



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: Lisi 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).

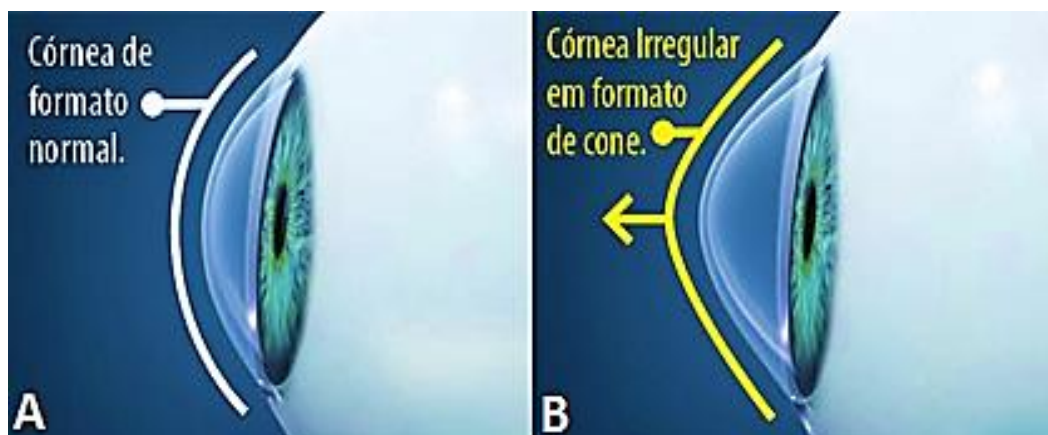


Figura 1A-B: Esquemas da estrutura da córnea normal e ceratoconizada. (A) córnea normal em formato esférico ao longo de sua curvatura, da base ao ápice. (B) formato da córnea ceratoconizada, onde pode-se observar o típico formato de cone formado pelo afinamento da córnea e posterior processo de protrusão 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.

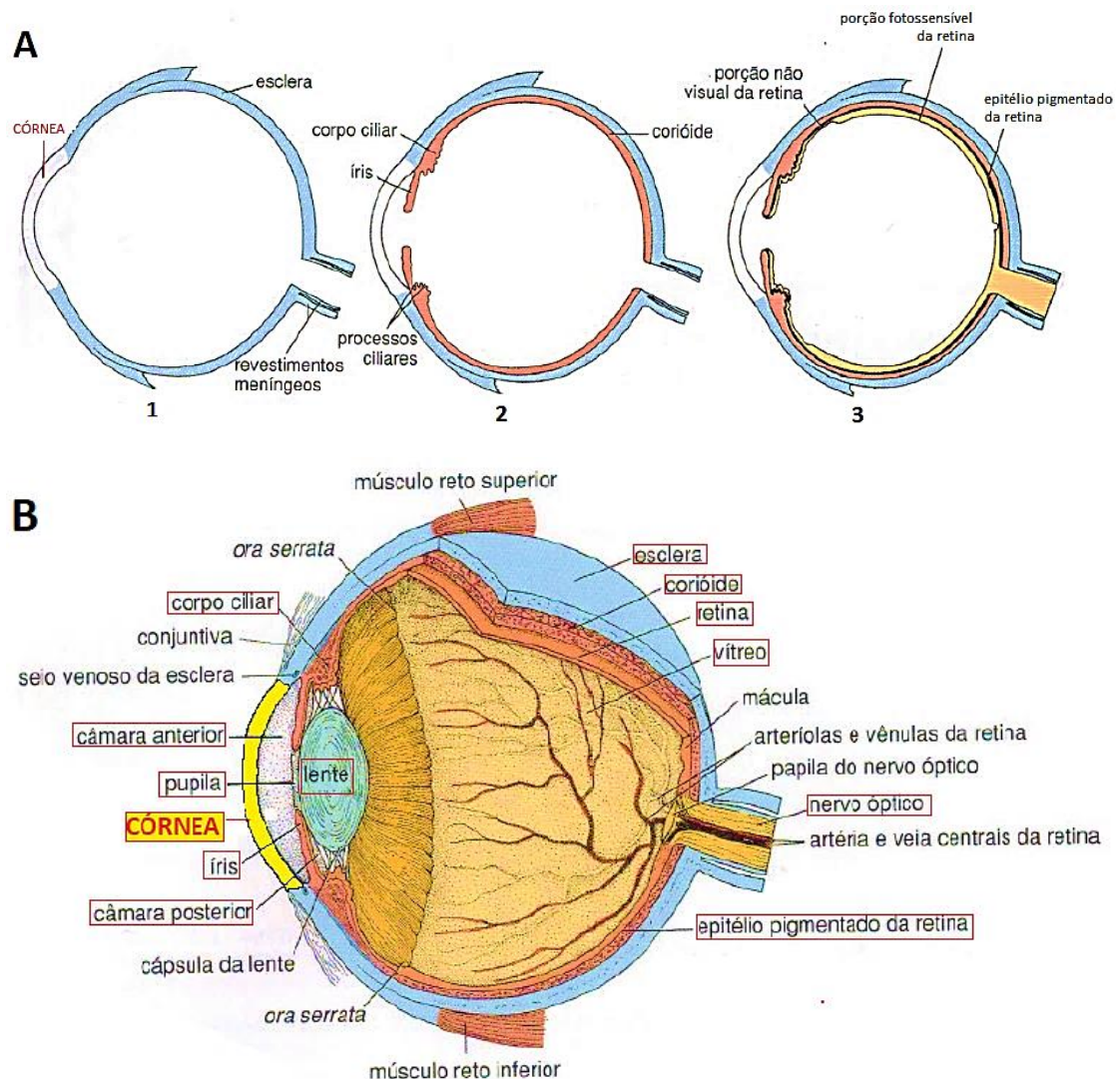


Figura 2A-B: Diagramas esquemáticos das camadas e estruturas constituintes do olho. **(A)** A parede do olho é composta por três túnica concêntricas. (1) uma túnica de sustentação, a corneoescleral (branco e azul); (2) túnica vascular ou úvea (rosa); (3) túnica fotossensível, a retina (amarelo). **(B)** 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 ovóides 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.

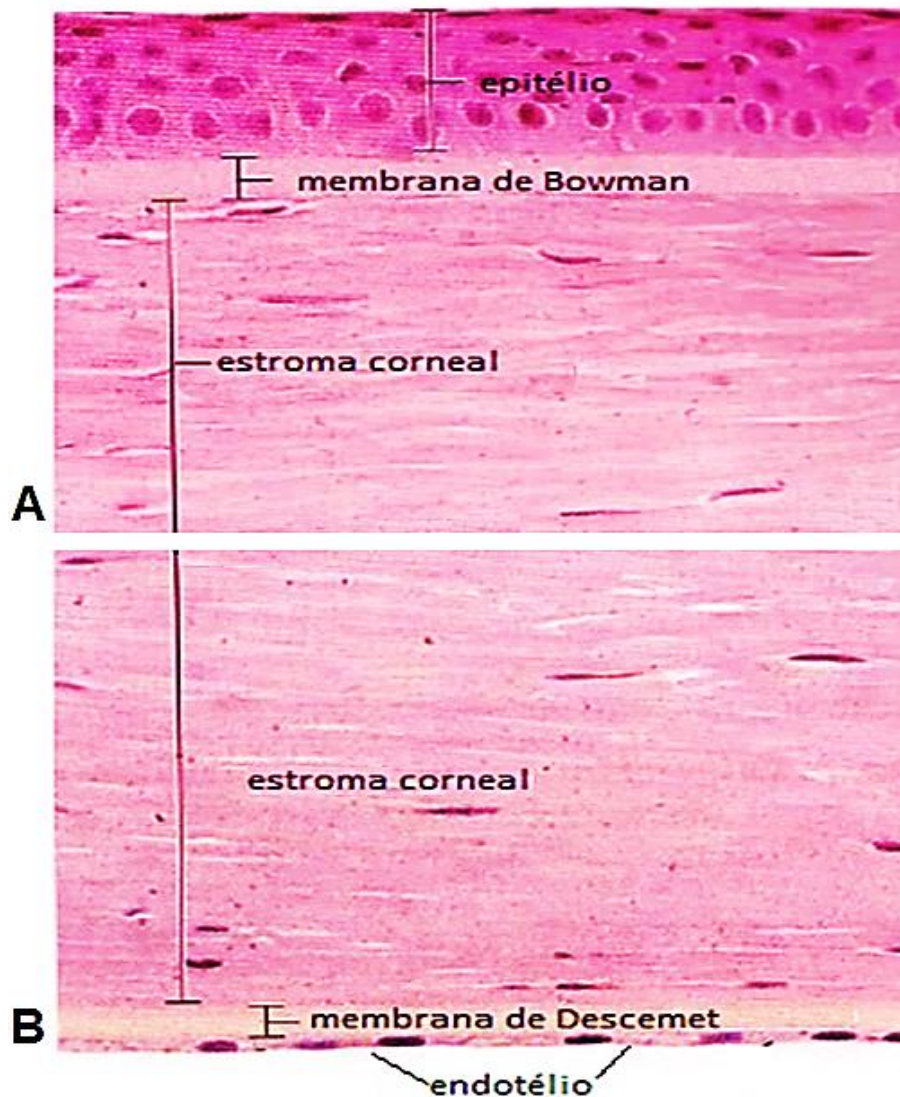


Figura 3 A-B: Fotomicrografias de um corte por toda a espessura da córnea, mostrando suas camadas constituintes. Note o estroma e as superfícies corneais revestidas por dois tipos de epitélios. O estroma corneal não contém vasos sanguíneos nem linfáticos. **A:** Fotomicrografia mostrando a superfície 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

proteínase 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 300μ a 400μ

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

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, hipermobilidade 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; SAEED-RAD 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.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

O presente estudo objetivou avaliar a ocorrência de polimorfismos e/ou mutações nos genes *VSX1*, *SOD1*, *TIMP3* e *LOX*, os quais possam estar relacionados à etiologia do ceratocone, a partir da análise pareada de sangue periférico e fragmentos de córnea, em pacientes da população de São José de Rio Preto e região do Estado de São Paulo.

2.2 Objetivos específicos

-Identificar a presença de polimorfismos e/ou mutações nos genes *VSX1*, *SOD1*, *TIMP3* e *LOX*, a partir da análise do padrão de bandamento obtido por SSCP seguido de sequenciamento dos fragmentos codificantes desses genes em tecidos da córnea e sangue periférico dos pacientes portadores de ceratocone e de indivíduos do grupo controle;

-Comparar as alterações nucleotídicas nos genes *VSX1*, *SOD1*, *TIMP3* e *LOX* dos pacientes ceratoconizados e do grupo controle, constituído de pacientes sem ceratocone;

-Estabelecer se as alterações genéticas encontradas são constitutivas e/ou somáticas, a partir da análise pareada das sequências nucleotídicas de ambos os tecidos, sangue periférico e córnea, dos indivíduos afetados.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Obtenção e descrição das amostras, critérios de inclusão e exclusão dos pacientes e procedimentos clínicos

A casuística deste estudo foi composta de dois grupos: o grupo ceratoconizado e o grupo controle, dos quais, foram analisados dois tecidos, córnea e sangue.

O grupo ceratoconizado foi composto por 35 pacientes que apresentaram quadro clínico de ceratocone, dos quais foram obtidos 35 amostras de sangue e 58 amostras de córnea. O grupo controle foi formado por 89 indivíduos saudáveis quanto ao ceratocone, dos quais foram obtidos 41 amostras de sangue e 149 amostras de córnea.

O número de amostras de sangue do grupo controle é menor do que o número de amostras de córnea, e justifica-se pelo fato de que nem todos os indivíduos concordaram em doar sangue para o estudo.

As amostras foram provenientes de pacientes do D'Olhos Hospital – Unidade 2 em São José do Rio Preto/SP e foram obtidas sob a responsabilidade do médico oftalmologista Prof. Dr. Gildásio Castello de Almeida Júnior, através de procedimentos ceratorefrativos (LASIK ou PRK) e Crosslinking corneano.

O diagnóstico do ceratocone foi realizado baseado na topografia axial com disco de plácido e com elevação derivada do mapa de curvatura anterior da córnea, juntamente com o exame topográfico/tomográfico do Pentacam, baseado nos critérios utilizados do “Collaborative Longitudinal Evaluation of Keratoconus – CLEK” (ZADNIK et al., 1998). Os pacientes do grupo controle apresentaram córneas sadias clinicamente, e valores topográficos/tomográficos do Pentacam dentro da normalidade.

Como critérios de inclusão dos pacientes, foram considerados os seguintes fatores:

- Ausência de cirurgia ocular prévia;
- Parar o uso de lente contato (LC) rígida por 04 semanas;
- Parar o uso de lente contato (LC) gelatinosa ou gelatinosa tórica por 02 semanas;

- Ausência de trauma ocular prévio;
- Ausência de pterígio nasal primário com invasão maior que 3 mm a partir do limbo anatômico.

Como critérios de exclusão dos pacientes, foram considerados os seguintes fatores:

- Pacientes com ceratoconjuntivitis sicca, acne rosácea e disfunção severa das glândulas de meibomius;

- Pacientes usando drogas imunossupressoras pela via sistêmica ou tópica ou doença autoimune de base relatada pelo paciente;

- Uso crônico de medicação ocular, principalmente paciente glaucomatosos;

- População vulnerável devido à enfermidade física ou mental, dificuldade de linguagem;

- Cicatriz corneana devido ao ceratocone;

- Hidrópsia corneana;

- Ceratite Infecciosa;

- Gravidez;

- Aleitamento.

Todos os pacientes foram submetidos a exame clínico, avaliação topográfica e tomográfica. O exame clínico consiste de biomicroscopia com lâmpada de fenda, retinoscopia e exame de fundo de olho. A topografia foi realizada com o topógrafo Easygraph da Oculus (Oculus, Wetzlar, Alemanha) e também com a topografia/tomografia do Pentacam (Oculus, Wetzlar, Alemanha). No Pentacam foram realizados 03 exames com ótima fixação e qualidade e foi feita uma média. No Pentacam foram avaliados os seguintes parâmetros: curvatura axial,

elevação anterior, elevação posterior, espessura da córnea e o BAD III. Os dados da elevação foram retirados de uma zona fixada em 8 mm com referência o BFS (Best Fit Sphere - ajustado manual, “float”, esfera, diâmetro 8,0 mm) centrado no ápice da córnea. Os dados do Pentacam que foram analisados seguem abaixo:

Ceratometria mais plana (K1), ceratometria mais curva (K2) e a ceratometria média (KM) nos 3 mm centrais da córnea;

Assimetria de ceratometria ínfero-superior nos anéis de 4 mm e 6 mm (4 mm I-S e 6 mm I-S);

Assimetria de ceratometria superotemporal-inferonasal nos anéis de 4 mm e 6 mm (4 mm ST-IN e 6 mm ST-IN);

Índices topométricos na zona de 8 mm – avaliando Índice de Variação de Superfície (ISV), Índice de Assimetria Vertical (IVA), Índice de Ceratocone (KI), Índice de Descentração da Altura, KI central, Índice de Assimetria de Elevação (IHA), Raio Mínimo (Rmin), Índice Descentração de Elevação (IHD), asfericidade da superfície posterior e anterior;

Valores de elevação: BAD III com os valores de D, superfície anterior (Df), superfície posterior (Db), progressão paquimétrica (Dp), ponto mais fino (Dt), deslocamento do ponto mais fino (Dy) e o D final (D);

O ART (“Ambrosio’s Relative Thickness”) tanto ART máximo quanto o ART mínimo;

Densitometria da córnea;

KMI (“Keratoconus Match Index”) e o KMP (“Keratoconus Match Probability”);

“Holladay Report”;

Aberrometria da cornea.

Para a realização das cirurgias de correção de epitélio ceratoconizado é necessária remoção de tecido epitelial (deseptelização), não sendo uma necessidade especial do estudo.

O estudo segue a declaração de Helsinki e foi iniciado somente após a aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa da FAMERP em dezembro de 2014 (Anexo 1) com o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) assinado pelos pacientes juntamente com o preenchimento da Ficha Epidemiológica (Anexos 2 e 3 respectivamente).

3.2 Procedimento das coletas

O volume das amostras de sangue periférico colhido de cada paciente foi de 5 ml. Essas amostras foram acondicionadas em tubos específicos contendo 10 mM EDTA e durante o transporte até o laboratório, foram devidamente armazenadas em caixa de isopor e gelo. As amostras de epitélio de córnea foram acondicionadas em microtubos de 2 ml, contendo 1,5 ml de água ultrapura (MilliQ®) e acondicionadas em caixas de isopor com gelo até a chegada no laboratório. As extrações de DNA das amostras, tanto de sangue como de epitélio, ocorreram imediatamente após a coleta ou no máximo 12 horas após esta, sendo que neste último caso, as amostras foram mantidas na geladeira a 4°C durante esse período.

3.3 Extração de DNA

O DNA genômico do sangue periférico foi extraído utilizando-se o kit QIAamp® DNA Blood QIAGEN (Hilden, Alemanha), de acordo com as instruções do fabricante. Já o DNA genômico das amostras de epitélio de córnea foram extraídos com o protocolo de extração por fenol-clorofórmio, adaptado no laboratório para esse tipo de tecido (Anexo 4).

O protocolo com fenol-clorofórmio foi realizado com o intuito de aumentar a concentração de DNA após a extração, e justifica-se devido à baixa concentração de DNA obtida com kits comerciais de extração; pois a amostra de epitélio é muito pequena (aproximadamente 2 mm) e de natureza histológica de baixa concentração celular e rica em matriz extracelular. Assim, após a extração, o DNA genômico das amostras de córnea foi amplificado com o kit REPLI-g® Mini Kit QIAGEN (Hilden, Alemanha) para o aumento da concentração.

