; SIDEROUDI et al., 2016). O termo forma frustra de ceratocone foi caracterizado como uma forma incompleta (AMSLER, 1961). Entretanto pela ambiguidade de definição e uma sobreposição entre essas

designações, não existe um critério definitivo que ajude a discriminar o ceratocone subclínico da córnea sadia (BAE et al., 2014).

O ceratocone, de acordo com a avaliação clínica, pode ser classificado em quatro estágios devido a sua severidade, de acordo com o sistema de classificação de Amsler-Krumeich (ALIÓ; SHABAYEK, 2006):

Estágio 1: curvatura excêntrica, miopia e/ou astigmatismo induzido < 5,0 Dioptrias (D) e ceratometria média central < 48,00 D

Estágio 2: miopia e/ou astigmatismo induzido de 5,0 D até 8,0 D, ceratometria média central < 53,00 D, ausência de cicatriz e espessura mínima da córnea > 400 micra (μ)

Estágio 3: miopia e/ou astigmatismo induzido de 8,0 D até 10,0 D, ceratometria média central > 53,00 D e < 55,00 D, ausência de cicatriz e espessura mínima da córnea de 300 μ a 400 μ

Estágio 4: refração imensurável, ceratometria média central > 55,00 D, cicatriz central na córnea e espessura mínima da córnea de 200 μ

No início do desenvolvimento da doença, a videoceratografia oferece meios rápidos e eficazes para a identificação de anormalidades corneanas, quando os sintomas gerais ainda estão ausentes. Essa técnica tem sido utilizada em muitos diagnósticos, juntamente com indicadores topográficos específicos, os quais têm sido estudados e desenvolvidos na tentativa de inferir diagnósticos mais precisos em relação às anormalidades da córnea (RABINOWITZ; RASHEED, 1999; LAPID-GORTZAK et al., 2002; OWENS et al., 2007).

A topografia da córnea é o meio mais sensível para a detecção dos sintomas iniciais do ceratocone, assim que se inicia o processo de protrusão (WHEELER et al, 2013).

Anteriormente, o diagnóstico do ceratocone era feito com auxílio do ceratômetro manual (tipo Javal-Schiotz ou Bausch and Lomb),

que pode mostrar um aumento da curvatura da córnea e alto grau de astigmatismo (VAZIRANI; BASU, 2013). No começo da década de 1980 começaram a aparecer os primeiros aparelhos de videoceratografia computadorizada com sistemas baseados nos discos de plácido (KLYCE, 1984). Então, vários índices foram criados para detectar córneas sadias de córneas ceratoconizadas (MAEDA et al., 1994; RABINOWITZ; RASHEED, 1999).

Sequencialmente, novos aparelhos foram desenvolvidos para a detecção do ceratocone subclínico, com o advento da cirurgia refrativa em 1990 e o risco de ectasia. O Orbscan (Bausch and Lomb, Rochester, NY, USA) surgiu com a tecnologia de oferecer um mapa paquimétrico amplo, a elevação anterior e posterior da córnea e o mapa topográfico. Posteriormente surgiu o Orbscan II, combinando a tecnologia do primeiro juntamente com o disco de plácido, tornando assim o método mais sensível, proporcionando comparar a elevação máxima posterior com o “*Best Fit Sphere*” (BFS), oferecendo uma ótima utilidade para discriminar as formas de ceratocone suspeitos de córneas sadias (LIM et al., 2007).

Os tomógrafos com princípio Scheimpflug, como o Pentacam (Oculus, Wetzlar, Alemanha), fornecem mapas tridimensionais, superfícies anterior e posterior da córnea, paquimetria e características da câmara anterior. A tecnologia Scheimpflug do Pentacam utiliza uma câmera rotacional que examinam 138 mil pontos de elevação real da superfície anterior e posterior da córnea (WEGENER; LASER-JUNGA, 2009). Ao contrário do topografo baseado no disco de plácido, os dados do Pentacam não dependem de um eixo de referência ou orientação, oferecendo um método mais acurado para representar a forma real da córnea (NILFOROUSHAN et al., 2008).

O Pentacam conta com o software de Belin/Ambrosio-enhanced ectasia display (BAD), o qual exclui os 4 mm da zona do ponto mais fino do cálculo da forma de referência (BFS) e avalia a progressão

da paquimetria do ponto mais fino em direção à periferia da córnea. Portanto realça as elevações deixando-as mais evidentes possibilitando assim uma detecção mais precoce das formas do ceratocone iniciais ou subclínicos (AMBRÓSIO et al., 2006; UÇAKHAN et al., 2011).

Os dados obtidos das elevações anteriores e posteriores por meio do BAD são bastante efetivos em discriminar córneas ceratoconizadas de córneas sadias (KAMIYA et al., 2014). As medidas de diferenças de elevação são úteis em melhorar o diagnóstico do ceratocone especialmente em casos mais precoces, bem como na classificação da severidade (ISHII et al., 2012; KAMIYA et al., 2014). Assim, os parâmetros paquimétricos derivados do Pentacam são mais úteis ao diferenciar as córneas com ceratocone das córneas sadias em relação a um ponto paquimétrico isolado (AMBRÓSIO et al., 2011).

Entretanto, em relação ao índice de progressão paquimétrica, a espessura máxima relativa à especificidade é de 90%, mostrando que até 10% dos casos de ceratocone subclínicos podem passar indetectáveis com essa tecnologia. Outro estudo mostrou que em olhos contralaterais ao olho ceratoconizado, o programa de detecção do Pentacam não foi capaz de mostrar diferença dessa córnea comparada a uma córnea sadia (BAE et al., 2014).

O Pentacam pode detectar a luz retro refletida do sistema óptico profundo gerando mapa de topografia, paquimetria e da câmara anterior, como também é possível compor um mapa da luz retro refletida de diferentes regiões da córnea, chamado de mapa de densitometria corneana. Na prática clínica a densitometria já foi descrita após o tratamento do ceratocone com o *crosslinking* do colágeno corneano (GREENSTEIN et al., 2010). O Pentacam apresenta uma boa reprodutibilidade na mensuração da paquimetria e topografia da córnea e superfície posterior da córnea (CHEN; LAM, 2007; TAI et al., 2013).

De um modo geral, parece que o epitélio da córnea tende a dificultar o diagnóstico, pois mascara a curvatura mais pronunciada na

área do cone, porque as córneas sem o epitélio submetidas ao *crosslinking* mostraram uma curvatura mais acentuada depois da remoção do mesmo na área correspondente ao cone (KALKAN AKCAY et al., 2015).

Outras tecnologias têm sido utilizadas, como a tomografia de coerência óptica, a análise da histerésis corneana com o ORA (*Ocular Response Analyzer*), a caracterização do perfil da aberrometria, medida da deformação corneana usando um tonômetro de não contato com tecnologia Scheimpflug e microscopia óptica de Brillouin (VAZIRANI; BASU, 2013).

Atualmente, o tratamento do ceratocone pode ser feito com correção óptica, lentes de contato, *crosslinking* do colágeno, anéis intraestromais e lentes fáticas tóricas e esféricas de câmara posterior (VAZIRANI; BASU, 2013; PIÑERO; ALCÓN, 2014). Dentre esses tipos de tratamento, o *crosslinking* é o mais comumente utilizado para deter a progressão do ceratocone, consistindo no fortalecimento da córnea com riboflavina à luz ultravioleta, o qual promove um aumento de ligações covalentes entre as fibras de colágeno que constituem a córnea (GODEFROOIJ et al., 2016).