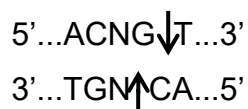
Imediatamente após a extração, o DNA genômico de todas as amostras (sangue e epitélio) foram quantificados em espectrofotômetro. Em seguida, 2 µl de cada amostra de DNA genômico foram aplicados em gel de agarose a 2% para a verificação da integridade desse material.

3.4 Oligonucleotídeos iniciadores, condições para a amplificação e padronização da PCR e análise por RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*)

Os oligonucleotídeos iniciadores, os quais foram utilizados para a amplificação por PCR dos éxons dos genes *VSX1*, *SOD1*, *TIMP3* e *LOX* encontram-se listados na Tabela 1 e foram descritos por Bisceglia et al. (2005), Udar et al. (2006) e De Bonis et al. (2011) respectivamente.

As reações de PCR foram de 25 µl contendo 100 ng de DNA genômico, 12,5 µl de GoTaq® Green Master Mix Promega (WI, USA), 7,5 µl de *nuclease free water* Promega (WI, EUA) e 0,2 pM de cada primer (*forward and reverse*). As ciclagens consistiram de uma desnaturação inicial de 95°C por 3 minutos seguidos por 35 ciclos de 95°C por 30 segundos, temperatura de anelamento (Tabela 1) por 30 segundos, 72°C por 30 segundos e extensão final a 72°C por 10 minutos. Em seguida, os produtos de PCR foram checados em gel de agarose a 2%.

A técnica de RFLP foi realizada para o fragmento que compreende o éxon 2 e parte de sua região intrônica do gene *SOD1*, com a enzima de restrição HpyCH₄ III, capaz de clivar o seguinte sítio de restrição:



Essa análise foi realizada na tentativa de checar a presença da deleção de 7 pares de base (c.169+50delTAAACAG) que tem ocorrido nesta região, causando alterações de *splicing*, as quais promovem a perda do éxon 2 e/ou éxons 2 e 3 durante a maturação do mRNA. Quando há a presença desta deleção na região de *splicing* (íntron 2), é gerado o sítio de restrição para a enzima HpyCH₄ III, a qual cliva o fragmento formando duas bandas no gel.

O protocolo para a digestão utilizado foi o recomendado pelo fabricante da enzima, sendo:

-10 µl do DNA amplificado

-18 µl de H₂O MilliQ®

-2 µl de tampão Tango™ (33 mM de Tris-acetato pH 7,9, 10 mM de acetato de magnésio, 66 mM de acetato de potássio e 0,1 mg/ml de BSA (Thermo Scientific))

-2 µl de Taal (HpyCH₄ III) 10 U/µl (Thermo Scientific)

-incubação: 65°C por 12 horas

Após a digestão, os fragmentos foram aplicados em gel de agarose a 2,5% e corados com 8 µl de Sybr® Safe gel stain (INVITROGEN-THERMO SCIENTIFIC). A eletroforese teve duração de 60 minutos a 100 V em tampão TBE 1x (tris-borato-EDTA) e em seguida os géis foram fotodocumentados.

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

Genes	Primers (5' – 3')	TM (°C)	Tamanho em pb
<i>VSX1</i>*	éxon 1 F-CAGCTGATTGGAGCCCTTC R-CTCAGAGCCTAGGGGACAGG	58	599
	éxon 2 F-GCACTAAAAATGCTGGCTCA R-GCCTCCTAGGAAGTGCAGAA	59	393
	éxon 3 F-CATTCAGAGGTGGGGTGTT R-TCTTGTGGTGCCTTCAGCTA	62	419
	éxon 4 F-GATCATGCTCGGGAGAGAAG R-CGTTGCTTTGCTTTGGAAAT	59	394
	éxon 5 F-CCCCAGAGATAGGCACTGAC R-TGGACAATTTTTGTCTTTTGG	59	495
<i>SOD1</i>**	éxon 1 F-GATTGGTTTGGGGCCAGAGTG R-GACCCGCTCCTAGCAAAGGTG	62	305
	éxon 2 F-ACTCCCAAGTCTGGCTGCTTTTT R-GGGGTTTTAACGTTTAGGGGCTA	62	283
	éxon 3 F-ATGCAGGTCAGCACTTTCTCCAT R-GAACTCCAGAAAGCTATCGCCATT	62	229
	éxon 4 F-CCTTGATGTTTAGTGGCATCAGC R-TCTGGATCTTTAGAAACCGCGACT	63	244
	éxon 5 F-TTGGGTATTGTTGGGAGGAGGT R-AAATCTGTTCCACTGAAGCTGTT	62	577
<i>TIMP3</i>***	éxon 1 F-ACGGCAACTTTGGAGAGG R-GGGGCAGAGGAAAGGAGT	60	273
	éxon 2 F-CAATCCAGGCTCCACAGAG R-CTGGCTGGTGCTTAGACACA	60	300
	éxon 3 F-ACATACCCAGCAGTGGGATT R-ACTGGACATTTGGTGAGTCAA	60	296
	éxon 4 F-GGCTAGGCTCTGGACAAAAC R-GCATTGGGAGCTGATGTTTC	56	248
	éxon 5 F-GTCTGAATCCAGGCTCGGTA R-TTTGCAAGAAAACAGGCACT	56	387
<i>LOX</i>***	éxon 1A F-TGTTGCCCCAGATTAAGCC R-CGCATCACTCCTTTTGCCAG	59	541
	éxon 1B F-CCAGCAGATCCAATGGGAGA R-CAGCGGACTTGGGGTACTTA	59	525
	éxon 2 F-TTTTCACATTGCTTTGCAGT R-GCTCTTGTCCCACTTCCTAA	56	398
	éxon 3 F-TAGTTGGGAAAGGAGGATTG R-GCAATTTTCTCCCTTCAGGT	58	355
	éxon 4 F-GACTTATGTCCTGGGGAAAA R-GATAAAAATGTGTGTGCTCTTCA	56	441
	éxon 5 F-GGAGGTGCTATAAGGCTGAG R-TTGCTTCCAATACCATGATT	58	370
	éxon 6 F-TTCAGGGGAAAAATATGCAGT R-TGCTTACAAGAAAGCTGCTG	56	394
	éxon 7A F-CTTAGGTGGAGGGAAACTGT R-AAGTCATTTTGGCTCATTCA	58	485
	éxon 7B F-GCACATAACTGGATTTTGAACG R-TCAGCACCAGATGTGTCCAT	56	343
<i>SOD1</i>***	éxon 2 F-CAGAAACTCTCTCCAATTGC R-GAGGGGTTTACTGTTTAGGG	59	218

* BISCEGLIA et al. (2005)

** UDAR et al. (2006)

*** DE BONIS et al. (2011)

3.5 Condições da análise por SSCP (*Single-Strand Conformation Polymorphism*)

O rastreamento de mutações de nucleotídeo único (SNPs) foi realizado através da técnica de Polimorfismo Conformacional de Cadeia Simples (SSCP), segundo Orita et al. (1989 a,b).

Os produtos de PCR correspondentes aos 24 fragmentos de DNA (correspondendo aos éxons dos genes, *VSX1*, *SOD1*, *TIMP3* e *LOX*) foram desnaturados em solução desnaturante na proporção de 1:1, ou seja, 4 µl de produto de PCR em 4 µl de solução desnaturante. A solução desnaturante foi composta de formamida a 98%, azul de bromofenol (0,025%) e xilenocianol (0,025%). A seguir, os produtos de PCR foram desnaturados em termociclador por 10 minutos a 94°C. Após a desnaturação, as amostras foram acondicionadas em gelo e aplicadas em géis de poliacrilamida a 7,5%. A eletroforese teve duração de 60 minutos a 150 V em tampão TBE 0,5x (tris-borato-EDTA). Após a corrida, os géis foram corados em 80 ml de tampão TBE 0,5x contendo 8 µl de Sybr® Safe gel stain (INVITROGEN - THERMO SCIENTIFIC) e fotodocumentados para a análise de padrões de bandamento.

3.6 Sequenciamento de DNA

Após as reações de amplificação por PCR, o DNA foi purificado com o kit comercial GenElute™ PCR CleanUp (SIGMA ALDRICH), de acordo com o protocolo do fabricante e encaminhadas para sequenciamento direto (método de Sanger) ao IBTEC (Instituto de Biotecnologia), UNESP-Botucatu.

Após o sequenciamento, as sequências nucleotídicas foram inicialmente analisadas com o software Sequence Scanner 2 (Applied Biosystems) e alinhadas e editadas com o software BioEdit 7.0.5 (Tom Hall, Ibis Therapeutics, Carlsbad, CA).

Para análises de referência, as sequências foram blastadas no banco de dados GenBank NCBI (*National Center for Biotechnology Information*). As sequências referência utilizadas estão sob o número de acesso NG_008689.1 (*SOD1*), NG_008101.2 (*VSX1*), NG_009117.1 (*TIMP3*) e NG_008722.1 (*LOX*)

4 RESULTADOS

Para todas as amostras de sangue e córnea as quais compuseram a casuística desse estudo foram realizadas análises de rastreamento mutacional por PCR-SSCP e posterior sequenciamento de DNA.

Os padrões de bandamento para as regiões codificantes dos genes *SOD1*, *VSX1*, *TIMP3* e *LOX* encontram-se na Tabela 2. As amostras do grupo ceratoconizado que apresentaram um padrão de banda diferente do padrão o qual fora obtido através das análises de amostras de indivíduos sadios, foram sequenciadas diretamente (e também do grupo controle quando alguma amostra também apresentava alteração no padrão de bandamento).

Amostras aleatórias do grupo controle para cada fragmento também foram sequenciadas, cujas sequências nucleotídicas foram utilizadas para comparação e alinhamento com as sequências de amostras ceratoconizadas e posterior análise com as sequências referências de cada gene no GenBank NCBI.

A média de idade dos pacientes com ceratocone foi de 21.6 ± 7.8 anos e, desses pacientes, 49% faziam uso de lentes de contato e 84% possuíam o hábito de coçar os olhos, fatores estes preditivos para o desenvolvimento da doença.

Em relação ao rastreamento mutacional das regiões codificantes dos genes *SOD1*, *VSX1* e *TIMP3*, foram encontrados alguns polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs) nesses genes, os quais já se encontravam descritos no GenBank NCBI.

Os éxons 2,3,4 e 5 do gene *SOD1*, os éxons 1,2,4 e 5 do gene *VSX1*, os éxons 2 e 4 do gene *TIMP3* e todos os éxons do gene *LOX* não apresentaram quaisquer mutações e/ou polimorfismos, e as sequências nucleotídicas dos haplótipos apresentaram 100% de

identidade com as sequências referências depositadas no GenBank NCBI.

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.

GENES		AMOSTRAS	
		Sangue	Córnea
		n° de bandas obtidas	
<i>VSX1</i>	Éxon 1	3	3
	Éxon 2	3	3
	Éxon 3	3	3
	Éxon 4	3	3
	Éxon 5	3	3
<i>SOD1</i>	Éxon 1	3	3
	Éxon 2	3	3
	Éxon 3	3	3
	Éxon 4	3	3
	Éxon 5	2	2
<i>TIMP3</i>	Éxon 1	2	2
	Éxon 2	2	2
	Éxon 3	3	3
	Éxon 4	3	3
	Éxon 5	2	2
<i>LOX</i>	Éxon 1A	2	2
	Éxon 1B	2	2
	Éxon 2	2	2
	Éxon 3	3	3
	Éxon 4	2	2
	Éxon 5	4	4
	Éxon 6	3	3
	Éxon 7A	3	3
	Éxon 7B	3	3

No éxon 1 do gene *SOD1* foram encontrados os seguintes SNPs: rs7277748 e rs142752986 (Anexo 5A-B). Ambos SNPs situados na região 5'UTR (*Untranslated Region*), não promovendo alteração de aminoácido na proteína *SOD1*.

Apenas o éxon 3 do gene *VSX1* apresentou o SNP rs12480307 correspondendo a troca sinônima de aminoácido p.Ala182Ala (Anexo 5C). Outros dois SNPs foram encontrados no íntron 3 do gene *VSX1*: rs6138482 e rs56157240.

Em relação ao gene *TIMP3*, foi encontrado o SNP rs758200076 na região 5'UTR do éxon 1 (Anexo 5D). O éxon 3 desse gene apresentou os seguintes SNPs: rs9862, promovendo a troca

sinônima de aminoácidos p.His83His (Anexo 5E); e o rs11547635, correspondendo a troca sinônima p.Ser87Ser (Anexo 5F).

Como todos os SNPs também foram encontrados em indivíduos do grupo controle, os mesmos podem ser considerados polimorfismos. Ainda, todos os SNPs identificados nos dois grupos foram encontrados nas córneas e sangue dos pacientes, não configurando mutações adquiridas.

Outro dado relevante encontrado neste estudo foi a presença do SNP c.63530 G>A, encontrado no éxon 5 do gene *TIMP3*, o qual ainda não se encontra descrito no NCBI GenBank. Esse polimorfismo foi encontrado em amostras de sangue e córnea de ambos os grupos.

A seguir o detalhamento desses resultados estão apresentados em três capítulos, os quais correspondem respectivamente a três manuscritos a serem publicados.

O primeiro manuscrito (capítulo 1) encontra-se já na versão em inglês e nas normas das revistas pretendidas, devido às submissões que foram realizadas anteriormente. Já os manuscritos 2 e 3 encontram-se na versão em português cujas citações e referências estão de acordo com as normas da ABNT.

4.1 CAPÍTULO 1: MANUSCRITO # 1

Molecular screening of *SOD1* and *VSX1* genes in Brazilian patients with Keratoconus

Alessandro Garcia Lopes, MSc,^{1,2} Gildásio Castello de Almeida Júnior, MD, PhD,³ Marcos Paulo Miola, MSc,² Luiz Carlos de Mattos, PhD,² Cinara de Cássia Brandão de Mattos, PhD² and Lilian Castiglioni, PhD^{1,4}

¹Biology Department, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, IBILCE-UNESP, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Rua Cristóvão Colombo, 2265, 15054-000, São José do Rio Preto, São Paulo, Brazil

²Immunogenetics Laboratory, Molecular Biology Department, Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto (FAMERP), São José do Rio Preto, SP, Brazil.

³Ophthalmology Outpatient Clinic, Hospital de Base de São José do Rio Preto, Fundação Faculdade Regional de Medicina (HB-FUNFARME), São José do Rio Preto, SP, Brazil.

⁴Departamento de Epidemiologia e Saúde Coletiva, Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto (FAMERP), São José do Rio Preto, São Paulo, Brazil

Corresponding author:

Alessandro Garcia Lopes

Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto (FAMERP)

Departamento de Biologia Molecular - Laboratório de Imunogenética

Avenida Brigadeiro Faria Lima, 5416, Vila São Pedro

15090-000 - São José do Rio Preto, SP, Brazil.

Telephone number: +55 17 32015854

E-mail: alegenetica@gmail.com

Running Head: Screening of *VSX1* and *SOD1* in keratoconus

Conflict of Interest Declaration: No conflicting relationship exists for any author

Financial Support: This study was supported by grants from Brazilian Ministry of Education – CAPES PhD Scholarship (Coordination of Improvement of Higher Education Personnel, Brazil); by Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) [grant number: 2015/17226-7]. The opinions, assumptions, and conclusions or recommendations expressed in this material are the responsibility of the authors and do not necessarily reflect the views of FAPESP. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Author contributions: Conceived and designed the experiments: Alessandro G. Lopes, Gildásio C. De Almeida Júnior, Luiz C. De Mattos, Cinara C. Brandão de Mattos, Lilian Castiglioni. Performed the experiments: Alessandro G. Lopes. Performed the inclusion of patients, sample collection, and developed the clinical evaluation and clinical analyses: Gildásio C. De Almeida Júnior. Analysed the data: Alessandro G. Lopes, Marcos P. Miola, Luiz C. De Mattos, Cinara C. Brandão de Mattos, Lilian Castiglioni. Wrote the paper: Alessandro G. Lopes, Gildásio C. De Almeida Júnior, Lilian Castiglioni, Luiz C. De Mattos, Cinara C. Brandão de Mattos. All authors approved the manuscript.

Abstract

Background: To identify inherited or acquired mutations in the *Visual System Homeobox 1 (VSX1)* and *Superoxide Dismutase 1 (SOD1)* genes from the combined analysis of corneal and blood samples from patients with keratoconus.

Methods: 207 eyes (cornea samples) and 76 blood samples from 89 healthy individuals and 35 unrelated patients with keratoconus were evaluated. 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 *VSX1* and *SOD1* genes were amplified by Polymerase Chain Reaction, denatured and subjected to polyacrylamide gel electrophoresis. Mutational screening of the *VSX1* and *SOD1* genes by Single-Strand Conformation Polymorphism and direct DNA sequencing.

Results: The following polymorphisms were found in 5'UTR of the *SOD1* gene: c.5040 A>G and c.5101 T>A in patients with keratoconus and also in control subjects. Only exon 3 of the *VSX1* gene presented the nucleotide change c.8222 A>G, corresponding to the synonymous exchange of amino acids p. Ala182Ala, in patients with keratoconus and in control individuals. As the polymorphisms were found in samples of cornea and corresponding blood, they do not conform to acquired changes.

Conclusion: The absence of pathogenic mutations in the *VSX1* and *SOD1* genes obtained by this study of a Brazilian cohort, combined with data from other studies involving different cohorts that did not identify mutations in these genes, suggest that other genetic factors may be implicated in the onset of keratoconus.