1.4 Ceratocone: aspectos genéticos

Dados da literatura mostram que o ceratocone é uma doença de ordem complexa e multifatorial, a qual está associada à várias síndromes genéticas e diversas outras patologias. Apesar de vários estudos apontarem que o ceratocone é caracterizado por herança dominante, análises genéticas mais conclusivas ainda devem ser realizadas para as identificações de padrões de herança dos vários subtipos do ceratocone, bem como encontrar dados genéticos e moleculares mais consistentes relacionados ao surgimento dessa anomalia (RABNOWITZ et al., 1998; DEHKORDI et al., 2013;

FARJADNIA; NADERAN; MOHAMMADPOUR, 2015; SHETTY et al., 2015; ALDAVE et al., 2016; FARZADFARD et al., 2016).

Segundo Sugar e Macsai (2012), muitas questões ainda não foram totalmente esclarecidas, como pré-disposição genética associada a fatores ambientais, se o ceratocone é realmente uma doença não inflamatória e/ou se este surge primeiro como resultado de uma desordem genética ou por meio de fatores mediadores (relacionados a outras patologias), os quais levam ao desenvolvimento da doença.

Estudos de herança familiar e com gêmeos reforçam a grande contribuição genética, pois a incidência da doença em famílias que já possuem histórico positivo é maior do que em relação à população em geral. Aproximadamente 23% dos pacientes que apresentam ceratocone possuem um histórico familiar (HUGHES et al., 2003; RABINOWITZ, 2003; KARIMIAN et al., 2008).

Estudos indicam que, assim como outras doenças oculares, membros de famílias as quais já possuem histórico de caso de ceratocone apresentam um risco de até 67 vezes maior de os descendentes desenvolver a doença, em comparação com famílias não afetadas, as quais apresentam membros com caso de ceratocone esporádico (RABINOWITZ, 1998; ROMERO-JIMENEZ; SANTODOMINGO-RUBIDO, 2010).

Na maioria de casos de ceratocone familiar, a doença caracteriza-se por ser autossômica dominante. Já o padrão autossômico recessivo pode surgir em populações com alta consanguinidade (STABUC-SILIH et al, 2010; ABU-AMERO; KALANTAN; AL-MUAMMAR, 2011). Gêmeos monozigóticos também apresentam alto risco entre si de desenvolvimento da doença (TUFT et al., 2012; BYKHOVSKAYA et al., 2012; WHEELER et al., 2013; MIKAMI et al., 2013; HASANIAN-LANGROUDI et al., 2014).

Esta anomalia ocular também está associada à inúmeras síndromes genéticas, destacando-se entre elas Marfan, Down, Turner e

Kurz, além de várias desordens oculares e corneanas em geral, como esclerótica azul, amaurose congênita de Leber, ceratoconjuntivite atópica, distrofia filiforme profunda da córnea, atrofia essencial da íris, microcornea dentre outras (RABINOWITZ, 1998; EDWARDS; MCGHEE; DEAN, 2001; SARAVANI et al., 2015). Em relação às síndromes genéticas, desordens oculares e doenças sistêmicas, algumas já citadas acima, com as quais o ceratocone está associado, pode-se subdividi-las em quatro grandes grupos (EDWARDS; MCGHEE; DEAN, 2001; SUGAR; MACSAI, 2012):

a) Desordens do tecido conjuntivo com elasticidade anormal de fibras de colágeno: Síndrome da córnea frágil, displasia congênita do quadril, hiper mobilidade articular, Onico-osteo displasia hereditária (síndrome de HOOD), síndrome de Ehlers-Danlos, Osteogênese Imperfeita, síndrome de Marfan, prolapso de válvula mitral e pseudoxantoma elástico.

b) Atopia ou eczema associado com o coçar dos olhos: Síndrome de Down, síndrome hiper-IgE, ictiosis, síndrome oculodentodigital, autografismo, síndrome de Turner (linfagiectasia conjuntival) e síndrome de Mulvihill-Smith.

c) Função retiniana anormal com estímulo óculo-digital: Albinismo, rubéola congênita, amaurose congênita de Leber, neurofibromatose, retinose pigmentar, síndrome de Laurence–Moon–Bardet–Biedl, distrofia de cone, degeneração tapetoretiniana, síndrome de Kurz.

d) Retardo mental associado com estímulo óculo-digital: Síndrome de Apert, síndrome de Crouzon, Síndrome de Angelman, hiperornitinemia e síndrome de Noonan.

Estudos familiares envolvendo até três gerações afetadas por osteogênese imperfeita indicam anormalidades de tecido conjuntivo, as quais também são responsáveis por algumas formas de ceratocone

(SHARIF; CASEY; COLART, 1992; ROSE et al., 1995; BECKH; SCHONHERR; NAUMANN, 1995).

Os estudos genéticos têm como principal objetivo a identificação de mutações em genes que estejam diretamente ligados ao ceratocone. Mas essas bases genéticas ainda se encontram pouco documentadas (RABINOWITZ, 2003; JEOUNG et al., 2012).

Estudos desenvolvidos através do GWAS (*Genome-Wide Association Study*) já identificaram uma série de SNPs (polimorfismos de nucleotídeo único) e locos gênicos relacionados ao ceratocone (LU et al., 2013). Mas esses estudos também destacam as taxas de falha devido à tecnologia empregada, sugerindo que outras pesquisas genéticas devam ser realizadas (LI et al., 2012).

Abaixo encontram-se listados alguns dos principais genes abordados em estudos genéticos e moleculares envolvendo o ceratocone.

O gene *VSX1* (*Visual System Homeobox 1*) está localizado no cromossomo 20p11-q11. O *VSX1* possui tamanho de aproximadamente 6,2 kb e possui cinco éxons, sendo expresso em tecidos da retina e córnea. Especificamente na córnea, este gene é expresso pelos queratócitos mediante lesões, atuando na transformação fibroplástica (HAYASHI; HUANG; DEEB, 2000; SEMINA; MINTZ-HITTNER; MURRAY, 2000; DE BONIS et al., 2011; MOUSSA et al., 2017).

O gene *VSX1* codifica um domínio proteico que se liga ao centro da região de controle do grupo gênico responsável pelos pigmentos visuais verde e vermelho, regulando assim a expressão dos genes que codificam opsinas para os cones, durante o desenvolvimento embrionário (CHOW et al., 2004; OHTOSHI et al., 2004); além da expressão em tecidos oculares (HAYASHI; HUANG; DEEB, 2000; SEMINA; MINTZ-HITTNER; MURRAY, 2000; HEON et al., 2002).

O loco do *VSX1* constitui-se de um loco de ligação conhecido devido à distrofia polimorfa posterior da córnea (PPCD). A

PPCD e o ceratocone estão relacionados em diversos estudos da literatura, os quais identificaram mutações no gene *VSX1*, as quais também podem levar à manifestação de ceratocone, pois esses estudos têm observado que a PPCD e o ceratocone estão envolvidos em similares processos de alteração da curvatura da córnea (WEISSMAN, 1989; DRIVER; REED; DAVIS, 1994; HEON et al., 1995; HEON et al., 2002; DE BONIS et al., 2011; JEOUNG et al., 2012; MOUSSA et al., 2017).