Key Words: cornea, keratoconus, *SOD1*, *VSX1*, ectasia, genetic polymorphisms

INTRODUCTION

Keratoconus (KC - OMIM 148300) is a progressive, non-inflammatory, asymmetrically bilateral ocular anomaly that involves the cornea and affects one in every 2000 people. It is characterized by thinning of the central stroma resulting in ectasia.^{1,2} The symptoms of this disease are very varied and depend on the stage of progression. At first, there may be no symptoms, but as the disease evolves, distortions to vision begin to appear, such as myopia and irregular astigmatism, which arise in adolescence and progress into the third or fourth decade of life.³⁻⁶ KC is a multifactorial disease with a unknown etiology^{5,7}; research developed using the Genome-Wide Association Study (GWAS) has identified many KC-related loci.^{8,9}

Visual System Homeobox 1 (VSX1) and *Superoxide Dismutase 1 (SOD1)* are two of the main candidate genes currently associated to KC. The *VSX1* gene controls a gene group responsible for the production of green and red visual pigments and regulates the expression of opsins for cones, in addition to being related to ocular and craniofacial growth during embryonic development.^{1,10,11} The *SOD1* gene is involved in the physiology of the cornea and plays an antioxidant role, as superoxide dismutase enzymes, among others, are involved in the process to eliminate free radicals and reactive oxygen species generated by the absorption of ultraviolet light.¹² Studies have shown that mutations in the *SOD1* gene cause a decrease in the activity of the antioxidant enzymes in keratoconic corneal tissue.¹³⁻¹⁵

Thus, this study aimed to identify the presence of inherited or acquired mutations in the *VSX1* and *SOD1* genes, considered important factors related to the etiology of KC, by comparing the nucleotide sequences in peripheral blood and corneas of unrelated patients with KC and healthy subjects.

METHODS

Study Subjects

This study adhered to the tenets of the Declaration of Helsinki and was approved by the Research Ethics Committee of the Medicine School in São José do Rio Preto (FAMERP – # 1.123.652). All patients were informed about the objectives of the study and signed written informed consent forms before being enrolled.

This was a cross-sectional study involving 207 samples of cornea fragment and 76 blood samples from 35 unrelated patients with KC and 89 healthy individuals. The samples were obtained from the D'Olhos Hospital (Unit 2) in São José do Rio Preto, SP and were obtained by means of keratorefractive procedures and corneal crosslinking.

All the patients underwent clinical examinations, and topographic and tomographic evaluations. The clinical examination consisted of dynamic and static refraction, biomicroscopy with a slit lamp, retinoscopy, tonometry, and fundus examination. Diagnosis of KC was based axial topography with placido disc (Oculus Easygraph - Wetzlar, Germany) with the elevation derived from an anterior corneal curvature map together with the tomographic examination (Oculus Pentacam HR - Wetzlar, Germany) based on the criteria used in the Collaborative Longitudinal Evaluation of Keratoconus (CLEK).¹⁶

Three exams with good fixation and quality were performed using the Pentacam to evaluate the following parameters: axial curvature, anterior elevation, posterior elevation, corneal thickness and BAD III. The elevation data were taken from an 8 mm fixed zone with reference to the BFS (Best Fit Sphere – manually adjusted, "float", sphere, diameter 8.0 mm) centered at the apex of the cornea. Patients in the control group had clinically sound corneas with topographic and tomographic values within normal ranges.

The following factors were considered as inclusion criteria: absence of previous ocular surgery; interruption of the use of rigid contact

lenses for four weeks or gelatinous contact lenses for two weeks, absence of previous ocular trauma and absence of primary nasal pterygia. The following factors were considered as exclusion criteria: keratoconjunctivitis sicca, acne rosacea and severe dysfunction of the meibomian glands, use of systemic or topical immunosuppressive drugs, autoimmune disease, chronic use of ocular medications, physical or mental illness, corneal scar due to KC; corneal hydrops, infectious keratitis, pregnancy and lactation.

Molecular analysis

From each participant, a volume of 5 mL of peripheral blood was collected in a tube containing 10 mM ethylenediamine tetraacetic acid (EDTA) and cornea fragments were collected during keratorefractive procedures and corneal crosslinking. The genomic DNA from the blood samples was extracted using commercial kit (QIAamp® DNA Blood QIAGEN, Hilden, Germany) according to the manufacturer's instructions. Genomic DNA was extracted from cornea samples using the standard phenol-chloroform technique. After extraction, the genomic DNA from the corneal samples was amplified using commercial kit (REPLI-g® Mini Kit QIAGEN, Hilden, Germany) due to the low concentration of DNA obtained after extraction.

The primers used for polymerase chain reaction (PCR) amplification of the five exons and exon-intron boundaries of the *VSX1* and *SOD1* genes were described by Bisceglia et al¹⁷ and Udar et al¹³ (Tab. 1). The PCR reactions used 25 µL containing 100 ng genomic DNA, 12.5 µL of PCR mix (GoTaq Green Master Mix, Promega, WI, USA), 7.5 µL nuclease free water and 0.2 pM each primer (forward and reverse). The cycling consisted of an initial denaturation of 95°C for 3 minutes followed by 35 cycles of 95°C for 30 seconds, annealing temperature (Tab. 1) for 30 seconds, extension temperature of 72°C for 30 seconds and final extension at 72°C for 10 minutes.

Table 1. Primers used for the amplification of the five exons of the *VSX1* and *SOD1* genes

Genes	Primers (5' – 3')	*T _m (°C)	Product size (base pair)
††VSX1	exon 1 F -CAGCTGATTGGAGCCCTTC R –CTCAGAGCCTAGGGGACAGG	58	599
	exon 2 F –GCACTAAAAATGCTGGCTCA R –GCCTCCTAGGAACTGCAGAA	59	393
	exon 3 F –CATTGAGAGGTGGGGTGTT R –TCTTGTTGGTGCCTTCAGCTA	62	419
	exon 4 F-GATCATGCTCGGGAGAGAAG R-CGTTGCTTTGCTTTGGAAAT	59	394
	exon 5 F –CCCCAGAGATAGGCACTGAC R –TGGACAATTTTGTCTTTTGG	59	495
†SOD1	exon 1 F- GATTGGTTTGGGGCCAGAGTG R- GACCCGCTCCTAGCAAAGGTG	62	305
	exon 2 F- ACTCCCAAGTCTGGCTGCTTTTT R- GGGGTTTTAACGTTTAGGGGCTA	62	283
	exon 3 F- ATGCAGGTCAGCACTTTCTCCAT R- GAACTCCAGAAAGCTATCGCCATT	62	229
	exon 4 F- CCTTGATGTTTAGTGGCATCAGC R- TCTGGATCTTTAGAAACCGCGACT	63	244
	exon 5 F- TTTGGGTATTGTTGGGAGGAGGT R- AAATCTGTTCCACTGAAGCTGTT	62	577

††VSX1: Visual System Homeobox 1

†SOD1: Superoxide Dismutase 1

*T_m: Melting Temperature

Screening for mutations of all coding regions of the *VSX1* and *SOD1* genes was performed using the Single-Strand Conformation Polymorphism (SSCP) technique according to Orita et al.^{19,20} The PCR products were denatured in a solution composed of 98% formamide, 0.025% bromophenol blue, 0.025% xylene cyanol and 0.5 M EDTA. Subsequently, the PCR products were incubated for 10 minutes at 94°C. After denaturation, the samples were chilled on ice and subjected to 7.5% polyacrylamide gel electrophoresis. After the run, the gels were stained with 10 µL of fluorescent dye (Sybr® Safe DNA Gel Stain, Waltham, Massachusetts, USA) and photo-documented to analyze the banding patterns.

Sequencing reactions of the forward and reverse strands were prepared with a DNA sequencing kit (BigDye® Terminator v.3.1 Cycle Sequencing Kit, Foster City, CA, USA) following the manufacturer's instructions using the ABI 3500 automated sequencer (Applied Biosystems). Nucleotide sequences were first analyzed with Sequence Scanner 2 software (Applied Biosystems) and aligned and edited with BioEdit software v. 7.0.5 (Tom Hall, Ibis Therapeutics, Carlsbad, CA). For reference analyses, the sequences were checked using the National Center for Biotechnology Information (NCBI) GenBank database. The reference sequences used are registered under the accession numbers NG_008689.1 (*SOD1*) and NG_008101.2 (*VSX1*).

RESULTS

Ten DNA fragments corresponding to the coding regions of the *VSX1* and *SOD1* genes were screened in this study.

Two tissues, blood and cornea, were evaluated for each individual in an attempt to identify mutations and characterize them as inherited or acquired. The mean age of patients with KC was 21.6 ± 7.8 years with 49% of these patients using contact lenses and 84% having the habit of scratching their eyes.

Some heterozygous Single-Nucleotide Polymorphisms (SNPs) were found during the screening of the coding regions of the *SOD1* and *VSX1* genes. Exons 2, 3, 4 and 5 of the *SOD1* gene and exons 1, 2, 4 and 5 of the *VSX1* gene did not show any mutations or polymorphisms and the nucleotide sequences of the haplotypes were 100% identical to those deposited in the NCBI GenBank.

The following SNPs were found in exon 1 of the *SOD1* gene: rs7277748 (c.5040 A>G) in two patients with KC and in three subjects of the control group; and rs142752986 (c.5101 T>A) in two patients with KC and in four subjects in the control group. Both located in the 5' untranslated region (5' UTR), these SNPs did not promote any amino acid changes in the *SOD1* protein. Exon 3 of the *VSX1* gene

presented the SNP rs12480307 (c.8222 A>G) corresponding to the synonymous exchange of amino acids p. Ala182Ala in two patients with KC and in four individuals in the control group. Furthermore, two other SNPs were found in intronic regions of the *VSX1* gene: rs6138482 (g.8326 A>G) in one subject of both groups and rs56157240 (g.8387 A>T) in one patient with KC and in three subjects in the control group. The SNPs found are described in Table 2. As all SNPs were found in control subjects, they can be considered polymorphisms.

Table 2. 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

Gene/ fragment	*Ref SNP ID	*Nucleotide change	*Residue change	KC Group frequency (%)	Control Group frequency (%)
[†] <i>SOD1</i> /exon 1	rs7277748	c.5040 A>G	5' UTR	5.7	3.3
<i>SOD1</i> /exon1	rs142752986	c.5101 T>A	5' UTR	5.7	4.4
^{††} <i>VSX1</i> /exon3	rs12480307	c.8222 A>G	Ala182Ala	5.7	4.4
<i>VSX1</i> /intron3	rs6138482	g.8326 A>G	non-coding	2.8	1.1
<i>VSX1</i> /intron3	rs56157240	g.8387 A>T	non-coding	2.8	3.3

*Data obtained from GenBank -National Center for Biotechnology Information (NCBI)

[†]*SOD1*: *Superoxide Dismutase 1*

^{††}*VSX1*: *Visual System Homeobox 1*

Moreover, all SNPs identified in both groups were found in the corneas and the blood of the patients and thus do not constitute acquired mutations.

Regarding exon 2 fragment of the *SOD1* gene, the nucleotide sequence analysis did not reveal any pathogenic mutation in this region, in both cornea and blood samples from patients with KC. The mutational screening of this region was performed in order to detect the *SOD1* intronic 7-base deletion c.169 + 50 delTAAACAG that occurs in the splicing region. Data from the literature confirm the presence of this deletion associated with KC.^{13,18} It has been reported that this deletion has caused splicing changes, which promote the loss of exon 2 or exons 2 and 3 during mRNA maturation.¹³

DISCUSSION

KC was described more than three centuries ago and it is considered a common disease involving the cornea that affects millions of people of both genders and all ethnicities worldwide.² However, the etiology of this corneal dystrophy, despite having been reported in the literature for many years, is still unknown.^{5,7}

Recently, several genetic studies have aimed at identifying mutations in genes that are directly linked to KC, however, these genetic bases are still poorly documented.^{3,11,21}

The cornea has a large amount of antioxidant enzymes, such as superoxide dismutase, catalase, glutathione peroxidase and glutathione reductase, all of which play an important role in the elimination of free radicals and reactive oxygen species generated by the absorption of ultraviolet light.¹² Thus, enzymatic dysregulation represents damage to tissue affected by KC due to the reduced activity of these enzymes, compared to normal corneas.^{22,23} Thus, a number of genetic screening studies involving the genes coding for these enzymes have been carried out in an attempt to detect mutations in different populations and to correlate them to the etiology of KC.^{11,24}

In the present study, the absence of pathogenic mutations for the *SOD1* and *VSX1* genes, both in peripheral blood and corneal samples, may be a characteristic of the analyzed population, since no studies on this issue have been published in Brazil.

Stabuc-Silih et al.²³ on analyzing 113 Slovenian individuals, did not find KC-related mutations in these genes. Al-Muammar et al.²⁴ analyzed the *SOD1* gene in 55 patients from Saudi Arabia searching for the 7-base intronic deletion, which had previously been identified by Udar et al.¹³ They also screened the full coding region of the *SOD1*, but they did not find any pathogenic mutations in this gene. Similar results were obtained by Al-Raddadi et al.²⁵ evaluating 13 patients with KC of five Saudi pedigrees.

Studies involving other world populations have already found interesting polymorphisms for the *SOD1* gene. For example, Udar et al¹³ analyzed 15 patients with KC from unrelated families and detected a 7-base intronic deletion (IVS2+50del7) in the *SOD1* gene in two patients. This deletion can influence splicing variants during mRNA maturation and promote the loss of exon 2 or exons 2 and 3 leading to the formation of a defective enzyme, rendering it incapable of neutralizing the action of free radicals.^{18,26–28}

The *VSX1* gene is part of the family of paired-like homeodomain transcription factors and is related to ocular and craniofacial growth during embryonic development.^{1,10,11} Since 2002, many studies have identified mutations in the *VSX1* gene related to KC as well as to other ocular dystrophies.^{10,17,18,29–31} Currently, the literature is sustained by debates involving the role of this gene in the pathogenesis of KC.

Héon et al¹⁰ were the first to assign molecular data to KC when they found mutations in the *VSX1* gene when they analyzed 63 patients with KC from Toronto and Iowa City (R166W, L159M, D144E and H244R), which could be related to the cause of the disease. The authors stressed that the L159M and R166W mutations involved a region adjacent to the homeodomain and the homeodomain of *VSX1*, respectively, and that, in relation to R166W, the results showed that the substitution of an arginine residue by a tryptophan at position 166 impairs the DNA binding, thereby characterizing this mutation as pathogenic.¹⁰ On the other hand, the D144E and H244R mutations were also found in non-keratoconic individuals, and thus are only considered polymorphisms.

Bisceglia et al¹⁷ analyzed Italian patients and identified another mutation (L17P) in three patients with KC and three relatives suspected of having KC. The authors stated that although this mutation does not appear in the homeodomain or the CVC domain of the *VSX1* gene, the fact that there is a substitution of a proline for leucine represents an alteration of an amino acid that has been well conserved evolutionarily.

The authors conclude that based on the pedigrees analyzed, the disease is transmitted as autosomal dominant, with variable expressivity and incomplete penetrance.

Saeed-Rad et al³⁰ conducted mutational screening of the *VSX1* gene in 26 Iranian families and found the H244R and R166W mutations in affected probands and relatives; according to their analyses, these mutations may be involved in the pathogenesis of KC.

In a genetic analysis of 20 Indian patients, Shetty et al³¹ found two novel missense substitutions, p.Leu268His in five affected individuals from two families and p.Ser251Thr in three affected individuals from a single family. According to the authors, the leucine at position 268 is highly conserved and the p.Leu268His variation in the CVC domain is considered pathogenic, leading to severe modifications in the physicochemical properties, which impair the protein function. On the other hand, the p.Ser251Thr mutation can be considered neutral, since the amino acids, serine and threonine, have similar chemical properties. However, they point out that it is difficult to correlate these mutations to the cause of KC, since previous studies have already argued that missense mutations in *VSX1* may or may not be pathogenic or may just be polymorphisms.

Nevertheless, in the present study it was not possible to identify the presence of pathogenic mutations in the *VSX1* gene by analyzing two tissues from patients with KC. In fact, the role of *VSX1* in KC is controversial, as some studies have not identified pathogenic mutations related to the disease. As an example, Moschos et al²⁸ and Al-Raddadi et al²⁵, who screened 33 Greek and 13 Saudi patients with KC, respectively, did not find mutations in the *VSX1* gene, reinforcing the idea that other genes and environmental factors are implicated in the etiology of KC.

Hence, regarding the genetic factors that cause KC, there are still many issues to be elucidated. Several studies point out that this may be due to the ethnic variations and the multifactorial character of the

pathology. In face of more than two decades of intense research to detect conclusive genetic factors, it is still necessary to continue investigations to improve the composition of molecular databases that can identify genetic factors related to the etiology of this important ocular disease.^{11,21,31,32}

Based on the results of this study, it is important to note that, despite the absence of mutations in *VSX1* and *SOD1* genes associated with Keratoconus pathogenesis, 49% of the patients make use of contact lenses and 84% have the habit of rubbing the eyes, and such conditions, in accordance with the literature, are important risk factors for Keratoconus development.^{33–38} It is important to emphasize that genetic screening studies with corneal fragments are novel and did not find relevant mutations associated with KC, which also reinforces the importance of environmental and ethnic factors in the etiology of this ocular disease.

Another important aspect is the consistency of the results for both analyzed tissues, peripheral blood and corneal epithelium. Although the results for both were negative, in the hypothesis of finding a gene or gene mutation linked to the etiology of KC, the genetic diagnosis may be reached using peripheral blood, as has been done in most studies found in the literature.

The molecular analysis of other candidate genes for KC involving genotyping of other mutations, exome sequencing or gene expression should help elucidate these issues.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors would like to thank all the patients who agreed to participate in this study, the Brazilian organizations CAPES and FAPESP (grant number: 2015/17226-7) for the financial support and also David Hewitt for his help with the English version.

REFERENCES

1. El-Tarras AEA, Thomali T Al, Ghamdi A Al. Molecular genetic analysis of VSX1 Gene Mutations Associated with Keratoconus at Taif governorate, KSA. *Int J Curr Microbiol App*. 2015;4(7):525-531.
2. Ghassemlaglou N, Djalilian AR. Keratoconus; A true corneal disease. *J Ophthalmic Vis Res*. 2016;11(1):1-2. doi:10.4103/2008-322X.180701.
3. Jeoung JW, Kim MK, Park SS, et al. VSX1 gene and keratoconus: genetic analysis in Korean patients. *Cornea*. 2012;31(7):746-750. doi:10.1097/ICO.0b013e3181e16dd0.
4. Lechner J, Porter LF, Rice A, et al. Enrichment of pathogenic alleles in the brittle cornea gene, ZNF469, in keratoconus. *Hum Mol Genet*. 2014;23(20):5527-5535. doi:10.1093/hmg/ddu253.
5. Naderan M, Rajabi MT, Zarrinbakhsh P, et al. Association between Family History and Keratoconus Severity. *Curr Eye Res*. 2016;41(11):1414-1418. doi:10.3109/02713683.2015.1128553.
6. Wheeler J, Hauser MA, Afshari NA, et al. The Genetics of Keratoconus: A Review. *Reprod Syst Sex Disord Curr Res*. 2012;(Suppl 6). doi:10.4172/2161-038X.S6-001.
7. Sugar J, Macsai MS. What Causes Keratoconus? *Cornea*. 2012;31(6):716-719. doi:10.1097/ICO.0b013e31823f8c72.
8. 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 Genet*. 2012;21(2):421-429. doi:10.1093/hmg/ddr460.
9. Lu Y, Vitart V, Burdon KP, et al. Genome-wide association analyses identify multiple loci associated with central corneal thickness and keratoconus. *Nat Genet*. 2013;45(2):155-163. doi:10.1038/ng.2506.
10. Héon E, Greenberg A, Kopp KK, et al. VSX1: a gene for posterior polymorphous dystrophy and keratoconus. *Hum Mol Genet*. 2002;11(9):1029-1036. doi:10.1093/HMG/11.9.1029.

11. Farjadnia M, Naderan M, Mohammadpour M. Gene therapy in keratoconus. *Oman J Ophthalmol*. 2015;8(1):3-8. doi:10.4103/0974-620X.149854.
12. Ortak H, Söğüt E, Taş U, et al. The Relation Between Keratoconus and Plasma Levels of MMP-2, Zinc, and SOD. *Cornea*. 2012;31(9):1048-1051. doi:10.1097/ICO.0b013e318254c028.
13. Udar N, Atilano SR, Brown DJ, et al. SOD1: A candidate gene for keratoconus. *Investig Ophthalmol Vis Sci*. 2006;47(8):3345-3351. doi:10.1167/iovs.05-1500.
14. Arnal E, Peris-Martínez C, Menezo JL, et al. Oxidative stress in keratoconus? *Investig Ophthalmol Vis Sci*. 2011;52(12):8592-8597. doi:10.1167/iovs.11-7732.
15. Saeed-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. 2013;(July 2012):2501-2507.
16. Zadnik K, Barr JT, Edrington TB, et al. Baseline findings in the collaborative longitudinal evaluation of keratoconus (CLEK) study. *Investig Ophthalmol Vis Sci*. 1998;39(13):2537-2546.
17. Bisceglia L, Ciaschetti M, De Bonis P, et al. VSX1 Mutational Analysis in a Series of Italian Patients Affected by Keratoconus: Detection of a Novel Mutation. *Investig Ophthalmology Vis Sci*. 2005;46(1):39-45.
18. De Bonis P, Laborante A, Pizzicoli C, et al. Mutational screening of VSX1, SPARC, SOD1, LOX, and TIMP3 in keratoconus. *Mol Vis*. 2011;17:2482-2494. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21976959>. Accessed February 17, 2017.
19. Orita M, Suzuki Y, Sekiya T, et al. Rapid and sensitive detection of point mutations and DNA polymorphisms using the polymerase chain reaction. *Genomics*. 1989;5:874-879. doi:10.1016/0888-7543(89)90129-8.
20. Orita M, Iwahana H, Kanazawa H, et al. Detection of polymorphisms of human DNA by gel electrophoresis as single-strand

conformation polymorphisms. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1989;86(8):2766-2770.

21. Dehkordi FA, Rashki A, Bagheri N, et al. Study of VSX1 mutations in patients with keratoconus in southwest Iran using PCR-single-strand conformation polymorphism/Heteroduplex analysis and sequencing method. *Acta Cytol*. 2013;57(6):646-651. doi:10.1159/000353297.

22. Behndig A, Karlsson K, Johansson BO, et al. Superoxide dismutase isoenzymes in the normal and diseased human cornea. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2001;42(10):2293. <http://www.iovs.org/cgi/content/abstract/42/10/2293>.

23. Stabuc-Silih M, Strazisar M, Hawlina M, et al. Absence of pathogenic mutations in VSX1 and SOD1 genes in patients with keratoconus. *Cornea*. 2010;29(2):172-176. doi:10.1097/ICO.0b013e3181aebf7a.

24. Al-Muammar AM, Kalantan H, Azad TA, et al. Analysis of the SOD1 Gene in Keratoconus Patients from Saudi Arabia. *Ophthalmic Genet*. 2015;36(4):373-375. doi:10.3109/13816810.2014.889173.

25. Al-Raddadi HS, Al-Barry MA, Al-Harbi E, et al. Sequence analysis of the VSX1 and SOD1 genes in families with Keratoconus and a review of the literature. *J Taibah Univ Med Sci*. 2016;11(2):115-120. doi:10.1016/j.jtumed.2015.08.004.

26. Rosen DR, Siddique T, Patterson D, et al. Mutations in Cu / Zn superoxide dismutase gene are associated. *Nature*. 1993;362(6415):59-62. doi:10.1038/362059a0.

27. Deng HX, Hentati A, Tainer JA, et al. Amyotrophic lateral sclerosis and structural defects in Cu,Zn superoxide dismutase. *Science (80-)*. 1993;261(5124):1047-1051. doi:10.1126/science.8351519.

28. Moschos MM, Kokolakis N, Gazouli M, et al. Polymorphism Analysis of VSX1 and SOD1 Genes in Greek Patients with Keratoconus. *Ophthalmic Genet*. 2015;36(3):213-217. doi:10.3109/13816810.2013.843712.

29. Mok JW, Baek SJ, Joo CK. VSX1 gene variants are associated with keratoconus in unrelated Korean patients. *J Hum Genet.* 2008;53(9):842-849. doi:10.1007/s10038-008-0319-6.
30. Saeed-Rad S, Hashemi H, Miraftab M, et al. Mutation analysis of VSX1 and SOD1 in Iranian patients with keratoconus. *Mol Vis.* 2011;17(November):3128-3136.
31. Shetty R, Nuijts RMM, Nanaiah SG, et al. Two novel missense substitutions in the VSX1 gene: clinical and genetic analysis of families with Keratoconus from India. *BMC Med Genet.* 2015;16(1):33. doi:10.1186/s12881-015-0178-x.
32. Farzadfard A, Nassiri N, Moghadam TN, et al. Screening for MIR184 mutations in Iranian patients with keratoconus. *J Ophthalmic Vis Res.* 2016;11(1):3-7. doi:10.4103/2008-322X.180715.
33. Rabinowitz YS. Keratoconus. *Surv Ophthalmol.* 1998;42(4):297-319. doi:10.1016/S0039-6257(97)00119-7.
34. Lindsay RG, Bruce AS, Gutteridge IF. Keratoconus associated with continual eye rubbing due to punctal agenesis. *Cornea.* 2000;19(4):567-569. doi:10.1097/00003226-200007000-00034.
35. Lucarelli MJ, DeBry P. Corneal ectasia associated with massage of dacryocystoceles. *Cornea.* 2002;21(4):419-420. doi:10.1097/00003226-200205000-00017.
36. Jafri B, Lichter H, Stulting RD. Asymmetric keratoconus attributed to eye rubbing. *Cornea.* 2004;23(6):560-564. doi:10.1097/01.ico.0000121711.58571.8d.
37. Nowak DM, Gajecka M. The genetics of keratoconus. *Middle East Afr J Ophthalmol.* 2011;18(1):2-6. doi:10.4103/0974-9233.75876.
38. Verma A, Das M, Srinivasan M, et al. Investigation of VSX1 sequence variants in South Indian patients with sporadic cases of keratoconus. *BMC Res Notes.* 2013;6(1):103. doi:10.1186/1756-0500-6-103.

4.2 CAPÍTULO 2: MANUSCRITO # 2

Ausência de alterações patogênicas em rastreamento genético envolvendo os genes *TIMP3* e *LOX* em pacientes brasileiros com Ceratocone

Alessandro Garcia Lopes, MSc,^{1,2} Gildásio Castello de Almeida Júnior, MD, PhD,³ Luiz Carlos de Mattos, PhD,² Cinara de Cássia Brandão de Mattos, PhD² e Lilian Castiglioni, PhD^{1,4}

¹Departamento de Biologia, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, IBILCE-UNESP, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Rua Cristóvão Colombo, 2265, 15054-000, São José do Rio Preto, São Paulo, Brazil.

²Laboratório de Imunogenética, Departamento de Biologia Molecular, Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto (FAMERP), Avenida Brigadeiro Faria Lima, 5416, 15090-000, São José do Rio Preto, SP, Brazil.

³Ambulatório de Oftalmologia, Hospital de Base de São José do Rio Preto, Fundação Faculdade Regional de Medicina (HB-FUNFARME), Avenida Brigadeiro Faria, 5544, 15090-000, São José do Rio Preto, SP, Brazil.

⁴Departamento de Epidemiologia e Saúde Coletiva, Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto (FAMERP), Avenida Brigadeiro Faria Lima, 5416, 15090-000, São José do Rio Preto, São Paulo, Brazil.

Autor Correspondente:

Alessandro Garcia Lopes

Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto (FAMERP)

Departamento de Biologia Molecular - Laboratório de Imunogenética

Avenida Brigadeiro Faria Lima, 5416, Vila São Pedro

15090-000 - São José do Rio Preto, SP, Brazil.

Telefone: 55 17 32015854; E-mail: alegenetica@gmail.com

RESUMO

Objetivo: Este estudo teve o objetivo de identificar polimorfismos nos genes *TIMP3* (*Tissue Inhibitor of Metalloproteinase 3*) e *LOX* (*Lysyl Oxidase*) relacionados ao ceratocone em população brasileira, a partir da análise pareada de amostras de sangue e córnea, podendo assim caracterizar se tais polimorfismos são herdados ou adquiridos.

Métodos: A casuística foi composta por 35 amostras de sangue e 58 amostras de córnea provenientes de 35 pacientes ceratoconizados. O grupo controle foi composto por 89 indivíduos dos quais foram obtidas 41 amostras de sangue e 149 amostras de córnea. As avaliações oftalmológicas incluíram exame clínico, topografia e tomografia. As amostras de DNA, extraídas do sangue periférico e de fragmentos de córnea, foram amplificadas por PCR e todos os éxons dos genes *TIMP3* e *LOX* foram desnaturados em solução de formamida e submetidos ao rastreamento mutacional através da técnica de SSCP (*Single-Strand Conformation Polymorphism*) e, em seguida, foram sequenciados.

Resultados: Foram encontrados os seguintes SNPs (Polimorfismos de Nucleotídeo Único) no gene *TIMP3*: rs758200076 na região 5'UTR do éxon 1; rs9862, o qual promove a troca sinônima de aminoácidos p.His83His e rs11547635, correspondendo a troca sinônima p.Ser87Ser, ambos no éxon 3. Todos os SNPs encontrados já se encontravam depositadas no GenBank (NCBI). Esses SNPs identificados nos dois grupos foram encontrados nas córneas e sangue dos pacientes, não configurando, desse modo, alterações genéticas adquiridas. Em relação ao gene *LOX*, houve a ausência de quaisquer polimorfismos em todos os indivíduos recrutados para este estudo.

Conclusão: A ausência de mutações nos genes *TIMP3* e *LOX* encontrada por este estudo, diante dos resultados obtidos por outros estudos em outras populações os quais apresentaram resultados

controversos, sugerem que a investigação desses genes seja continuada, a fim de se elucidar suas efetivas contribuições para a etiologia do ceratocone.

Palavras-chave: córnea, ceratocone, *TIMP3*, *LOX*, ectasia, polimorfismos genéticos, astigmatismo irregular

INTRODUÇÃO

O ceratocone é uma distrofia ocular não inflamatória caracterizada pelo afinamento do estroma da córnea resultando no processo de ectasia, no qual a córnea projeta-se em formato de cone, alterando sua curvatura esférica normal. Os sintomas apresentados pelos pacientes são de miopia e astigmatismo irregular, os quais surgem na puberdade e são progressivos até a terceira ou quarta década de vida, período no qual a doença se estabiliza (EL-TARRAS et al., 2015; GHASSEMBAGLOU; DJALILIAN, 2016; NADERAN et al., 2016; LISKOVA et al., 2017; MOUSSA et al., 2017). Estima-se que a prevalência seja de 1 a cada 2.000 pessoas, dependendo da região, pois já foi reportado que a incidência é maior em asiáticos do que em caucasianos, sendo que em alguns casos a doença desenvolvem-se mais severamente, levando ao transplante de córnea, o qual é mais realizado em países desenvolvidos (ZHANG et al., 2015; MOUSSA et al., 2017).

Sobre a etiologia do ceratocone, sabe-se que esta anomalia é de origem multifatorial, apresentando fatores ambientais, comportamentais e genéticos envolvidos, tais como atopia, ato de coçar os olhos, uso excessivo de lentes de contato e exposição à luz ultravioleta (UV). Apesar de que a relativa contribuição desses fatores ainda é desconhecida (BAWAZEER et al., 2000; SUGAR; MACSAI, 2012; GALVIS et al., 2015; MOUSSA et al., 2017). Em relação aos fatores genéticos,

ainda pouco se sabe sobre quais variações a nível molecular estão efetivamente implicados com a doença.

A contribuição genética tem sido obtida principalmente por estudos de investigação de genes os quais estão envolvidos na estrutura e fisiologia da córnea, estudos de herança familiar e recentemente estudos envolvendo mediadores da resposta inflamatória, apesar de o ceratocone ser considerado uma anomalia não inflamatória pela maioria dos estudos da literatura (STABUC-SILIH et al, 2010; ROMERO-JIMENEZ; SANTODOMINGO-RUBIDO, 2010; ABU-AMERO; KALANTAN; AL-MUAMMAR, 2011; WHEELER et al., 2013; MOUSSA et al., 2017).

Estudos desenvolvidos pelo *Genome Wide Association Studies* (GWAS) já identificaram muitos locos de ligação relacionados à espessura da córnea central, representando também fator de risco ao ceratocone (LU et al., 2013; ABU-AMERO et al., 2015; MOUSSA et al., 2017), mas a existência de uma alteração genética relevante para o desencadeamento da doença ainda é desconhecida. Dentre os genes considerados candidatos à etiologia dessa anomalia destacam os genes *TIMP3* e *LOX*.

As metaloproteinases de matriz (MMPs) são uma família de proteases dependentes de zinco as quais possuem como substrato os componentes da matriz extracelular como o colágeno, elastina e gelatina (SAKIMOTO; SAWA, 2012). As MMPs são produzidas em maior quantidade logo após a ocorrência de uma lesão mecânica na córnea, desempenhando papel fisiológico de remodelação da matriz extracelular sob condições normais. Mas diante de uma condição patológica, as MMPs participam da destruição do tecido conjuntivo, ajudando na infiltração de tumores, angiogênese e reações inflamatórias (FINI et al., 1996; COLLIER, 2001; MATTHEWS et al., 2007; SAKIMOTO; SAWA, 2012). As funções das MMPs são reguladas pelos Inibidores de Metaloproteinases (TIMPs), os quais ambos desempenham função

equilibrada para a manutenção da homeostase nos processos fisiológicos do tecido (DE BONIS et al., 2011).

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). O papel do gene *LOX* no ceratocone ainda deve ser investigado, uma vez que alguns trabalhos da literatura apresentam resultados conflitantes (NIELSEN et al., 2003; DUDAKOVA et al., 2012; SHETTY et al., 2015).

Assim esse trabalho teve como objetivo investigar, através de rastreamento genético, a presença de polimorfismos nos genes *TIMP3* e *LOX* em pacientes brasileiros ceratoconizados, a partir da análise pareada de dois tecidos, sangue e córnea, e, por conseguinte, identificar se as alterações encontradas foram herdadas ou adquiridas.

MATERIAIS E MÉTODOS

Casuística

A casuística deste estudo foi dividida em dois grupos: o grupo de pacientes ceratoconizados e o grupo controle, constituído de indivíduos saudáveis quanto ao ceratocone. Dois tecidos, fragmentos de córnea e sangue periférico, foram analisados de forma pareada. O grupo ceratoconizado foi composto por 35 pacientes, dos quais foram obtidos 35 amostras de sangue e 58 amostras de córnea. O grupo controle foi formado por 89 indivíduos, dos quais foram obtidos 41 amostras de sangue e 149 amostras de córnea.