Desde 2002, estudos abordando mutações no gene *VSX1* demonstram que estas estão relacionadas ao ceratocone, além de outras distrofias oculares (MOK; BAEK; JOO, 2008; SAEED-RAD et al., 2011). Vários locos já foram mapeados identificando vários genes, os quais se encontram muito ou pouco expressos em córneas com ceratocone (LI et al., 2006; BISCEGLIA et al., 2009; LEE et al., 2009; LISKOVA et al., 2010; LEMA et al., 2010; DE BONIS et al., 2011) e muitos autores destacam o gene *VSX1* como um fator genético relevante no surgimento desta anomalia. Até o momento já foram identificadas seis mutações potenciais neste gene (p.L17P, p.N151S, p.G160V, p.R166W, p.Q175H e p.G239R) exclusivamente em pacientes acometidos por ceratocone. Além disso, esses estudos sustentam a hipótese da heterogeneidade genética e traço multifatorial dessa doença (DE BONIS et al., 2011).

O gene *SOD1* apresenta o tamanho de 9.320 pb, sendo que apenas 645 pb são codificantes. Apresenta cinco éxons os quais codificam um polipeptídeo de 154 aminoácidos (HIRANO et al., 2000; KAWATA et al., 2000).

O gene *SOD1* localiza-se no cromossomo 21 e está diretamente relacionado à Síndrome de Down (trissomia do 21). Assim esses pacientes apresentam um alto risco de desenvolver o ceratocone (DE BONIS et al., 2011). Aproximadamente 15% de portadores de Síndrome de Down em populações caucasianas apresentam ceratocone, o que não é comum em população asiática (KIM et al., 1999).

Udar et al. (2006) realizou estudos envolvendo o gene *SOD1* em diversos pacientes acometidos por ceratocone, descobrindo uma deleção de sete pb no íntron 2 desse gene, denominada c.169+50delTAAACAG. Além disso, análises envolvendo mRNA apresentaram duas variações de *splicing* durante a transcrição, resultando em codificações de proteínas *SOD1* com queda de atividade antioxidante em tecido corneano afetado por ceratocone devido à perda dos éxons 2 e/ou dos éxons 2 e 3 do gene *SOD1*, causadas por essa mutação (UDAR et al., 2006; ARNAL et al., 2011; DE BONIS et al., 2011; SAEERAD et al., 2013).

Pesquisas de *screening* genético envolvendo o gene *SOD1* têm sido realizadas para detectar mutações, já descritas anteriormente, em diferentes populações, com o objetivo de relacioná-las efetivamente à etiologia do ceratocone. Mas os resultados obtidos acabam sendo controversos e destacam a falta de mais estudos que possam confirmar seus achados, sugerindo que novas análises genéticas devam ser estendidas a outras populações de diferentes etnias (AL-MUAMMAR et al., 2014; FARJADNIA; NADERAN; MOHAMMADPOUR, 2015).

Mutações no gene *SOD1* também estão associadas à esclerose lateral amiotrófica (ALS), uma doença neurodegenerativa caracterizada pela perda de função dos neurônios motores, além de contribuir para efeitos neurotóxicos nessas células (ROSEN et al., 1993; DENG et al., 1993).

Como já dito anteriormente, a atividade de metaloproteinases compromete a córnea de pacientes com ceratocone, acompanhada da desregulação da atividade dos inibidores de metaloproteinases (TIMPs – *Tissue Inhibitors of Metalloproteinases*). Os TIMPs possuem a função de inibir naturalmente as metaloproteinases da matriz (MMPs – *Matriz Metalloproteinases*). As MMPs formam um grupo de endopeptidases dependentes de zinco e podem estar associadas à

membrana ou podem ser secretadas. As ações conjuntas de TIMPs e MMPs são equilibradas e desempenham funções fisiológicas importantes, destacando-se desenvolvimento embrionário, remodelação do tecido conjuntivo, cicatrização de feridas, angiogênese dentre outras (DE BONIS et al., 2011).

Estudos têm sido realizados em relação à ação dos TIMPs sobre a viabilidade das células do estroma, e demonstram que o aumento da expressão do gene *TIMP3* (*Tissue Inhibitor of Metalloproteinase 3*) promove apoptose em células estromais (MATTHEWS et al., 2007). Um estudo envolvendo *microarrays* do cDNA, identificou diferenças de expressão do gene *TIMP3* em córneas afetadas por ceratocone (LEE et al., 2009), tornando esse gene um candidato aos estudos dessa patologia.

O gene *TIMP3* desempenha papel importante na matriz extracelular em relação a sua maturação e remodelação, sendo que mutações nesse gene podem levar à perda de componentes estruturais da córnea, culminando com o afinamento típico observado em ceratocone (DE BONIS et al., 2011).

O gene *LOX* está localizado na região 5q23.2 e é formado por sete éxons e seis íntrons, resultando em um fragmento de DNA de aproximadamente 14,5 kb (HAMALAINEN et al., 1991). Esse gene apresenta função fisiológica muito importante para a estabilidade do tecido conjuntivo e vascular, apresentando alta expressão na pele e também promove a invasão de células tumorais e o processo de metástase de muitos cânceres. Também está relacionado a várias estruturas oculares, sendo considerado um importante candidato no desenvolvimento do ceratocone (DUDAKOVA et al., 2012).

O gene *LOX* codifica a enzima lisil-oxidase (LOX), uma enzima dependente de cobre a qual está relacionada à morfogênese e à organização da matriz extracelular em muitos tecidos. Essa enzima desempenha papel importante na construção e reparação da matriz,

através da oxidação de resíduos de lisina em fibras de colágeno e elastina, promovendo assim o início de ligações covalentes cruzadas, as quais estabilizam essas fibras (HASANIAN-LANGROUDI et al., 2014).

Em estudos de Bykhovskaya et al. (2016), vários SNPs foram encontrados ao longo do gene *LOX*, destacando-se os SNPs rs10519694 e rs2956540, localizados no íntron 4, os quais apresentaram associações com o ceratocone, o que podem levar a um aumento da susceptibilidade de desenvolvimento da doença. Ainda de acordo com Bykhovskaya et al. (2016), existem vários sinais de poliadenilação dentro da região UTR devido a existência de múltiplos locais de iniciação da transcrição e *splicing* alternativo, gerando muitas isoformas proteicas. Relacionado ao ceratocone destacam-se o polimorfismo rs1800449 no éxon 1 e o polimorfismo rs2288393 no éxon 2 do gene *LOX*, resultando em transcrito I e transcrito II respectivamente. Assim, supõe-se que na presença desses SNPs, esses transcritos resultam na tradução de isoformas proteicas que não se interagem no tecido da córnea, levando a uma redução das fibras de colágeno e por consequência enfraquecimento desse tecido.

O gene *SPARC* (*Secreted Protein Acidic and Cysteine Rich*) codifica uma proteína de matriz a qual promove alterações celulares, inibe a progressão do ciclo celular e influencia a síntese de matriz extracelular. Junto ao *LOX*, também está localizado no braço longo do cromossomo 5, em uma região de provável ligação ao ceratocone devido a estudos realizados em alguns pedigrees (BISCEGLIA et al., 2009; DE BONIS et al., 2011).

O gene *DOCK9* (*Dedicator of Cytokinese 9*) tem apresentado associação à etiologia do ceratocone devido à presença de polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs) (KAROLAK et al., 2016). Este gene codifica um membro da família de proteínas DOCK 9, as quais estão envolvidas no processo de transformação GTP/GDP, além do processo

de ativação da proteína CDC42 (*Cell division control protein 42 homolog*), a qual é uma GTPase da família Rho (WATSON; CHOW, 2011).

Czugala et al. (2012) averiguaram 51 pacientes com ceratocone pertencentes a 15 famílias e documentaram uma mutação *missense* (c.2262 A>C) no gene *DOCK9*, a qual promove alteração de uma glutamina para uma histidina na proteína, alterando a forma e função desta. Estes mesmos autores também encontraram a alteração c.720+43 A>G numa região intrônica deste gene em todos os indivíduos afetados de uma dessas famílias (denominada KTCN-014), sugerindo que tal mutação pode afetar o processo de *splicing* do mRNA, o que pode ocasionar mudanças na estrutura terciária da proteína, alterando sua função.

Recentemente, GWAS estabeleceram variantes comuns no gene *ZNF469*, relacionadas à espessura da córnea central (CCT), o que representa também um grande fator de risco para ao desenvolvimento do ceratocone, tornando *ZNF469* um excelente candidato para estudos em populações que apresentam essa anomalia (LU et al., 2013; VINCENT et al., 2014; DAVIDSON et al., 2015).

A proteína *ZNF469* apresenta cinco domínios C2H2 *zinc finger* na parte C-terminal e está envolvida no processo de transcrição e, por possuir 30% de homologia com alguns tipos de fibra de colágeno como o COL1A1 e COL1A2, sugere-se que a proteína *ZNF469* regula a síntese e a organização de fibras de colágeno (os quais são os constituintes de maior quantidade na córnea) (ABU et al., 2008; LECHNER et al., 2014; KAROLAK et al., 2016).

Um segundo gene de fator de transcrição, *PRDM5*, também está relacionado ao ceratocone. A proteína *PRDM5* está envolvida no desenvolvimento e manutenção de matriz extracelular, codificando fatores reguladores os quais modulam a deposição de fibras de colágeno, e, quando o gene está mutado, contribui para a redução da CCT através de desordens do tecido conjuntivo (MICHEAL et al., 2016).

Até o presente, muitos estudos consideram o ceratocone uma doença não-inflamatória (BYKHOVSKAYA et al. 2012; WHEELER et al., 2013; AL-MUAMMAR et al., 2015; FARJADNIA; NADERAN; MOHAMMADPOUR, 2015; GHASSEMBAGLOU; DJALILIAN, 2016). Entretanto, alguns trabalhos têm associado a presença de processos inflamatórios à etiologia do ceratocone (GABR et al., 2011; JUN et al., 2011; WISSE et al., 2015).

A Interleucina-17 (IL-17) é uma citocina pró-inflamatória presente em muitas situações de inflamação crônica (MURUGAIYAN; SAHA, 2009). Jun et al. (2011) observaram elevados níveis de IL-17 em amostras de lágrima de pacientes ceratoconizados. Assim, existe a hipótese da IL-17 estar relacionada ao processo inflamatório da córnea por estimular células estromais a produzirem outras interleucinas pró-inflamatórias, como a IL-6, que intermedia o processo de inflamação (GABR et al., 2011). Além disso, o receptor da IL-17 é constitutivamente expresso em fibroblastos residentes da córnea, e o estímulo dessas células por IL-17 leva à síntese de várias metaloproteinases de matriz, o que acabam causando danos estruturais corneanos, os quais estão presentes em ceratocone. Assim o aumento da expressão de IL-17 pode levar a prejuízos estruturais em córneas ceratoconizadas e também se relacionar com a severidade da doença (WISSE et al., 2015). Também, em estudo recente, Shetty et al. (2015), reportaram níveis moderadamente elevados de expressão de transcritos de IL-6 em pacientes ceratoconizados.

Apesar de muitos esforços terem sido realizados durante duas décadas de pesquisas na tentativa de desvendar fatores efetivos que causam o ceratocone, sua etiologia e seus mecanismos patológicos ainda são pouco conhecidos (NIELSEN et al., 2013).

Assim, mediante a complexidade multifatorial do ceratocone, às inferências de fatores genéticos envolvidos em sua origem e desenvolvimento e devido à falta de estudos que corroborem os

mecanismos genéticos efetivos envolvidos com essa doença até o momento, torna-se, segundo De Bonis et al. (2011), imprescindível a continuação de pesquisas genéticas e moleculares afim de se obter fatores genéticos mais conclusivos.

6 CONCLUSÕES

- Conclui-se, de acordo com os resultados obtidos neste estudo, que houve a ausência de alterações genéticas patogênicas nos genes *VSX1*, *SOD1*, *TIMP3* e *LOX* em pacientes ceratoconizados, os quais participaram deste trabalho.

-Os SNPs encontrados nas regiões codificantes dos genes *VSX1* e *TIMP3* podem ser considerados neutros, uma vez que promovem trocas sinônimas de aminoácidos nas proteínas.

-Outros fatores genéticos, além desses genes abordados por este estudo, aliados aos fatores ambientais e comportamentais, possam estar relacionados ao surgimento do ceratocone nos indivíduos analisados.

7 REFERÊNCIAS

ABU, A.; FRYDMAN, M.; MAREK, D. et al. Deleterious mutations in the *Zinc-Finger 469* gene cause Brittle Cornea Syndrome. **The American Journal of Human Genetics**, v. 82, p. 1217-1222, 2008.

ABU-AMERO, K.K.; KALANTAN, H.; AL-MUAMMAR, A.M. Analysis of the *VSX1* gene in keratoconus patients from Saudi Arabia. **Mol Vis**, v. 17, p. 667-672, 2011.

ALDAVE, A. J.; YELLORE, V. S.; SALEM, A. K. et al. No *VSX1* gene mutations associated with keratoconus. **Investigative Ophthalmology & Visual Science**, v. 47, n. 7, p. 2820-2822, 2006.

ALIÓ, J. L.; SHABAYEK, M. H. Corneal higher order aberrations: a method to grade keratoconus. **J Refract Surg.**, v. 22, n. 6, p. 539-45, 2006.

AL-MUAMMAR, A.M.; KALATAN, H.; AZAD, T.A. et al. Analysis of *SOD1* gene in keratoconus patients from Saudi Arabia. **Ophthalmic Genetics**, p.1-3, 2014.

AMBRÓSIO, R.; ALONSO, R. S.; LUZ, A.; COCAVELARDE, L. G. Corneal-thickness spatial profile and corneal-volume distribution: tomographic indices to detect keratoconus. **J Cataract Refract Surg.**, v. 32, n. 11, p. 1851-1859, 2006.

AMBRÓSIO, R.; CAIADO, A. L.; GUERRA, F. P.; LOUZADA, R.; ROY, A. S.; LUZ, A. et al. Novel pachymetric parameters based on corneal tomography for diagnosing keratoconus. **J Refract Surg.** v. 27, n. 10, p. 753-758, 2011.

AMSLER, M. The "forme fruste" of keratoconus. **Wiener klinische Wochenschrift**, v. 73, p. 842-843, 1961.

ARNAL, E.; PERIS-MARTINEZ, C.; MENEZO, J. L.; JOHNSEN-SORIANO, S.; ROMERO, F.J. Oxidative stress in keratoconus? **Invest Ophthalmol Vis Sci**, v. 52, p. 8592-8597, 2011.

BAE, G. H.; KIM, J. R.; KIM, C. H.; LIM, D. H.; CHUNG, E. S.; CHUNG, T. Y. Corneal topographic and tomographic analysis of fellow eyes in unilateral keratoconus patients using Pentacam. **Am J Ophthalmol.**, v. 157, n. 1, p. 103-109.e1, 2014.

BALASUBRAMANIAN, S.A.; PYE, D.C.; WILLCOX, M.D.P. Are proteinases the reason for keratoconus? **Current Eye Research**, v. 35, n. 3, p.185-191, 2010.