As amostras foram provenientes de pacientes do D'Olhos Hospital – Unidade 2 em São José do Rio Preto/SP e foram obtidas por

meio de procedimentos ceratorefrativos (PRK) e do *Crosslinking* corneano.

Ressalta-se que este estudo foi realizado conforme os princípios da Declaração de Helsinki e foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto/FAMERP (parecer # 1.123.652). Todos os pacientes foram informados sobre os objetivos deste estudo e assinaram um Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

Todos os pacientes foram submetidos a exame clínico, avaliação topográfica e tomográfica. O exame clínico consistiu de refração dinâmica e estática, biomicroscopia com lâmpada de fenda, retinoscopia, tonometria e exame de fundo de olho. O diagnóstico de ceratocone foi realizado baseado na topografia axial com disco de plácido, Easygraph/Topolyzer (Oculus - Wetzlar, Alemanha), com elevação derivada do mapa de curvatura anterior da córnea, juntamente com o exame tomográfico do Pentacam HR (Oculus - Wetzlar, Alemanha), baseado nos critérios utilizados do “Collaborative Longitudinal Evaluation of Keratoconus – CLEK” (ZADNIK et al., 1998). Os pacientes do grupo controle apresentaram córneas sadias clinicamente, e valores topográficos/tomográficos dentro da normalidade.

Como critérios de inclusão dos pacientes, foram considerados os seguintes fatores: ausência de cirurgia ocular prévia; interrupção do uso de lente de contato (LC) rígida por 04 semanas e da LC gelatinosa por 02 semanas; ausência de trauma ocular prévio e ausência de pterígio nasal primário. Como critérios de exclusão, foram considerados os seguintes fatores: pacientes com ceratoconjuntivite sicca, acne rosácea e disfunção severa das glândulas de meibomius; pacientes usando drogas imunossupressoras pela via sistêmica ou tópica ou doença autoimune; uso crônico de medicação ocular; paciente vulnerável devido à enfermidade física ou mental; cicatriz corneana

devido ao KC; hidrópsia corneana; ceratite infecciosa; gravidez e aleitamento.

Extração de DNA, condições da PCR-SSCP e sequenciamento

O DNA genômico do sangue periférico (5 ml) foi extraído utilizando-se o kit QIAamp® DNA Blood QIAGEN (Hilden, Alemanha), de acordo com as instruções do fabricante. Já o DNA genômico das amostras de epitélio de córnea foram extraídos com o protocolo padrão de extração por fenol-clorofórmio.

Os oligonucleotídeos iniciadores, os quais foram utilizados para a amplificação por PCR dos éxons dos genes *TIMP3* e *LOX* constam na Tabela 1. As reações de PCR foram de 25 µl contendo 100 ng de DNA genômico, 12,5 µl de GoTaq® Green Master Mix Promega (WI, USA), 7,5 µl de *nuclease free water* Promega (WI, EUA) e 0,2 pM de cada primer (*forward and reverse*). As ciclagens consistiram de uma desnaturação inicial de 95°C por 3 minutos seguidos por 35 ciclos de 95°C por 30 segundos, temperatura de anelamento por 30 segundos, 72°C por 30 segundos e extensão final a 72°C por 10 minutos.

O rastreamento por mutações foi realizado através da técnica de Polimorfismo Conformacional de Cadeia Simples (SSCP), segundo Orita et al. (1989 a,b).

Os produtos de PCR foram desnaturados em solução desnaturante na proporção de 1:1, ou seja, 4 µl de produto de PCR em 4 µl de solução desnaturante. A solução desnaturante foi composta de formamida a 98%, azul de bromofenol (0,025%) e xilenocianol (0,025%). A seguir, os produtos de PCR foram desnaturados em termociclador por 10 minutos a 94°C. Após a desnaturação, as amostras foram acondicionadas em gelo e aplicadas em géis de poliacrilamida a 7,5%. A eletroforese teve duração de 60 minutos a 150 V em tampão TBE 0,5x (tris-borato-EDTA). Após a corrida, os géis foram corados em 80 ml de tampão TBE 0,5x contendo 8 µl de Sybr® Safe gel stain (INVITROGEN-

THERMO SCIENTIFIC) e fotodocumentados para a análise de padrões de bandamento.

As amostras as quais apresentaram alterações foram purificadas e sequenciadas. O DNA foi purificado com o kit comercial GenElute™ PCR CleanUp (SIGMA ALDRICH), de acordo com o protocolo do fabricante e encaminhadas para sequenciamento direto (método de Sanger) ao IBTEC (Instituto de Biotecnologia), UNESP-Botucatu.

Após o sequenciamento, as sequências nucleotídicas foram inicialmente analisadas com o software Sequence Scanner 2 (Applied Biosystems) e alinhadas e editadas com o software BioEdit 7.0.5 (Tom Hall, Ibis Therapeutics, Carlsbad, CA).

Para análises de referência, as sequências foram submetidas ao banco de dados GenBank NCBI (National Center for Biotechnology Information). As sequências referência utilizadas estão sob o número de acesso NG_009117.1 (*TIMP3*) e NG_008722.1 (*LOX*).

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

GENES		PRIMERS (5' – 3')	TM (°C)	TAMANHO EM PB
<i>TIMP3</i>*	éxon 1	F-ACGGCAACTTTGGAGAGG R-GGGGCAGAGGAAAGGAGT	60	273
	éxon 2	F-CAATTCCAGGCTCCACAGAG R-CTGGCTGGTGCTTAGACACA	60	300
	éxon 3	F-ACATACCCAGCAGTGGGATT R-ACTGGACATTTGGTGAGTCAA	60	296
	éxon 4	F-GGCTAGGCTCTGGACAAAAC R-GCATTGGGAGCTGATGTTTC	56	248
	éxon 5	F-GTCTGAATCCAGGCTCGGTA R-TTTGCAAGAAAACAGGCACT	56	387
<i>LOX</i>*	éxon 1A	F-TGTTGCGCCCCAGATTAAGCC R-CGCATCACTCCTTTTGCCAG	59	541
	éxon 1B	F-CCAGCAGATCCAATGGGAGA R-CAGCGGACTTGGGGTACTTA	59	525
	éxon 2	F-TTTTCACATTGCTTTGCAGT R-GCTCTTGTCCCACTTCCTAA	56	398
	éxon 3	F-TAGTTGGGAAAGGAGGATTG R-GCAATTTTCTCCCTTCAGGT	58	355
	éxon 4	F-GACTTATGTCCTGGGGAAAA R-GATAAAAAATGTGTGTCTTCA	56	441
	éxon 5	F-GGAGGTGCTATAAGGCTGAG R-TTGCTTCCAATACCATGATT	58	370
	éxon 6	F-TTCAGGGGAAAAATATGCAGT R-TGCTTACAAGAAAGCTGCTG	56	394
	éxon 7A	F-CTTAGGTGGAGGGAAACTGT R-AAGTCATTTTGGCTCATTCA	58	485
	éxon 7B	F-GCACATAACTGGATTTTGAACG R-TCAGCACCAGATGTGTCCAT	56	343

* DE BONIS et al. (2011)

RESULTADOS

As análises de rastreamento genético realizadas neste estudo foram conduzidas de forma pareada envolvendo dois tipos de tecidos, córnea e sangue periférico. Os dois tecidos foram utilizados a fim de checar a origem dos polimorfismos encontrados, como herdados ou adquiridos. As alterações genéticas encontradas em nossas análises foram do tipo polimorfismo de nucleotídeo único (SNPs).

Apenas no gene *TIMP3* foram encontrados alguns SNPs. Em relação às regiões codificantes desse gene, foi encontrado o SNP rs758200076 na região 5'UTR do éxon 1. O éxon 3 apresentou os

seguintes SNPs: rs9862, promovendo a troca sinônima de aminoácidos p.His83His, e o rs11547635, correspondendo a troca sinônima p.Ser87Ser. Todos os SNPs encontrados e suas frequências estão descritos na Tabela 2, cujas variações alélicas já se encontravam depositadas no GenBank (NCBI).

Todos os SNPs também foram encontrados em ambos os grupos de indivíduos, ceratoconizado e controle, portanto os mesmos podem ser considerados apenas polimorfismos. Ainda, os SNPs identificados nos dois grupos foram encontrados nas córneas e sangue dos pacientes, não configurando desse modo alterações genéticas adquiridas.

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

Gene/ fragmento	*RefSNP ID	*SNP	*Alteração Proteica	Grupo Ceratoconizado Frequência (%)	Grupo Controle Frequência (%)
<i>TIMP3</i>/éxon 1	rs758200076	c.6186 A>G	5' UTR	4	2,8
<i>TIMP3</i>/éxon 3	rs9862	c.61479 C>T	His83His	16	5,7
<i>TIMP3</i>/éxon 3	rs11547635	c.61491 C>T	Ser87Ser	8	2,8

*Dados obtidos do GenBank (NCBI)

Outro dado relevante encontrado neste estudo foi a presença do SNP c.63530 G>A encontrado no éxon 5 do gene *TIMP3*, em 1 paciente ceratoconizado e em 3 indivíduos do grupo controle, o qual ainda não se encontra descrito no NCBI GenBank (Figura 1). Esse polimorfismo foi encontrado em amostras de sangue e córnea de ambos os grupos.

Neste estudo, em relação ao rastreamento genético envolvendo todas as regiões codificantes do gene *LOX*, houve a ausência de quaisquer polimorfismos e/ou mutações na amostragem analisada, tanto nos padrões de bandamento dos géis, obtidos pela técnica de SSCP como nas análises das sequências nucleotídicas, obtidas pelo sequenciamento de DNA.

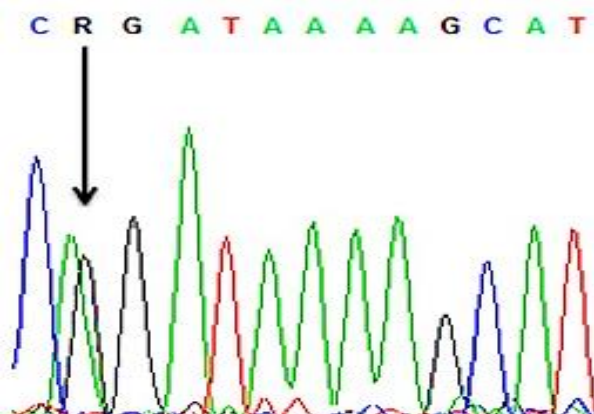


Figura 1: Eletroferograma mostrando o SNP c.63530 G>A (seta) encontrado no éxon 5 do gene *TIMP3*, ainda não documentado no GenBank NCBI.

DISCUSSÃO

O ceratocone apresenta uma etiologia complexa e, mesmo após décadas de pesquisas, os fatores genéticos relacionados a essa doença ainda são pouco conhecidos. Em contrapartida, alguns fatores ambientais e comportamentais são bem caracterizados, tais como atopia, uso excessivo de lentes de contato, ato de coçar os olhos e radiação ultravioleta (DAVIDSON et al., 2014; MOUSSA et al., 2017).

Em relação aos fatores genéticos, destacam-se alguns genes como *VSX1*, *SOD1*, *TIMP3*, *LOX*, *SPARC*, *DOCK9* dentre outros, os quais são estudados devido as suas associações à estrutura e à fisiologia da córnea, ou relacionados às síndromes genéticas, como o *SOD1*; e por isso são considerados genes candidatos à manifestação e ao desenvolvimento do ceratocone (DE BONIS et al., 2011; BURDON; VINCENT, 2013; NIELSEN et al., 2013; GORDON-SHAAG et al., 2015; NOWAK; GAJECKA, 2016; MOUSSA et al., 2017).

Neste estudo pretendeu-se realizar rastreamento mutacional nas regiões codificantes dos genes *TIMP3* e *LOX* em população brasileira. Este estudo destaca-se por ser um dos pioneiros a realizar análise pareada envolvendo sangue e córnea, este último sendo o

tecido alvo da doença, em contraste com a maioria dos trabalhos encontrados na literatura os quais estudam os fatores genéticos somente a partir do sangue periférico.

Em ceratocone, o afinamento da córnea, característico dessa anomalia, deve-se à degradação da matriz extracelular, composta principalmente por fibras de colágeno, gelatina e elastina. Durante o processo de degradação destacam-se a ação de proteases, como collagenases e gelatinases, as quais são membros da família de metaloproteinases de matriz (MMPs) (BALASUBRAMANIAN; PYE; WILLCOX, 2010). Também contribui para o afinamento corneano a ação desregulada de inibidores de metaloproteinases, como a proteína TIMP3, a qual, quando super expressa, induz à apoptose dos queratócitos (MATTHEWS et al.; 2007).

Em relação à estrutura da córnea, a associação entre as atividades de MMPs e seus inibidores (TIMPs) é muito importante para a manutenção da estrutura e controle do processo de remodelação da matriz extracelular (HOLOPAINEN et al., 2011). Os TIMPs possuem a função de inibir naturalmente as MMPs. As MMPs formam um grupo de endopeptidases dependentes de zinco as quais podem estar associadas à membrana ou podem ser secretadas. As funções conjuntas de TIMPs e MMPs, em condições normais, são equilibradas e desempenham funções fisiológicas importantes, destacando-se desenvolvimento embrionário, remodelação do tecido conjuntivo, cicatrização de feridas, angiogênese dentre outras (BALASUBRAMANIAN; PYE; WILLCOX, 2010; DE BONIS et al., 2011).

Então, 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).

Em relação ao gene *TIMP3*, nossos resultados até o momento não identificaram nenhuma alteração patogênica que esteja ligada à doença. No entanto, nossos achados constam de polimorfismos neutros encontrados no éxon 3 e ainda uma nova alteração no éxon 5 ainda não descrita nas bases de dados genéticos do GenBank.

Segundo Matthews et al. (2007), a proteína TIMP3, além da forma solúvel, é encontrada associada à matriz extracelular por toda a extensão da córnea e que sua relação com a viabilidade das células do estroma é delicada. Esta proteína age, em condições normais, no processo de reparação tecidual. Mas quando em alta concentração no estroma, induz os queratócitos à apoptose, resultando em consequências patológicas. Ainda, de acordo com os experimentos de Matthews et al. (2007), envolvendo meios de cultura de células estromais normais infectadas pelo adenovírus RAdTIMP-3, eles demonstraram um aumento de expressão dessa proteína e que, essas altas taxas promoveram apoptose em células estromais através da ativação de caspase-3. Esses resultados contribuem para o decréscimo da massa estromal e o aparecimento de cicatrizes no lugar onde essas células ocupavam, o que pode resultar no afinamento da córnea.

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.

De Bonis et al. (2011) realizaram rastreamento genético do gene *TIMP3* em 302 pacientes ceratoconizados e não encontraram nenhuma mutação ou qualquer novo polimorfismo em suas análises, concluindo que seus resultados possam excluir uma possível ligação desse gene com essa anomalia ocular.

A enzima lisil oxidase (LOX), sob condições fisiológicas normais, desempenha papel importante na composição da matriz extracelular, promovendo as ligações cruzadas das fibras de colágeno e

elastina. Além disso, essa enzima está envolvida na estabilidade do tecido conjuntivo e vascular e também no processo de invasão de células tumorais e metástases de muitos cânceres (DUDAKOVA et al., 2012; SETHI; WORDINGER; CLARK, 2012).

Especificamente no olho, a enzima LOX participa da trama trabecular, corpo ciliar, lente e retina. Então essa enzima, devido as suas funções, tem sido investigada em casos de ceratocone (DUDAKOVA et al., 2012).

Dudakova et al. (2012) realizaram estudo sobre a distribuição e diferenças de atividade da enzima LOX em córneas normais e ceratoconizadas através do cultivo de fibroblastos do estroma. Os autores, de acordo com seus resultados, encontraram queda da atividade enzimática em córneas ceratoconizadas quando comparado ao grupo controle, concluindo que essa enzima possa estar envolvida na patogênese do ceratocone.

Então, devido à sua importância, o gene *LOX* torna-se um gene interessante para o estudo de anomalias estruturais da córnea. Por essa razão já foi abordado em alguns estudos disponíveis na literatura (DUDAKOVA et al., 2012; SETHI; WORDINGER; CLARK, 2012; HASANIAN-LANGROUDI et al., 2014; DUDAKOVA et al., 2015).

Em nossas análises realizadas em todos os sete éxons do gene *LOX* envolvendo a córnea e também sangue periférico, nenhuma variação genética, tanto nova ou já descrita, foi encontrada em nossa amostragem, tanto no rastreamento em gel quanto no sequenciamento de DNA, evidenciando nenhum envolvimento desse gene nos casos de ceratocone os quais foram abordados por este estudo.

Nossos resultados estão de acordo com o estudo realizado por DE BONIS e colaboradores (2011), os quais também realizaram rastreamento mutacional no gene *LOX* em uma amostragem de 302 pacientes italianos ceratoconizados, um número grande de indivíduos considerando a prevalência da doença. Como resultados de

suas análises, esses autores também não encontraram nenhuma variação nova, exceto dois SNPs os quais já haviam sido descritos anteriormente, rs41407546 (c.476 C>A, p.P159Q) e rs1800449 (c.473 G>A, p. R158Q). Assim, os autores sugerem a exclusão de *LOX* na etiologia do ceratocone.