BARR, J. T.; WILSON, B. S.; GORDON, M. O. et al. Estimation of the incidence and factors predictive of the corneal scarring in the Collaborative Longitudinal Evaluation of Keratoconus (CLEK) study. **Cornea**, v. 25, n. 1, p. 16-25, 2006.

BAWAZEER, A.M.; HODGE, W.G.; LORIMER, B. Atopy and keratoconus: a multivariate analysis. **Br J Ophthalmol**, v. 84, p. 834-836, 2000.

BECKH, U.; SCHONHERR, U.; NAUMANN, G.O. Autosomal dominant keratoconus as the chief ocular symptom in Lobstein osteogenesis imperfecta tarda. **KlinMonbl fur Augenheilkd**, v. 206, p. 268-272, 1995.

BEHNDIG, A.; KARLSSON, K.; JOHANSSON, B.O.; BRÄNNSTRÖM, T.; MARKLUND, S. L. Superoxide dismutase isoenzymes in the normal and diseased human cornea. **Invest Ophthalmol Vis Sci**, v. 42, p. 2293-6, 2001.

BISCEGLIA, L.; De BONIS, P.; PIZZICOLI, C. et al. Linkage analysis in Keratoconus: Replication of locus 5q21.2 and Identification of other suggestive loci. **Investigative Ophthalmology & Visual Science**, v. 50, n. 3, 2009.

BISCEGLIA, L.; DE BONIS, P.; PIZZICOLI, C. et al. Linkage analysis in Keratoconus: replication of locus 5q21.2 and Identification of other suggestive loci. **Investig Ophthalmol Vis Sci**, v. 50, n.3, 2005.

BURDON, K.P.; VINCENT, A.L. Insights into keratoconus from a genetic perspective. **Clin Exp Optom**, v. 96, n. 2, p. 146-154, 2013.

BYKHOVSKAYA, Y; LI, X; EPIFANTSEVA, I, et al. Variation in the Lysyl Oxidase (LOX) Gene Is Associated with Keratoconus in Family-Based and Case-Control Studies. **IOVS**, v. 53, n. 7, 2012.

CHANG, H.-Y. ; CHODOSH, J. The Genetics of Keratoconus. **Seminars in Ophthalmology**, v. 28 (5-6), p. 275-280, 2013.

CHEN, D.; LAM, A. K. Intrasession and intersession repeatability of the Pentacam system on posterior corneal assessment in the normal human eye. **J Cataract Refract Surg.**, v. 33, n. 3, p. 448-454, 2007.

CHOW, R. L.; VOLGYI, B.; SZILARD, R.K. et al. Control of late off-center cone bipolar cell differentiation and visual signaling by the homeobox gene *Vsx1*. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 101, p. 1754-1759, 2004.

COLLIER, S.A. Is the corneal degradation in keratoconus caused by matrix-metalloproteinases? **Clin Experiment Ophthalmol.**, v. 29, p. 340-344, 2001.

CRITCHFIELD, J.W.; CALANDRA, A.J.; NESBURN, A.B.; KENNEY, M.C. Keratoconus: I. Biochemical studies. **Exp Eye Res**, v. 46, p. 953-63, 1988.

CZUGALA, M.; KAROLAK, J.A.; NOWAK, D.M. et al. Novel mutation and three other sequence variants segregating with phenotype at keratoconus 13q32 susceptibility locus. **Eur J Hum Genet**, v. 20, n. 4, p. 389-397, 2012.

DAVIDSON, A.E.; BORASIO, E.; LISKOVA, P. et al. Brittle Cornea Syndrome *ZNF469* mutation carrier phenotype and segregation analysis of rare *ZNF469* variants in familial keratoconus. **IOVS**, v. 56, n. 1, p. 578-586, 2015.

DE BONIS, P.; LABORANTE, A.; PIZZICOLI, C., et al. Mutational screening of *VSX1*, *SPARK*, *SOD1*, *LOX*, AND *TIMP3* in Keratoconus. **Mol Vis**, v. 17, p. 2482-2494, 2011.

DEHKORDI, F. A.; RASHKI, A.; BAGHERI, N. et al. Study of *VSX1* Mutations in Patients with Keratoconus in Southwest Iran Using PCRSingle-Strand Conformation Polymorphism/Heteroduplex Analysis and Sequencing Method. **Acta Cytologica**, v. 57, p. 646–651, 2013.

DENG, H.X.; HENTATI, A.; TAINER, J.A. et al. Amyotrophic lateral sclerosis and structural defects in Cu, Zn superoxide dismutase. **Science**, v. 261, p.1047–1051, 1993.

DRIVER, P.J.; REED, J.W.; DAVIS, R.M. Familial cases of keratoconus associated with posterior polymorphous dystrophy. **Am J Ophthalmol**, v. 118, p. 256-257, 1994.

DUDAKOVA, L.; LISKOVA, P.; TROJEK, T., et al. Changes in lysyl oxidase (LOX) distribution and its decreased activity in keratoconus corneas. **Experimental Eye Research**, v. 104, p. 74-81, 2012.

EDWARDS, M.; MCGHEE, C.N.; DEAN, S. The genetics of keratoconus. **Clin Experiment Ophthalmol**, v. 29, p. 345-51, 2001.

EL-TARRAS, A. E.; THOMALI, T. A.; GHAMDI, A. A. Molecular genetic analysis of *VSX1* Gene Mutations Associated with Keratoconus at Taif governorate, KSA. **Int.J.Curr.Microbiol.App.Sci**, v. 4, n. 7, p. 525-531, 2015.

FARJADNIA, M.; NADERAN, M.; MOHAMMADPOUR, M. Gene therapy in keratoconus. **Oman J Ophthalmol**, v.8, n. 1, p.3-8, 2015.

FARZADFARD, A.; NASSIRI, N.; MOGHADAM, T.N. et al. Screening for MIR184 mutations in Iranian patients with keratoconus. **Journal of Ophthalmic and Vision Research**, v.11, n. 1, p. 3-7, 2016.

GABR, M.A.; JING, L.; HELBLING, A.R. et al. Interleukin-17 synergizes with IFN γ or TNF α to promote inflammatory mediator release and intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) expression in human intervertebral disc cells. **J Othop Res**, v. 29, p. 1-7, 2011.

GALVIS, V.; SHERWIN, T.; TELLO, A. et al. Keratoconus: an inflammatory disorder? **Eye**, v. 29, p. 843-859, 2015.

GARTNER, L. P.; HIATT, J. L. Sentidos especiais. In: **Tratado de Histologia em cores**: 3. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2007. p. 516-542

GARTNER, L. P.; HIATT, J. L. Sentidos especiais. In: **Histologia essencial**. Rio de Janeiro: Elsevier, 2011. p. 304-326

GHASSEMBAGLOU, N.; DJALILIAN, A. R. Keratoconus; a True Corneal Disease. **J Ophthalmic Vis Res**, v. 11(1), p.1-2, 2016.

GHOSH, A.; ZHOU, L.; GHOSH, A. et al. Proteomic and gene expression patterns of keratoconus. **Indian journal of ophthalmology**, v. 61, n. 8, 389-391, 2013.

GODEFROOIJ, D. A.; BOOM, K.; SOETERS, N. et al. Predictors for treatment outcomes after corneal crosslinking for keratoconus: a validation study. **Int Ophthalmol**, p.1-8, 2016.

GORDON-SHAAG, A.; MILLODOT, M.; SHNEOR, E. et al. The genetic and environmental factors for keratoconus. **Biomed Res Int**, v. 2015, 2015.

GREENSTEIN, S. A.; FRY, K. L.; BHATT, J.; HERSH, P. S. Natural history of corneal haze after collagen crosslinking for keratoconus and corneal ectasia: Scheimpflug and biomicroscopic analysis. **J Cataract Refract Surg.**, v. 36, n. 12, p. 2105-2114, 2010.

GRZYBOWSKI, A.; MCGHEE, C. N. The early history of keratoconus prior to Nottingham's landmark 1854 treatise on conical cornea: a review. **Clin Exp Optom.**, v. 96, n. 2, p. 140-5, 2013.

HAMALAINEN, E. R.; JONES, T. A.; SHEER, D. et al. Molecular cloning of human lysyl oxidase and assignment of the gene to chromosome 5q23.3-31.2. **Genomics**, v. 11, n. 3, p. 508-516, 1991.

HASANIAN-LANGROUDI, F.; SARAVANI, R.; VALIDAD, M-H. et al. Association of Lysyl oxidase (LOX) polymorphisms with the risk of Keratoconus in an Iranian population. **Ophthalmic Genetics**, p. 1-6, 2014.

HAYASHI, T.; HUANG, J.; DEEB, S.S. RINX(VSX1), a novel homeobox gene expressed in the inner nuclear layer of the adult retina. **Genomics**, v. 67, p. 128-139, 2000.

HEON, E.; GREENBERG, A.; KOPP, K.K.; ROOTMAN, D.; VINCENT, A.L. et al. VSX1: a gene for posterior polymorphous dystrophy and keratoconus. **Hum Mol Genet**, v. 11, p. 1029-1036, 2002.

HEON, E.; MATHERS, W.D.; ALWARD, W.L.; WEISENTHAL, R.W.; SUNDEN, SL, et al. Linkage of posterior polymorphous corneal dystrophy to 20q11. **Hum Mol Genet**, v. 4, p. 485-488, 1995.

HIRANO, M.; HUNG, W.Y.; COLE, N. et al. Multiple transcripts of the human Cu, Zn superoxide dismutase gene. **Biochem Biophys Res Commun.**, v. 276, p. 52–56, 2000.

HUGHES, A.E.; DASH, D.P.; JACKSON, A.J. et al. Familiar keratoconus with cataract: linkage to the long arm of chromosome 15 and exclusion of candidate genes. **Invest Ophthalmol Vis Sci.**, v. 44, p. 5063–5066, 2003

ISHII, R.; KAMIYA, K.; IGARASHI, A.; SHIMIZU, K.; UTSUMI, Y.; KUMANOMIDO, T. Correlation of corneal elevation with severity of keratoconus by means of anterior and posterior topographic analysis. **Cornea**, v. 31, n. 3, p. 253-258, 2012.

JEOUNG, J.K.; KIM, M.K.; PARK, S.S. et al. VSX1 gene and Keratoconus: Genetic analysis in Korean patients. **Cornea**, v. 31, n.7, 2012.

JUN, A.S.; COPE, L.; SPECK, C. et al. Subnormal cytokine profile in the tear fluid in keratoconus patients. **Plos One**, v. 6, n. 1, 2011.

JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. Sistemas fotorreceptor e audiorreceptor. In: **Histologia básica**: 12. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2013. p: 447-465

KALKAN AKCAY, E.; UYSAL, B. S.; SARAC, O.; UGURLU, N.; YULEK, F.; CAGIL, N. et al. The Effect of Corneal Epithelium on Corneal Curvature

in Patients with Keratoconus. In: Seminars in ophthalmology. **Informa Healthcare**, v. 30, n. 5-6, p. 364-371, 2015.

KAMIYA, K.; ISHII, R.; SHIMIZU, K.; IGARASHI, A. Evaluation of corneal elevation, pachymetry and keratometry in keratoconic eyes with respect to the stage of Amsler-Krumeich classification. **Br J Ophthalmol.**, v. 98, n. 4, p. 459-463, 2014.

KARIMIAN, F.; ARAMESH, S.; RABEL, H.M. et al. Topographic Evaluation of Relatives of Patients with Keratoconus. **Cornea**, v. 27, n. 8, 2008.

KAROLAK, J.A.; POLAKOWSKI, P.; SZAFLIK, J. et al. Molecular screening of keratoconus susceptibility sequence variants in VSX1, TGFBI, DOCK9, STK24, and IPO5 genes in polish patients and novel TGFBI variant identification. **Ophthalmic genetics**, v. 37, n. 1, p. 37-43 2014.

KAWATA, A.; KATO, S.; SHIMIZU, T. et al. Aberrant splicing of human Cu/Zn superoxide dismutase (SOD1) RNA transcripts. **Neuroreport.**, v. 11, p. 2649–2653, 2000.

KENNEY, M.C.; CHWA, M.; ATILANO, S.R.; TRAN, A.; CARBALLO, M.; SAGHIZADEH, M.; VASILIOU, V.; ADACHI, W.; BROWN DJ. Increased levels of catalase and cathepsin V/L2 but decreased TIMP-1 in keratoconus corneas: evidence that oxidative stress plays a role in this disorder. **Invest Ophthalmol Vis Sci**, v. 46, p. 823-32, 2005.

KIM, W.J.; RABINOWITZ, Y.S.; MEISLER, D.M.; WILSON, S.E. Keratocyte apoptosis associated with keratoconus. **Exp. Eye Res**, v. 69, p. 475–81, 1999.

KLYCE, S. D. Computer-assisted corneal topography. High-resolution graphic presentation and analysis of keratoscopy. **Invest Ophthalmol Vis Sci.**, v. 25, n. 12, p. 1426-1435, 1984.

KLYCE, S. D. Chasing the suspect: keratoconus. **Br J Ophthalmol.**, v. 93, n. 7, p. 845-847, 2009.

LAPID-GORTZAK, R.; ROSEN, S.; WEITZMAN, S. et al. Videokeratography findings in children with vernal keratoconjunctivitis versus those of healthy children. **Ophthalmology**. v. 109, p. 2018–2023, 2002.

LECHNER, J.; PORTER, L.F.; RICE, A. et al. Enrichment of pathogenic alleles in the brittle cornea gene, *ZNF469*, in Keratoconus. **HMG**, jun 2014.

LEE, J.E.; OUM, B.S.; CHOI, H.Y.; LEE, S.U.; LEE, J.S. Evaluation of differentially expressed genes identified in keratoconus. **Mol Vis**, v. 15, p. 2480-7, 2009

LEMA, I.; BREA, D.; RODRÍGUEZ-GONZÁLEZ, R.; DÍEZ-FEIJOO, E.; SOBRINO, T. Proteomic analysis of the tear film in patients with keratoconus. **Mol Vis**, v. 16, p.2055-61, 2010.

LI, X.; BYKHOVSKAYA, Y.; HARITUNIANS, T. et al. A genome-wide association study identifies a potential novel gene locus for keratoconus, one of the commonest causes for corneal transplantation in developed countries. **Hum. Mol.**,2012.

LI, X.; RABINOWITZ, Y.S.; TANG, Y.G.; PICORNELL, Y.; TAYLOR, K.D.; HU, M.; YANG, H. Two-stage genome-wide linkage scan in keratoconus sib pair families. **Invest Ophthalmol Vis Sci**, v. 47, p. 3791-5, 2006.

LIM, L.; WEI, R. H.; CHAN, W. K.; TAN, D. T. Evaluation of keratoconus in Asians: role of Orbscan II and Tomey TMS-2 corneal topography. **Am J Ophthalmol.**, v. 143, n. 3, p. 390-400, 2007.