Hassanian-Langroudi et al. (2014) estudaram dois polimorfismos do gene *LOX*, rs1800449 (G>A) e rs2288393 (C>G) e suas ligações com o ceratocone, em população iraniana abrangendo 112 pacientes ceratoconizados. Seus resultados apontaram diferença significativa entre os grupos ceratoconizado e controle, em relação à frequência do SNP rs1800449, cujo genótipo apareceu em 65,5% em pacientes ceratoconizados contra 50% no grupo controle ($p=0,044$). Segundo os autores, essa alteração pode ser considerada fator de risco para o ceratocone. Já a frequência do SNP rs2288393 não foi significativa entre os grupos. É importante destacar que o SNP rs1800449 também foi encontrado no estudo de De Bonis et al. (2011), mas os autores descartaram seu envolvimento como um dos possíveis fatores genéticos relacionados à doença.

Bykhovskaya et al. (2012) realizaram sequenciamento do gene *LOX* em uma amostragem de apenas 16 pacientes ceratoconizados composto por casos esporádicos e familiares, encontrando os SNPs rs10519694, rs2956540, rs1800449 e rs2288393. Segundo os autores, essas variações apresentam associações com a doença, podendo estar implicadas na susceptibilidade do ceratocone.

Mas, recentemente, em um estudo de meta-análise, Zhang et al. (2015) avaliaram esses mesmos SNPs no gene *LOX*, provenientes de quatro trabalhos da literatura, incluindo um total de 1.467 casos de ceratocone. De acordo com os autores, os SNPs rs 2956540 e rs10519694 apresentaram significativa associação com a doença ($p=1,43E-08$ e $p=0,026$ respectivamente). Em relação às diferenças étnicas, segundo os autores, a alta associação de rs2956540 deveu-se à

combinação de dados de populações caucasianas e chinesa, apresentando nenhuma taxa de heterogeneidade; já a associação um pouco menor de rs10519694 apareceu em análises de apenas populações caucasianas, apresentando uma moderada heterogeneidade, o que pode estar relacionada às diferenças populacionais. Os autores também destacam a ausência de associação dos SNPs rs1800449 e rs2288393 ($p= 0,83$ e $p= 0,30$ respectivamente), em contraste com as análises realizadas por Bykhovskaya et al. (2012). Além disso, os autores ressaltam que esses polimorfismos têm sido investigados por outros estudos envolvendo outros grupos étnicos, os quais apresentaram resultados inconsistentes e variáveis.

Os resultados obtidos por este estudo, envolvendo os genes *TIMP3* e *LOX*, são concordantes com alguns trabalhos da literatura, os quais encontraram apenas polimorfismos ou variantes genéticas pouco significativas (DE BONIS et al, 2011; HASSANIAN-LANGROUDI et al., 2014). Talvez um fator limitante de nosso trabalho seja a utilização de uma amostragem menor, mas, em contrapartida, a literatura encontra-se fomentada por estudos os quais apresentaram amostragens de tamanhos variados, sem, contudo, apontarem alterações genéticas relevantes associadas à doença. Ainda sugerimos que a ausência de variantes genéticas no gene *LOX* obtida por nós, as quais já foram documentadas anteriormente, seja uma característica da população analisada neste estudo.

Concluindo, o ceratocone é uma anomalia ocular multifatorial que apresenta uma patogênese complexa, na qual os fatores genéticos ainda são poucos conhecidos. Em relação às características desses fatores destacam-se: alta heterogeneidade genética nos locos dos genes estudados, resultados conflitantes apresentados por vários trabalhos, falta de repetibilidade em outras populações, inconsistência de resultados obtidos e baixa frequência das alterações genéticas encontradas, as quais apresentam pouca força de associação à doença.

Assim, diante desse cenário, sugere-se que os estudos desses genes ainda devam ser investigados em outras populações mundiais através de várias técnicas moleculares envolvendo rastreamento genético, expressão gênica, sequenciamento de RNA, dentre outras, para que se chegue a um consenso sobre o efetivo envolvimento desses genes no surgimento do ceratocone.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem a todos os pacientes os quais concordaram em participar deste estudo e também as organizações brasileiras: CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) e FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo) [# 2015/17226-7], pelo apoio financeiro.

REFERÊNCIAS

- ABU-AMERO, K.K.; HELWA, I.; AL-MUAMMAR, A. et al. Case-control association between CCT-associated variants and keratoconus in a Saudi Arabian population. **J Negat Results Biomed**, v. 14, n. 10, 2015.
- 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.
- 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.
- BAWAZEER, A.M.; HODGE, W.G.; LORIMER, B. Atopy and keratoconus: a multivariate analysis. **Br J Ophthalmol**, v. 84, p. 834-836, 2000.
- 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.

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

DAVIDSON, A.E.; HAYES, S.; HARDCASTLE, A.J. et al. The pathogenesis of keratoconus. **Eye**, v.28, n. 2, p. 189-195, 2014.

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.

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.

DUDAKOVA, L.; PALOS, M.; JIRSOVA, K. et al. Validation of rs2956540: G>C and rs3735520: G>A association with keratoconus in a population of European descent. **Eur J Hum Genet**, v. 23, n. 11, p. 1581-1583, 2015.

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.

FINI, M.E.; PARKS, W.C.; RINEHART, W.B. et al. Role of matrix metalloproteinases in failure to re-epithelialize after corneal injury. **Am J Pathol**, v. 149, n. 4, p.1287-1302, 1996.

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

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

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

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.

HOLOPAINEN, J. M.; SERRA, H. M.; SÁNCHEZ, M. C. et al. Altered expression of matrix metalloproteinases and their tissue inhibitors as possible contributors to corneal droplet formation in climatic droplet keratopathy. **Acta Ophthalmologica**, v. 89, n. 6, p. 569-574, 2011.

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

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.

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.

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.

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

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

NIELSEN, K.; BIRKENKAMP-DEMTRODER, K.; EHLERS, N. et al. Identification of differentially expressed genes in keratoconus epithelium analyzed on microarrays. **Invest Ophthalmol Vis Sci**, v. 44, p. 2466-2476, 2003.

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

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

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.

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

SAKIMOTO, T.; SAWA, M. Metalloproteinases in corneal diseases: degradation and processing. *Cornea*, v. 31, n. 11, p. 50-56, 2012.

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

SHETTY, R.; SATHYANARAYANAMOORTHY, A.; RAMACHANDRA, R.A. et al. Attenuation of lysyl oxidase and collagen gene expression in keratoconus patients corneal epithelium corresponds to disease severity. **Mol Vis**, v. 21, p. 12-25, 2015.

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.

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

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.

ZHANG, J.; ZHANG, L.; HONG, J. et al. Association of common variants in *LOX* with keratoconus: a meta-analysis. **PLoS One**, v. 10, n. 12, 2015.

4.3 CAPÍTULO 3: MANUSCRITO # 3

Ausência da mutação c.169+50delTAAACAG em pacientes ceratoconizados em população Brasileira

Alessandro Garcia Lopes, MSc,^{1,2} Gildásio Castello de Almeida Júnior, MD, PhD,³ Luiz Carlos de Mattos, PhD,² Cinara de Cássia Brandão de Mattos, PhD² e Lilian Castiglioni, PhD^{1,4}

¹Departamento de Biologia, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, IBILCE-UNESP, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Rua Cristóvão Colombo, 2265, 15054-000, São José do Rio Preto, São Paulo, Brazil.

²Laboratório de Imunogenética, Departamento de Biologia Molecular, Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto (FAMERP), Avenida Brigadeiro Faria Lima, 5416, 15090-000, São José do Rio Preto, SP, Brazil.

³Ambulatório de Oftalmologia, Hospital de Base de São José do Rio Preto, Fundação Faculdade Regional de Medicina (HB-FUNFARME), Avenida Brigadeiro Faria, 5544, 15090-000, São José do Rio Preto, SP, Brazil.

⁴Departamento de Epidemiologia e Saúde Coletiva, Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto (FAMERP), Avenida Brigadeiro Faria Lima, 5416, 15090-000, São José do Rio Preto, São Paulo, Brazil.

Autor correspondente:

Alessandro Garcia Lopes

Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto (FAMERP)

Departamento de Biologia Molecular - Laboratório de Imunogenética

Avenida Brigadeiro Faria Lima, 5416, Vila São Pedro

15090-000 - São José do Rio Preto, SP, Brazil.

Telefone: 55 17 32015854

E-mail: alegenetica@gmail.com

RESUMO

Objetivo: Identificar a presença da deleção de 7 pares de base, c.169+50delTAAACAG, no íntron 2 do gene *SOD1* em pacientes ceratoconizados do Estado de São Paulo, Brasil, a qual promove variações de *splicing*, resultando em proteínas antioxidantes *SOD1* não funcionais, as quais podem trazer prejuízos à estrutura da córnea.

Métodos: A casuística deste trabalho foi composta de um grupo ceratoconizado de 35 pacientes, dos quais foram avaliadas 35 amostras de sangue periférico e 58 amostras de fragmentos de córnea, e um grupo controle de 89 indivíduos, compreendendo 41 amostras de sangue e 149 amostras de fragmentos de córnea. Após a amplificação dos fragmentos de DNA por Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), a análise de rastreamento mutacional foi realizada através de digestão enzimática, seguida de sequenciamento direto.

Resultados: Foi detectada a ausência da mutação de 7 pares de base c.169+50delTAAACAG nos indivíduos analisados de ambos os grupos, tanto nas amostras de córnea quanto nas amostras de sangue periférico.

Conclusão: Sugere-se, neste estudo, que o envolvimento da deleção c.169+50delTAAACAG na patogênese do ceratocone possa estar associado a outros fatores genéticos, ambientais e comportamentais.

Palavras-chave: ceratocone, córnea, *SOD1*, superóxido dismutase, radicais superóxidos

INTRODUÇÃO

O ceratocone é uma anomalia ocular assimetricamente bilateral caracterizado pelo afinamento progressivo da córnea, no qual esta passa a apresentar o formato de cone, em um processo denominado ectasia, apresentando uma prevalência de aproximadamente 1 a cada 2.000 pessoas (EL-TARRAS et al., 2015; GHASSEMBAGLOU; DJALILIAN, 2016; NADERAN et al., 2016; LISKOVA et al., 2017; MOUSSA et al., 2017).

Essa anomalia foi descrita pela primeira vez em 1854 por Nottingham e, após mais de um século de sua descoberta, possui sua etiologia ainda pouco conhecida (MCGHEE, 2008; SUGAR; MACSAI, 2012; GRZYBOWSKI; MCGHEE, 2013; NADERAN et al., 2016). Atualmente sabe-se que essa é uma doença multifatorial, destacando-se fatores genéticos, ambientais e comportamentais envolvidos (GORDON-SHAAG et al., 2015).

Na literatura, muitos trabalhos definem o ceratocone como uma anomalia não inflamatória, mas, em contraste a essa informação, alguns trabalhos publicados recentemente demonstram um aumento de mediadores inflamatórios (citocinas), como a interleucina-6, em lágrimas de pacientes ceratoconizados (MURUGAIYAN; SAHA, 2009; GABR et al., 2011; JUN et al., 2011; WISSE et al., 2015; SHETTY et al., 2015).

No início, a doença se manifesta de forma assintomática, mas assim que seu desenvolvimento progride, diminui a acuidade visual, culminando com o quadro clínico de miopia e astigmatismo irregular progressivos os quais podem perdurar até a quarta década de vida; ressaltando que casos mais graves da doença exigem transplante de córnea (JEOUNG et al., 2012; WHEELER et al., 2013; LECHNER et al., 2014; GORDON-SHAAG et al., 2015; FARJADNIA et al., 2015; WANG et al., 2016; GHASSEMBAGLOU; DJALILIAN, 2016; MOUSSA et al., 2017).

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

A etiologia do ceratocone, em relação aos fatores genéticos envolvidos, destacam-se alguns genes considerados candidatos ao desenvolvimento da doença, tais como *SOD1*, *VSX1*, *LOX*, *DOCK9*, dentre outros. Mas o efetivo envolvimento desses genes com a doença ainda é considerado complicado e controverso (DE BONIS et al., 2011; MOUSSA et al., 2017).

A enzima antioxidante superóxido dismutase 1 (*SOD1*) desempenha papel crucial na fisiologia na córnea, com a função de neutralizar radicais superóxidos formados a partir da exposição à luz, os quais podem trazer prejuízos à estrutura da córnea. Interessantemente essa enzima encontra-se diferentemente distribuída em córneas ceratoconizadas em relação às córneas normais (UDAR et al., 2006; STABUC-SILIH et al., 2010; SAEED-RAD et al., 2013; NEJABAT et al., 2017).

A mutação mais relevante encontrada no gene *SOD1* até o momento, que está relacionada ao ceratocone, é uma deleção de 7 pares de bases (c.169+50delTAAACAG) situada no íntron 2 do gene, a qual pode interferir no processo de *splicing*, gerando duas variantes de transcritos que resultam em proteínas *SOD1* não funcionais (UDAR et al., 2006).

Então, no presente estudo, foi realizado rastreamento genético da região situada no íntron 2 do gene *SOD1*, na tentativa de se detectar a mutação c.169+50delTAAACAG em pacientes ceratoconizados do noroeste do Estado de São Paulo, Brasil.

MATERIAIS E MÉTODOS

Casuística

Este estudo foi realizado conforme os princípios da Declaração de Helsinki e foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto/FAMERP (# 1.123.652). Todos os pacientes foram informados sobre os objetivos deste estudo e assinaram um Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

A casuística foi dividida em dois grupos: o grupo de pacientes ceratoconizados e o grupo controle, constituído de indivíduos saudáveis quanto ao ceratocone. Dois tecidos, fragmentos de córnea e sangue periférico, foram analisados de forma pareada. O grupo ceratoconizado foi composto por 35 pacientes, dos quais foram obtidos 35 amostras de sangue e 58 amostras de córnea. O grupo controle foi formado por 89 indivíduos saudáveis quanto ao ceratocone, composto por 41 amostras de sangue e 149 amostras de córnea.

As amostras foram provenientes de pacientes do D'Olhos Hospital – Unidade 2 em São José do Rio Preto/SP e foram obtidas por meio de procedimentos ceratorefrativos (PRK) e do *Crosslinking* corneano.

Todos os pacientes foram submetidos a exame clínico, avaliação topográfica e tomográfica. O exame clínico consistiu de refração dinâmica e estática, biomicroscopia com lâmpada de fenda, retinoscopia, tonometria e exame de fundo de olho. O diagnóstico do KC foi realizado baseado na topografia axial com disco de plácido, Easygraph/Topolyzer (Oculus - Wetzlar, Alemanha), com elevação derivada do mapa de curvatura anterior da córnea, juntamente com o exame tomográfico do Pentacam HR (Oculus - Wetzlar, Alemanha), baseado nos critérios utilizados do “Collaborative Longitudinal Evaluation of Keratoconus – CLEK” (ZADNIK et al., 1998). No Pentacam foram realizados 03 exames com ótima fixação e qualidade e foi feita uma média dos seguintes

parâmetros avaliados: curvatura axial, elevação anterior, elevação posterior, espessura da córnea e o BAD III. Os dados da elevação foram retirados de uma zona fixada em 8 mm com referência o BFS (Best Fit Sphere - ajustado manual, “float”, esfera, diâmetro 8,0 mm) centrado no ápice da córnea.

Como critérios de inclusão dos pacientes, foram considerados os seguintes fatores: ausência de cirurgia ocular prévia; interrupção do uso de lente de contato (LC) rígida por 04 semanas e da LC gelatinosa por 02 semanas; ausência de trauma ocular prévio e ausência de pterígio nasal primário. Como critérios de exclusão, foram considerados os seguintes fatores: pacientes com ceratoconjuntivite sicca, acne rosácea e disfunção severa das glândulas de meibomius; pacientes usando drogas imunossupressoras pela via sistêmica ou tópica ou doença autoimune; uso crônico de medicação ocular; paciente vulnerável devido à enfermidade física ou mental; cicatriz corneana devido ao KC; hidrópsia corneana; ceratite infecciosa; gravidez e aleitamento.

Extração de DNA e condições da PCR-RFLP e sequenciamento

O DNA genômico do sangue periférico (5 ml) foi extraído utilizando-se o kit QIAamp® DNA Blood QIAGEN (Hilden, Alemanha), de acordo com as instruções do fabricante. Já o DNA genômico das amostras de epitélio de córnea foram extraídos com o protocolo padrão de extração por fenol-clorofórmio.

Os oligonucleotídeos iniciadores, os quais foram utilizados para a amplificação por PCR do fragmento que compreende parte do éxon 2 e parte de sua região intrônica do gene *SOD1* foram: F-CAGAAACTCTCTCCAATTGC e R-GAGGGGTTTACTGTTTAGGG (DE BONIS et al. 2011), abrangendo um fragmento de aproximadamente 218 pb.

As reações de PCR foram de 25 µl contendo 100 ng de DNA genômico, 12,5 µl de GoTaq® Green Master Mix Promega (WI, USA), 7,5 µl de *nuclease free water* Promega (WI, EUA) e 0,2 pM de cada primer (*forward and reverse*). As ciclagens consistiram de uma desnaturação inicial de 95°C por 3 minutos seguidos por 35 ciclos de 95°C por 30 segundos, temperatura de anelamento de 59°C por 30 segundos, 72°C por 30 segundos e extensão final a 72°C por 10 minutos.

A técnica de RFLP (*Random Fragment Length Polymorphism*) foi realizada com a enzima de restrição HpyCH₄ III, a qual possui sítio de restrição em amostras com a presença da deleção.

Após a digestão, os fragmentos foram aplicados em gel de agarose a 2,5% e corados com 8 µl de Sybr® Safe gel stain (INVITROGEN- THERMO SCIENTIFIC). A eletroforese teve duração de 60 minutos a 100 V em tampão TBE 1x (tris-borato-EDTA) e em seguida os géis foram fotodocumentados.