LISKOVA, P.; DUDAKOVA, L.; KREPELOVA, A. et al. Replication of SNP associations with keratoconus in a Czech cohort. **PLoS ONE**, v. 12, n. 2, 2017.

LISKOVA, P.; HYSI, P.G.; WASEEM, N.; EBENEZER, N.D.; BHATTACHARYA, S.S. et al. Evidence for keratoconus susceptibility locus on chromosome 14: a genomewide linkage screen using single-nucleotide polymorphism markers. **Arch Ophthalmol**, v. 128, p. 1191-1195, 2010.

LU, Y.; VITART, V.; BURDON, K. et al. Genome-wide association analyses identify multiple loci associated with central corneal thickness and keratoconus. **Nature Genetics**, v. 45, n. 2, p. 155-165, 2013.

MAEDA, N.; KLYCE, S. D.; SMOLEK, M. K.; THOMPSON, H. W. Automated keratoconus screening with corneal topography analysis. **Invest Ophthalmol Vis Sci.**, v. 35, n. 6, p. 2749-2757, 1994.

MACKIEWICZ, Z.; MAATTA, M.; STENMAN, M. et al. Collagenolytic proteinases in keratoconus. **Cornea**, v. 25, p. 603–610, 2006.

MATTHEWS, F.J.; COOK, S.D.; MAJID, M.A. et al. Changes in the balance of the tissue inhibitor of matrix metalloproteinases (TIMPs)-1 and -3 may promote keratocyte apoptosis in keratoconus. **Exp Eye Res.**, v. 84, p.1125–1134, 2007.

MCGHEE, C. N. Sir Norman McAlister Gregg Lecture: 150 years of practical observations on the conical cornea-what have we learned? **Clin Experiment Ophthalmol.**, v. 37, n. 2, p. 160-176, 2008.

MICHEAL, S.; SIDDIQUI, S.N.; ZAFAR, S.N. et al. Whole exome sequencing identifies a heterozygous missense variant in the *PRDM5* gene in a family with Axenfeld-Rieger syndrome. **Neurogenetics**, v. 17, p. 17-23, 2016.

MIKAMI, T.; MEGURO, A.; TESHIGAWARA, T. et al. Interleukin 1 Beta promoter polymorphism is associated with Keratoconus in a Japanese population. **Molecular Vision**, v. 19, p. 845-851, 2013.

MOK, J.W.; BAEK, S.J.; JOO, C.K. VSX1 gene variants are associated with keratoconus in unrelated Korean patients. **J Hum Genet**, v. 53, p. 842-849, 2008.

MOUSSA, S.; GRABNER, G.; RUCKHOFER, J. et al. Genetics in keratoconus – What is new? **The Open Ophthalmology Journal**, v. 11, p. 201-210, 2017.

MURUGAIYAN, G; SAHA, B. Protumor VS antitumor functions of IL-17. **J Immunol**, v. 183, p. 4169-4175, 2009.

NADERAN, M.; RAJABI, M.T.; ZARRINBAKHS, P. et al. Association between Family History and Keratoconus Severity. **Current Eye Research**, p. 1-5, 2016.

NIELSEN, K.; HJORTDAL, J.; PIHLMANN, M.; CORYDON, T. J. Update on the keratoconus genetics. **Acta Ophthalmol (Copenh)**, v. 91, p. 106-113, 2013.

NILFOROUSHAN, M. R.; SPEAKER, M.; MARMOR, M.; ABRAMSON, J.; TULLO, W.; MORSCHAUSER, D. et al. Comparative evaluation of refractive surgery candidates with Placido topography, Orbscan II, Pentacam, and wavefront analysis. **J Cataract Refract Surg.**, v. 34, n. 4, p. 623-631, 2008.

NOWAK, D.M.; GAJECKA, M. The genetics of keratoconus. **Middle East African Journal of Ophthalmology**, v. 18, n. 1, p. 2-6, 2016.

OHTOSHI, A.; WANG, S.W.; MAEDA, H.; SASZIK, S.M.; FRISHMAN, L.J. et al. Regulation of retinal cone bipolar cell differentiation and photopic vision by the CVC homeobox gene *Vsx1*. **Curr Biol**, v. 14, p. 530-536, 2004.

ORITA, M. et al. Rapid and sensitive detection of point mutations and DNA polymorphisms using the polymerase chain reaction. **Genomics**, v. 5, p. 874-879, 1989 a.

ORITA, M. et al. Detection of polymorphisms of human DNA by gel electrophoresis as single-strand conformation polymorphisms. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 86, p. 2766-2770, 1989 b.

ORTAK, H.; SÖGÜT, E.; MESCI, C. et al. The relation between Keratoconus and plasma levels of MMP-2, ZINC and SOD. **Cornea**, v. 31, n. 9, 2012.

OWENS, H.; GAMBLE, G. D.; BJORNHOLDT, M. C. et al. Topographic indications of emerging keratoconus in teenage New Zealanders. **Cornea**, v. 26, n. 3, 2007.

PIÑERO, D. P.; ALCÓN, N. In vivo characterization of corneal biomechanics. **J Cataract Refract Surg.**, v. 40, n. 6, p. 870-87, 2014.

RABINOWITZ YS. Keratoconus. **Surv Ophthalmol**, v.42(4), p. 297-319, 1998.

RABINOWITZ, Y. S. The genetics of keratoconus. **Ophthalmol Clin North Am**, v. 16, p. 607-20, 2003.

RABINOWITZ, Y.S.; RASHEED, K. KISA% index: a quantitative videokeratography algorithm embodying minimal topographic criteria for diagnosing keratoconus. **J Cataract Refract Surg.**, v. 25, p. 1327–1335, 1999.

REIS, L.M.; RODRIGUES, F.W.; SILVA, R.E. et al. Análise da relação da ocorrência de polimorfismo de nucleotídeo único do gene DOCK9 em ceratocone. **Ver Bras Oftamol**, v. 75, n. 3, p. 223-227, 2016.

ROMERO-JIMÉNEZ, M.; SANTODOMINGO-RUBIDO, J.; WOLFFSOHN, J. S. Keratoconus: a review. **Cont Lens Anterior Eye**, v. 33, n. 4, p. 157-66, 2010.

ROSS, M. H.; PAWLINA, W. Olho. In: **Histologia texto e atlas - em correlação com biologia celular e molecular**: 5. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008. p. 837-867

ROSE, N.J.; MACKAY, K.; BYERS, P.H.; DALGLEISH, R. A Gly238Ser substitution in the alpha 2 chain of type I collagen results in osteogenesis imperfecta type III. **Hum Genet**, v. 95, p. 215–218, 1995.

ROSEN, D.R.; SIDDIQUE, T.; PATTERSON, D. et al. Mutations in Cu/Zn superoxide dismutase gene are associated with familial amyotrophic lateral sclerosis. **Nature**, v. 362, p. 59-62, 1993.

SADY, C.; KHOSROF, S.; NAGARAJ, R. Advanced Maillard reaction and crosslinking of corneal collagen in diabetes. **Biochem Biophys Res Commun.**, v. 214, p. 793–797, 1995.

SAEE-RAD, S.; RAOOFIAN, R.; MAHBOD, M. et al. Analysis of superoxide dismutase 1, dual-specificity phosphatase 1, and transforming growth factor, beta 1 genes expression in keratoconic and non-keratoconic corneas. **Molecular vision** , v. 19, p. 2501-2507, 2013.

SAEE-RAD, S.; HASHEMI, H.; MIRAFTAB, M.; NOORI-DALOII, M.R.; CHALESHTORI, M.H. et al. Mutation analysis of VSX1 and SOD1 in Iranian patients with keratoconus. **Mol Vis**, v. 17, p. 3128-3136, 2011.

SARAVANI, R.; HASANIAN-LANGROUDI, F.; VALIDAD, M-H. et al. Evaluation of Possible Relationship Between COL4A4 Gene Polymorphisms and Risk of Keratoconus. **Cornea**, v. 34, n. 3, p. 318-322, 2015.

SEMINA, E.V.; MINTZ-HITTNER, H.A.; MURRAY, J.C. Isolation and characterization of a novel human paired-like homeodomain-containing transcription factor gene, VSX1, expressed in ocular tissues. **Genomics**, v. 63, p. 289-293, 2000.

SETHI, A.; WORDINGER, R.J.; CLARK, A.F. Focus on molecules: lysyl oxidase. **Exp Eye Res**, v. 104, p. 97-98, 2012.

SHARIF, K.W.; CASEY, T.A.; COLTART, J. Prevalence of mitral valve prolapse in keratoconus patients. **J. R. Soc. Med.**v. 85, p. 446–8, 1992.

SHERWIN, T.; BROOKES, N. H. Morphological changes in keratoconus: pathology or pathogenesis. **Clin Experiment Ophthalmol.**, v. 32, n. 2, p. 211-217, 2004.

SHETTY, R.; NUIJTS, R.M.M.A.; NANAI AH, S.G. et al. Two novel missense substitutions in the VSX1 gene: clinical and genetic analysis of families with keratoconus from India. **BMC Medical Genetics**, v. 16, n. 33, 2015.

SIDEROUDI, H.; LABIRIS, G.; GEORGATZOGLU, K. et al. Fourier analysis of videokeratography data: Clinical usefulness in grade I and subclinical keratoconus. **J Cataract Refract Surg**, v.42, p.731-737, 2016.

SNELL, R. S.; LEMP, M. A. The eyeball. In: **Clinical Anatomy of the Eye**: 2. ed. Malden: Blackwell Science, 1998. p.133-207

SPOERL, E.; RAISKUP-WOLF, F.; KUHLISCH, E. et al. Cigarette smoking is negatively associated with keratoconus. **J Refract Surg**, v. 24, p. 737–S740, 2008.

STABUC-SILIH, M.; STRAZISAR, M.; HAWLINA, M.; GLAVAC, D. Absence of pathogenic mutations in *VSX1* and *SOD1* genes in patients with keratoconus. **Cornea**, v. 29, p.172-176, 2010.

SUGAR, J.; MACSAI, M. S. What causes Keratoconus? **Cornea**, v. 31, n. 6, 2012.

TAI, L. Y.; KHAW, K. W.; NG, C. M.; SUBRAYAN, V. Central corneal thickness measurements with different imaging devices and ultrasound pachymetry. **Cornea**, v. 32. n. 6, p. 766-771, 2013.

TUFT, S. J.; HASSAN, H.; GEORGE, S.; FRAZER, D. G.; WILLOUGHBY, C. E.; LISKOVA, P. Keratoconus in 18 pairs of twins. **Acta Ophthalmol.**, v. **90**, p. 482-486, 2012.

UÇAKHAN, Ö.; CETINKOR, V.; ÖZKAN, M.; KANPOLAT, A. Evaluation of Scheimpflug imaging parameters in subclinical keratoconus, keratoconus, and normal eyes. **J Cataract Refract Surg.**, v. 37, n. 6, p. 1116-1124, 2011.

UDAR, N.; ATILANO, S.R.; BROWN, D.J.; HOLGUIN, B.; SMALL, K.; NESBURN, A.B.; KENNEY, M.C. *SOD1*: a candidate gene for keratoconus. **Invest Ophthalmol Vis Sci**, v. 47, p. 3345-51, 2006.

VAZIRANI, J.; BASU, S. Keratoconus: current perspectives. **Clin Ophthalmol.**, v. 7, p.2019-30, 2013.

VINCENT, A.L.; JORDAN, C.A.; CADZOW, M.J. et al. Mutations in the Zinc Finger protein gene, *ZNF469*, contribute to the pathogenesis of Keratoconus. **IOVS**, v. 55, p. 5629-5635, 2014.

WAGNER, H.; BARR, J. T.; ZADNIK, K. Collaborative Longitudinal Evaluation of Keratoconus (CLEK) Study: methods and findings to date. **Cont Lens Anterior Eye.**, v. 30, n. 4, p. 223-232, 2007.

WANG, Y.; WEI, W.; ZHANG, C. et al. Association of Interleukin-1 Gene Single Nucleotide Polymorphisms with Keratoconus in Chinese Han Population. **Current Eye Research**, v. 41(5), p. 630-635, 2016.

WASILEWSKI, D. Sensibilidade da córnea após *crosslinking* do colágeno em portadores de ceratocone. Tese de Doutorado. Faculdade Evangélica do Paraná, 2010.

WATSON, T.; CHOW, R. L. Absence of *VSX1* expression in the normal and demaged mouse córnea. **Mol Vis**, v. 17, p. 737-744, 2011.

WEGENER, A.; LASER-JUNGA, H. Photography of the anterior eye segment according to Scheimpflug's principle: options and limitations - a review. **Clin Experiment Ophthalmol.**, v. 37, n. 1, p. 144-154, 2009.

WEISSMAN, B.A.; EHRLICH, M.; LEVENSON, J.E.; PETTIT, T.H. Four cases of keratoconus and posterior polymorphous corneal dystrophy. **Optom Vis Sci**, v. 66, p. 243-246, 1989.

WHEELER, J.; HAUSER, M. A.; AFSHARI, N. A. et al. The Genetics of Keratoconus: A Review. **NIH**, june 2013.

WILSON, S.E.; HE, Y.G.; WENG, J.; LI, Q.; MCDOWALL, A.W.; VITAL, M.; CHWANG, E.L. Epithelial injury induces keratocyte apoptosis:Hypothesized role for the interleukin-1 system in the modulation of corneal tissue organization. **Exp Eye Res** v. 62, p. 325-7, 1996.

WISSE, R.P.L.; KUIPER, J.J.W.; GANS, R. et al. Cytokine expression in Keratoconus and its corneal microenvironment: a systematic review. **The Ocular Surface**, v. 13, n. 4, 272-283, 2015.

WOJCIK, K. A.; BLASIAK, J.; SZAFLIK, J.; SZAFLIK, J. P. Role of biochemical factors in the pathogenesis of keratoconus. **Acta Biochim Pol.**, v. 61(1), p. 55-62, 2014.

ZADNIK, K.; BARR, J.T.; EDRINGTON, T.B. et al. Baseline findings in the Collaborative Longitudinal Evaluation of Keratoconus (CLEK) Study. **Invest Ophthalmol Vis Sci.**, v. 39(13), p. 2537-2546, 1998.

ZELKO, I.N.; MARIANI, T.J.; FOLZ, R.J. Superoxide dismutase multigene family: a comparison of the CuZn-SOD (SOD1), Mn-SOD (SOD2), and EC-SOD (SOD3) gene structures, evolution, and expression. **Free Radic Biol Med**, v. 33, p. 337-49, 2002.

ZITKA, O.; KUKACKA, J.; KRIZKOVA. S. et al. Matrix metalloproteinases. **Curr Med Chem.**, v. 17, p. 3751–3768, 2010.