Em seguida, as amostras do grupo ceratoconizado e amostras aleatórias do grupo controle foram sequenciadas para confirmação dos resultados. As sequências nucleotídicas foram inicialmente analisadas com o software Sequence Scanner 2 (Applied Biosystems) e alinhadas e editadas com o software BioEdit 7.0.5 (Tom Hall, Ibis Therapeutics, Carlsbad, CA).

Para a análise de referência, as sequências foram blastadas no banco de dados GenBank NCBI, utilizando-se a sequência depositada sob o número de acesso NG_008689.1.

RESULTADOS

As análises realizadas por PCR-RFLP para parte do fragmento do éxon 2 e parte de sua região intrônica, do gene *SOD1*, não apresentaram nenhum polimorfismo de restrição nas amostras analisadas por este estudo. A Figura 1 corresponde a uma das corridas por

eletroforese em gel de agarose das amostras as quais foram submetidas à digestão pela enzima de restrição HpyCH₄ III.

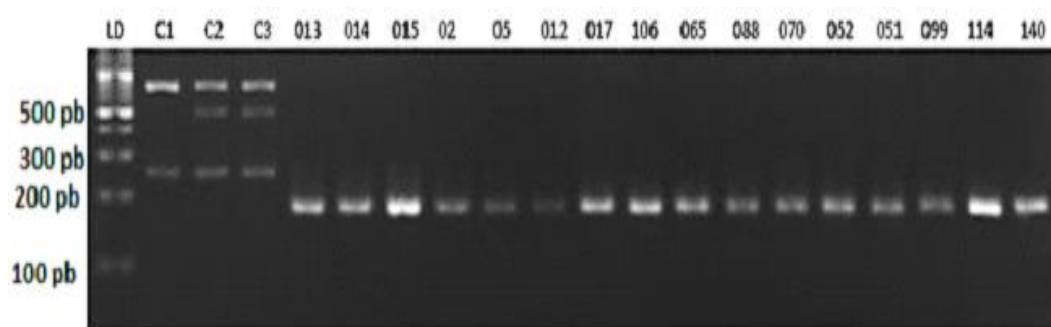


Figura 1: Eletroforese em gel de agarose a 2,5% do fragmento que compreende parte da região do íntron 2 e parte da região do éxon 2 do gene *SOD1*. As bandas indicam fragmentos de aproximadamente 218 pb que foram previamente tratados com a enzima de restrição HpyCH₄ III e que não apresentaram polimorfismos 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).

Dados da literatura confirmam a presença da deleção c.169+50 delTAAACAG que ocorre na região de *splicing* e que esta está associada ao ceratocone (UDAR et al., 2006; DE BONIS et al., 2011). Quando presente, essa mutação promove *splicings* alternativos e gera duas moléculas variantes de mRNA, com a perda do éxon 2 e/ou éxons 2 e 3, o que promove prejuízos estruturais e queda de função da proteína *SOD1*. Nenhuma das amostras, tanto sangue quanto de córnea, apresentaram sítio de restrição para a enzima HpyCH₄ III, a qual é capaz de clivar o DNA em um sítio específico promovido por essa deleção de 7 pb, ou seja, a presença do sítio de restrição indicaria a presença da deleção (não encontrada em nossas análises).

As análises das sequências nucleotídicas das amostras, após o sequenciamento, não apresentaram nenhum polimorfismo e/ou

mutação no fragmento estudado, cujos resultados foram concordantes com os resultados obtidos em gel.

DISCUSSÃO

O gene *SOD1* possui uma extensão de 9.320 pb, codificando um transcrito de 645 pb compreendendo 5 éxons, resultando em uma proteína composta por 154 aminoácidos (UDAR et al., 2006). A importância antioxidante desse gene na fisiologia da córnea, o torna um dos principais genes relacionados à patogênese do ceratocone. Vários estudos de rastreamento genético encontrados na literatura os quais pesquisaram esse gene e alguns outros também, tais como *VSX1*, *LOX*, *TIMP3*, *DOCK9*, genes de colágeno, dentre outros, já identificaram algumas alterações genéticas que possam estar relacionadas à doença, mas, contudo, esses resultados sozinhos não são consistentes o bastante para serem considerados agentes genéticos desencadeadores dessa patologia ocular (STABUC-SILIH et al., 2010; DE BONIS et al., 2011; MOSCHOS et al., 2013; AL-MUAMMAR et al., 2014; AL-RADDADI et al., 2016; NEJABAT et al., 2017).

De acordo com as variações genéticas encontradas nesses genes em diferentes populações do mundo, grande parte delas apresentam-se como polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs), os quais, na maioria das vezes, possuem baixa associação à doença e, ainda, são considerados resultados controversos por alguns trabalhos (AL-MUAMMAR et al., 2014; FARJADNIA; NADERAN; MOHAMMADPOUR, 2015).

Assim, buscando contribuir com o conhecimento genético dessa importante e complexa anomalia ocular, foi realizado neste estudo o rastreamento pela mutação c.169+50delTAAACAG. Destacamos também a importância deste estudo o qual, baseada na busca recente pelos indexadores, é inédito em população brasileira. Outro aspecto relevante abordado foi o uso de dois tecidos para as análises, o sangue e

a córnea (este último o tecido alvo da doença), diferenciando-se da grande maioria dos estudos sobre ceratocone, os quais analisam apenas sangue.

Especificamente em relação ao gene *SOD1*, a mutação mais relevante associada à doença foi uma deleção de 7 pb denominada c.169+50 delTAAACAG, descrita pela primeira vez em 2006 por Udar e colaboradores, através de um estudo de rastreamento genético envolvendo 15 pacientes ceratoconizados, dos quais dois apresentaram a mutação. Essa mutação, segundo os autores, ocorre no íntron 2 do gene a qual promove *splicings* alternativos dando origem a duas variantes de transcritos, os quais são moléculas de mRNA com a ausência do éxon 2 e/ou éxons 2 e 3 respectivamente, o que resultam em proteínas *SOD1* não funcionais devido à perda de seus sítios ativos.

Mais tarde, em um trabalho publicado em 2011, De Bonis e colaboradores realizaram rastreamento mutacional no gene *SOD1* em 302 pacientes italianos ceratoconizados e também encontraram a presença da mutação c.169+50 delTAAACAG no íntron 2 do gene em apenas dois pacientes, concluindo que apesar da baixa frequência, essa mutação ainda deve ser investigada em outros estudos.

Posteriormente, Moschos et al. (2013), também realizaram um estudo genético envolvendo o gene *SOD1*, em população grega constituída de 33 casos de ceratocone e 78 controles. Após as análises de sequenciamento de DNA, identificaram a presença da deleção de 7 pb em nove pacientes com caso de ceratocone esporádico. Além disso, a mutação também apareceu em quatro indivíduos controles. Assim, os autores ressaltam que o papel dessa mutação na patogênese do ceratocone ainda deve ser mais estudado.

Em uma revisão da literatura, destacam-se dois trabalhos os quais também procuraram por essa deleção em indivíduos ceratoconizados de outras populações: Al-Muammar et al. (2014) e Nejabat et al. (2017), quando investigaram 55 pacientes sauditas e 20

pacientes provenientes do sul do Iran, respectivamente, e, em contraste aos estudos positivos para a deleção citados acima, esses autores não detectaram a presença dessa mutação.

O resultado obtido por este trabalho envolvendo amostras de sangue e córnea de 35 pacientes ceratoconizados, nos quais foram realizados o rastreamento genético do íntron 2 do gene *SOD1*, apresentou a ausência da deleção de 7 pb encontrada anteriormente em outras populações. Mas ressaltamos que nosso resultado está concordante com os estudos da literatura apresentados acima, os quais também apresentaram resultados negativos.

Destacamos também que este estudo envolvendo rastreamento genético no gene *SOD1* é pioneiro em população brasileira e destaca-se também, a nível internacional, pela utilização de raras amostras de córnea, as quais foram obtidas através de procedimentos cirúrgicos.

Por fim, concluímos que os fatores genéticos envolvidos na patogênese do ceratocone, apesar de todos os esforços até o momento, encontram-se pouco definidos e controversos. E em relação a presença da mutação c.169+50delTAAACAG em pacientes ceratoconizados, esta apresenta uma frequência muito baixa, e que, quando presente, pode desencadear a doença ou não, dependendo da associação com outros fatores de susceptibilidade, uma vez que o ceratocone é uma doença multifatorial e que os aspectos ambientais e comportamentais estão fortemente relacionados a sua origem.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem a todos os pacientes os quais concordaram em participar deste estudo e também as organizações brasileiras: CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) e FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo) [# 2015/17226-7], pelo apoio financeiro.

REFERÊNCIAS

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.

AL-RADDADI, H.S.; AL-BARRY, M.A.; AL-HARBI, E. et al. Sequence analysis of the *VSX1* and *SOD1* genes in families with Keratoconus and a review of the literature. **J Taibah Univ Med Sci**, v.11, p. 115-120, 2016.

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.

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.

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-) expression in human intervertebral disc cells. **J Othop Res**, v. 29, p. 1-7, 2011.

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

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

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.

JEOUNG, J.K.; KIM, M.K.; PARK, S.S. et al. *VSX1* gene and Keratoconus: Genetic analysis in Korian 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.

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

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.

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.

MOSCHOS, M.M.; KOKOLAKIS, N.; GAZOULI, M. et al. Polymorphism Analysis of *VSX1* and *SOD1* Genes in Greek Patients with Keratoconus. **Ophthalmic Genetics**, v.36, n.3, p.213-217, 2013.

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.; ZARRINBAKSH, P. et al. Association between Family History and Keratoconus Severity. **Current Eye Research**, p. 1-5, 2016.

NEJABAT, M.; NAGHASH, P.; DASTSOOZ, H. et al. *VSX1* and *SOD1* mutation screening in patients with keratoconus in the South of Iran. **J Ophthalmic Vis Res**, v. 12, n. 2, p. 135-140, 2017.

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. **Mol Vis**, v. 19, p. 2501-2507, 2013.

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.

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.

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.

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.

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

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.

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.

5 DISCUSSÃO GERAL

O ceratocone, como já foi apresentado ao longo deste trabalho, é uma anomalia ocular que afeta a córnea, caracterizada por ser progressiva e degenerativa e que, em estágio avançado, pode culminar em transplante de córnea. Essa doença é de origem multifatorial, possuindo uma etiologia complexa. Os sintomas mais comuns são de miopia e astigmatismo irregular, os quais são progressivos, e o tratamento mais eficaz atualmente é o *Crosslinking* corneano (EL-TARRAS et al., 2015; GHASSEMBAGLOU; DJALILIAN, 2016; NADERAN et al., 2016; LISKOVA et al., 2017; MOUSSA et al., 2017).

O objetivo geral deste estudo foi identificar a presença de polimorfismos e/ou mutações nos genes *VSX1*, *SOD1*, *TIMP3* e *LOX* em pacientes ceratoconizados da região noroeste do Estado de São Paulo, através de rastreamento (*screening*) genético realizado a partir da análise de amostras de DNA desnaturado submetido à eletroforese em gel de poliacrilamida, numa técnica denominada SSCP (*Single-Strand Conformation Polymorphism*) e posterior análise das sequências nucleotídicas obtidas por sequenciamento direto (Método de Sanger). Esta metodologia molecular foi adotada neste estudo pelo fato de ser utilizada em outras pesquisas envolvendo rastreamento genético (HEON et al., 2002, UDAR et al., 2006; DE BONIS et al., 2011).

Um aspecto importante foi a escolha desses genes para este estudo. Ela foi baseada através de extensa pesquisa em relevantes trabalhos disponíveis na literatura, os quais estudam rastreamento mutacional em casos de ceratocone. Sobre essa anomalia ocular, a pesquisa abrangendo fatores genéticos tem sido crescente, mas os resultados ainda são pouco esclarecedores. Então a investigação científica deve ser iniciada a partir de um ponto, baseada em hipóteses, e nada mais instigante do que estudar genes os quais estão envolvidos na estrutura e fisiologia da córnea.

Inicialmente a investigação do gene *VSX1* se destacou com o trabalho de Heon e colaboradores (2002), a partir deles vários outros trabalhos surgiram utilizando esse gene. O gene *SOD1* ganhou destaque entre os pesquisadores com o estudo de Udar e colaboradores (2006), os quais identificaram uma deleção de 7 pb no íntron 2 do gene, a qual promove processos de *splicing* alternativos, resultando em proteínas *SOD1* não funcionais e consequentemente queda de atividade antioxidante na córnea, o que contribui para sua degeneração.

Nesse mesmo cenário, estudos envolvendo os genes *TIMP3*, *LOX*, dentre outros, ressaltaram a importância desses genes como candidatos à patogênese da doença (DE BONIS et al., 2011; BURDON; VINCENT, 2013; NIELSEN et al., 2013; GORDON-SHAAG et al., 2015; NOWAK; GAJECKA, 2016; MOUSSA et al., 2017).

O gene *TIMP3* despertou interesse de estudo devido as suas complexas e delicadas funções no estroma corneano, as quais são responsáveis pela manutenção e viabilidade do tecido. O produto desse gene é um inibidor que controla a ação de metaloproteínases, as quais são responsáveis por clivagens de fibras de colágeno e elastina durante a remodelação da trama dessas fibras. No entanto, a alta expressão desse gene induz os queratócitos do estroma à apoptose, o que contribui para o afinamento da córnea (MATTHEWS et al., 2007; BALASUBRAMANIAN; PYE; WILLCOX, 2010; DE BONIS et al., 2011).

O gene *LOX* possui uma grande importância na morfogênese e reparação da matriz extracelular do estroma, promovendo ligações covalentes cruzadas entre as fibras de colágeno e elastina, contribuindo para estabilização e manutenção da matriz. Semelhante ao que ocorre com o gene *VSX1*, o gene *LOX* tem apresentado vários SNPs dos quais alguns possuem relevante associação à doença e outros apresentam ausência de associação, fomentando a literatura com resultados às vezes controversos (DUDAKOVA et al., 2012; SETHI; WORDINGER; CLARK, 2012).

Outro aspecto que também fundamentou a decisão de conduzir este estudo foi o fato de que a região noroeste paulista, particularmente São José do Rio Preto, apresenta considerável desenvolvimento econômico, possuindo um dos mais importantes polos de saúde do país, abrangendo hospitais, clínicas e profissionais de saúde. Isto é um fator relevante a se considerar, quando na realização de pesquisas relacionadas à área médica e doenças em geral.

Em relação às amostras obtidas ao longo desse trabalho, destacamos alguns pontos a se ponderar. Primeiro, a raridade das amostras de fragmentos de córnea, tecido alvo da doença, as quais foram obtidas por procedimentos cirúrgicos e não apenas por coleta de sangue como ocorre na grande maioria de trabalhos sobre ceratocone que estão disponíveis na literatura, os quais abrangem diferentes populações mundiais. Também destacamos o desenvolvimento e adaptações das metodologias moleculares, utilizadas especificamente para tratar com amostras tão pequenas como os fragmentos de córnea, os quais são caracterizados pela baixa massa celular e grande quantidade de proteínas.

No segundo aspecto ressalta-se a dificuldade de se conseguir amostras de sangue para compor o grupo controle, pois os indivíduos que realizaram cirurgias apenas para correção refrativa, não se interessavam muito em doar o sangue para realização de pesquisas sobre uma doença a qual eles não possuem. Diferentemente com o que ocorre em países desenvolvidos, cujo recrutamento do voluntariado é mais fácil devido ao interesse da população em contribuir com a ciência.

O terceiro aspecto envolve a crise econômica e a falta de recursos públicos para a saúde, os quais ocorrem no país. Estes fatores dificultaram a obtenção de amostras de córnea ceratoconizadas, pois a grande parte dessas amostras de nossa casuística foram obtidas através de pacientes os quais arcaram com seus próprios recursos com o *Crosslinking* corneano, tratamento o qual não possuía as coberturas do

Sistema Único de Saúde (SUS) e dos convênios médicos. Apenas recentemente o Ministério da Saúde através da portaria nº 486 de 06 de março de 2017, aprovou o protocolo de uso da radiação para *Crosslinking* corneano no tratamento do ceratocone (disponível em <https://google.com.br/url?sa=t&source=web&rct=j&url=http://www.lex.com.br/legis_27321944_PORTARIA_N_486_DE_6_DE_MARCO_DE_2017.aspx> acesso em 07/02/2018).

Um fator muito relevante que despertou interesse para a realização deste projeto foi o fato de que o ceratocone ainda é muito pouco estudado no Brasil. De acordo com nossas buscas por trabalhos brasileiros pelos indexadores, encontramos apenas um trabalho de rastreamento mutacional envolvendo o gene *DOCK9* (REIS et al., 2016).

Nossos resultados, os quais já foram apresentados e discutidos nos manuscritos que compõem esta tese, não apresentaram nenhuma alteração genética patogênica nos genes abordados neste estudo. Nos genes *VSX1*, *SOD1* e *TIMP3* foram identificados apenas polimorfismos (SNPs) os quais resultam em trocas sinônimas de aminoácidos, polimorfismos intrônicos ou na região 5' UTR. Em relação ao gene *LOX*, não foram encontrados quaisquer polimorfismos em toda região codificante desse gene.

As análises foram realizadas de forma pareada, compreendendo a córnea e o sangue, e todos os polimorfismos identificados estavam presentes em ambos os tecidos, não configurando variações genéticas adquiridas.

Assim, sugerimos a continuidade dos estudos desses genes, bem como de outros relacionados à doença, em outras populações, através de sequenciamento de exomas, sequenciamento de moléculas de mRNA ou cDNA e análise de expressão gênica, metodologias as quais possam auxiliar na elucidação dos fatores genéticos envolvidos no surgimento do ceratocone. Além das análises genéticas, faz-se necessário também investigações aprofundadas sobre

aspectos ambientais e comportamentais, fatores estes que tanto influenciam na patogênese dessa anomalia ocular.

Finalmente, ressaltamos a importante contribuição deste trabalho para a pesquisa científica brasileira que abrange a área de oftalmologia, pois este é o primeiro estudo a realizar rastreamento mutacional envolvendo os genes *VSX1*, *SOD1*, *TIMP3* e *LOX*. Destacamos que este estudo é um dos pioneiros a realizar análises pareadas utilizando-se sangue e córnea, tanto em esfera nacional quanto internacional.

Informamos também que nosso grupo de pesquisa continuará investigando fatores genéticos os quais possam estar implicados no surgimento dessa complexa anomalia ocular em população brasileira, através de um projeto o qual já se encontra em andamento envolvendo expressão gênica por *arrays*, abrangendo 19 genes relacionados à estrutura e fisiologia da córnea, bem como genes envolvidos em processos inflamatórios desse tecido.

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. Intrasection 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-) 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.; RABEI, 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.; MORSCHAUER, 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.; MIRAFTEB, 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.; NANAIHA, 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.

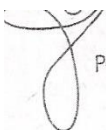
ZADNIK, K.; BARR, J.T.; EDRINGTON, T.B. et al. Baseline findings in the Collaborative Longitudinal Evaluation of Keratoconus (CLEK) Study. **Invest Ophthalmol Vis Sci.**, v. 39(13), p. 2537-2546, 1998.

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.

ANEXOS

Anexo 1: Autorização do Comitê de Ética em Pesquisa – CEP/FAMERP

 Comitê de Ética em
Pesquisa em Seres Humanos
CEP/FAMERP

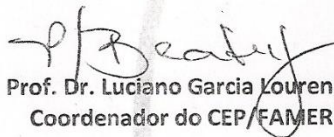
Parecer n.º 1.123.652

COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

O projeto de pesquisa CAAE 44071315.7.0000.5415 sob a responsabilidade de **Gildasio Castello de Almeida Junior** com o título "Avaliação dos Aspectos Tomográficos e dos Polimorfismos Genéticos VSX1, TIMP3, SOD1 em Pacientes com Ceratocone Comparado a Córneas Sadias" está de acordo com a resolução do CNS 466/12 e foi **aprovado por esse CEP.**

Lembramos ao senhor(a) pesquisador(a) que, no cumprimento da Resolução 251/97, o Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos (CEP) **deverá receber relatórios semestrais sobre o andamento do Estudo**, bem como a qualquer tempo e a critério do pesquisador nos casos de relevância, além do envio dos relatos de eventos adversos e também da notificação da data de inclusão do primeiro participante de pesquisa, para conhecimento deste Comitê. **Salientamos ainda, a necessidade de relatório completo ao final do Estudo.**

São José do Rio Preto, 25 de junho de 2015.


Prof. Dr. Luciano Garcia Lourenção
Coordenador do CEP/FAMERP

17 3201 5813
cepferp@famerp.br
Av. Brigadeiro Faria Lima 5416 | Vila São Pedro
15090-000 | São José do Rio Preto SP

Anexo 2: Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE)



“Avaliação dos aspectos tomográficos e dos polimorfismos genéticos *VSX1*, *TIMP3*, *SOD1* em pacientes com ceratocone comparado a córneas sadias”



FACULDADE DE MEDICINA DE SÃO JOSÉ DO RIO PRETO

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO
(Conselho Nacional de Saúde - Resolução CNS 466/12)

Você está sendo convidado(a) a participar de uma pesquisa denominada **“Avaliação dos aspectos tomográficos e dos polimorfismos genéticos *VSX1*, *TIMP3*, *SOD1* em pacientes com ceratocone comparado a córneas sadias”**, avaliado e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa – CEP – da Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto (parecer nº 1.123.652). O ceratocone é uma alteração na córnea, a qual fica mais curva formando um cone. Essa alteração tem relação com a transmissão hereditária e, portanto, pode ser herdada pelos genes. O avanço do ceratocone acarreta problemas oculares (danos na visão).

Essa pesquisa tem como objetivos identificar os fatores que favorecem o diagnóstico mais precoce possível por meio da tomografia de córnea (pentacam). O pentacam é um exame não invasivo, indolor e que não traz risco para a sua córnea. Além disso, será feita avaliação do sangue para estabelecermos quais genes podem estar associados com a progressão dessa doença. Os resultados desta pesquisa poderão ajudar-nos a compreender os fatores tomográficos e genéticos relacionados ao ceratocone podendo beneficiar você e muitas outras pessoas.

Se os resultados desta pesquisa inferir que exista fatores que possam contribuir no diagnóstico mais precoce eles poderão ajudar na adoção de medidas que possam reduzir o risco de progressão do ceratocone, bem como em relação às alterações genéticas. Com isso podemos realizar a orientação de programas de esclarecimento, educação, prevenção e mesmo tratamento do ceratocone.

A sua participação nessa pesquisa é voluntária e de extrema importância e você não perderá os benefícios do atendimento médico aos quais tem direito, caso decida não participar ou mesmo se você se retirar dessa pesquisa a qualquer tempo. Você poderá ter acesso a todos os seus dados coletados para esta pesquisa bem como aos resultados de todos os exames realizados nas amostras de seu sangue e terá também o direito de retirar a amostra ou quaisquer de seus dados de nosso banco de armazenamento de dados no momento em que você desejar. Em hipótese alguma seus dados serão divulgados de forma individual.

Para participar como voluntário nessa pesquisa será necessário:

1. Você responder um questionário sobre você e seus hábitos de vida. Todas as informações a seu respeito serão mantidas em absoluto sigilo.
2. Você nos autorizar a colher duas amostras de seu sangue para exames genéticos do ceratocone. A coleta de sangue é realizada com a introdução de uma agulha estéril na veia e de acordo com a sua sensibilidade, você poderá sentir uma leve ardência no local. O risco da coleta de sangue poderá incluir vermelhidão e raramente deixa o local de introdução da agulha inchado e com manchas roxas. O seu sangue será utilizado apenas para análises científicas e será estocado em um banco de amostras do Laboratório de Imunogenética, podendo ser utilizado para novas pesquisas, dentro de no máximo cinco anos. Quaisquer análises adicionais a serem realizadas em sua amostra de sangue deverão obrigatoriamente estar vinculadas ao presente projeto. Você deve saber que não haverá riscos de qualquer tipo de contaminação durante a coleta de seu sangue, pois o material utilizado será individual e não contaminado. Esse material é totalmente estéril (seringa, agulha, algodão com álcool) e único para cada pessoa. Após a coleta de seu sangue, as agulhas, seringas e algodão utilizados serão colocados em saco de lixo e descartados em local seguro. Esses procedimentos serão realizados por profissionais com experiência.



**“Avaliação dos aspectos tomográficos e dos polimorfismos genéticos
VSX1, TIMP3, SOD1 em pacientes com ceratocone comparado a
córneas sadias”**



FACULDADE DE MEDICINA DE SÃO JOSÉ DO RIO PRETO

3. Durante o procedimento do cross linking (pacientes com ceratocone) ou PKR (laser para correção de grau nos pacientes sem ceratocone) serão retiradas amostras de epitélio da córnea, que serão descartadas, solicitamos então você nos autorizar a utilizar esse material para as análises propostas.

Se for seu desejo, você será informada(o) de todos os resultados dos exames que serão realizados em seu sangue e eles serão mantidos em absoluto sigilo. Se essa pesquisa for encerrada antes do período previsto, você também será informada.

Caso ocorra danos de qualquer natureza durante a coleta de sua amostra de sangue, você receberá toda assistência médica gratuitamente.

Se você tiver qualquer dúvida sobre essa pesquisa ou mesmo sobre lesões relacionadas à coleta de sangue, entre em contato com o Prof. Dr. Gildásio Castello de Almeida Junior pelo telefone ou pelo endereço abaixo indicados. Caso você tenha qualquer dúvida sobre seus direitos como sujeito de pesquisa, você também pode entrar em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto, pelo telefone (17) 3201-5813. Você receberá uma cópia deste formulário de consentimento livre e esclarecido assinado e datado.

Declaração do sujeito da pesquisa

Eu voluntariamente aceito participar da pesquisa **“Avaliação dos aspectos tomográficos e genéticos dos pacientes com ceratocone comparado a córneas sadias”**. Autorizo a estocagem da amostra de meu sangue no banco de amostras do Laboratório de Imunogenética do Departamento de Biologia Molecular da Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto (FAMERP) e sua utilização para novas pesquisas vinculada a este projeto, desde que seja mantido o sigilo absoluto das informações por mim prestadas. Li e compreendi essa declaração de consentimento livre e esclarecido e os riscos descritos. Entendo que posso retirar meu consentimento ou retirar-me dessa pesquisa a qualquer momento, sem perder nenhum benefício aos quais tenho direito.

☐ Desejo saber os resultados de meus exames ☐ Não desejo saber os resultados de meus exames

....., de de

Responsável pela discussão do consentimento livre e esclarecido

Assinatura do sujeito da pesquisa ou seu representante legal

Pesquisador responsável

Anexo 3: Ficha Epidemiológica



“Avaliação dos aspectos tomográficos e dos polimorfismos genéticos *VSX1*, *TIMP3*, *SOD1* em pacientes com ceratocone comparado a córneas sadias”



FACULDADE DE MEDICINA DE SÃO JOSÉ DO RIO PRETO

FICHA DE DADOS EPIDEMIOLÓGICOS

Data da coleta:	Código da amostra:	Registro no centro coletor:
Nome:		
Local de Nascimento:		Idade:
Endereço atual:		Nº:
Cidade:	Estado:	Telefone:
Dados clínicos:	S	N Escala 0- 4 (0 rara/te)
Você tem habito de coçar os olhos?		
Você tem rinite alérgica?		Qual?
Você tem muitos episódios de conjuntivite alérgica?		
Você tem algum parente com ceratocone?		S- grau parentesco:
Você tem ou já teve animal domestico?		Qual?
Você já teve asma/bronquite?		Quando?
LC -		Quanto tempo você usa LC?
Qual tipo de LC		
Você já fez algum tipo de cirurgia nos olhos?		Qual?
Você faz uso de algum tipo de medicamento?		Qual? Quanto tempo?
Você usa algum colírio frequentemente?		Qual?
Você ronca a noite?		Se Sim – acorda com falta de ar
Você tem prolapso de válvula mitral?		Quando?
Você teve filho com algum tipo de síndrome?		Qual?
Você teve algum aborto		Quantos?
Você mora em zona: () urbana () rural		
Qual tipo de moradia: () alvenaria () madeira () outro especificar		
() própria () alugada () cedida () outro especificar		
Tem rede de esgoto: () sim () não Se não qual tipo? () fossa () outro especificar		
Você bebe água: () filtrada () fervida () torneira		
Qual é o seu nível de escolaridade?		
Qual é a renda familiar em salários mínimos? () 1 () 2 () 3 () 4 () acima de 4.		
Etnia: Paciente:	Pai:	Mãe:

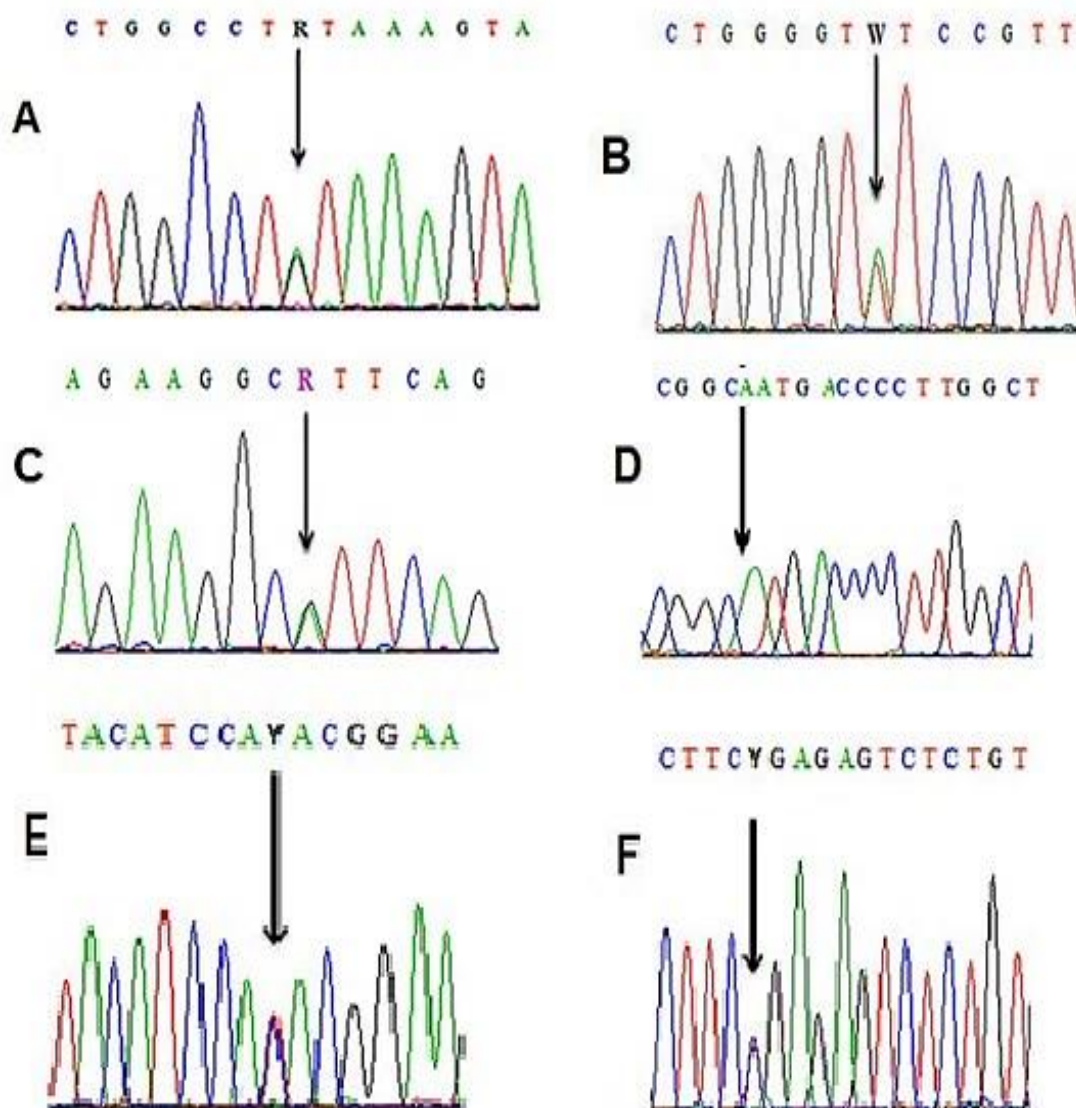
Obs.,

Anexo 4: Extração de DNA utilizando-se a técnica de fenol-clorofórmio para epitélio de córnea (adaptação)

Extração

- pegar o tubo que contém a amostra de epitélio em solução (H₂O MilliQ®), homogeneizar e centrifugar em alta rotação (14.000 rpm) por 5 minutos (caso houver fragmentos de epitélio na parede do tubo) e sedimentar a amostra;
- retire o excesso de solução com uma p1000
- adicione 400 µl do tampão de extração com uréia;
- adicione 20 µl de proteinase k e agite no vortex por 10 segundos;
- de um *spin* para sedimentar a amostra;
- incube a 37° C por 20 minutos;
- passe no vortex por 10 segundos e incube novamente por 10 minutos a 56°C;
- adicione 500 µl da solução de fenol-clorofórmio (1:1)
- agite no vortex por 20 segundos;
- incube novamente a 37° C por 20 minutos;
- centrifugue a 14.000 rpm por 5 minutos;
- colete o sobrenadante (aproximadamente 400 µl) para um novo microtubo de 1,5 ml estéril;
- adicione 40 µl de NaCl 3 M e 400 µl de álcool isopropílico;
- misture e centrifugue novamente a 14.000 rpm por 5 minutos;
- descarte o sobrenadante com cuidado mantendo o pellet no fundo do tubo;
- lave o pellet com 500 µl de etanol a 70%
- centrifugue novamente a 14.000 rpm por 5 minutos;
- descarte o etanol e seque o pellet a temperatura ambiente;
- dissolva o DNA em 50 µl de H₂O ultrapura (MilliQ®)

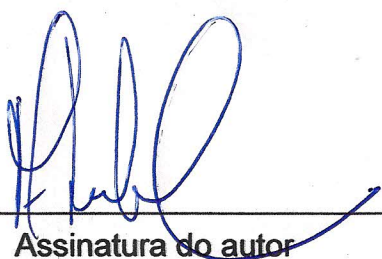
Anexo 5A-F: Eletroferogramas mostrando os SNPs (setas) encontrados nas sequências nucleotídicas das regiões codificantes dos genes. **A:** *SOD1* éxon 1 c.5040 A>G; **B:** *SOD1* éxon 1 c.5101 T>A; **C:** *VSX1* éxon 3 c.8222 A>G; **D:** *TIMP3* éxon 1 c.6186 A>G; **E:** *TIMP3* éxon 3 c.61479 C>T; **F:** *TIMP3* éxon3 c.61491 C>T.



TERMO DE REPRODUÇÃO XEROGRÁFICA

Autorizo a reprodução xerográfica do presente Trabalho de Conclusão, na íntegra ou em partes, para fins de pesquisa.

São José do Rio Preto, 16/ 03/ 2018



Assinatura do autor