



UNIVERSIDADE ESTADUAL DA PARAÍBA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA

DULCERIA COSTA DA SILVA

**ANÁLISE DE VARIANTES NO GENE *VSX1* EM PACIENTES PORTADORES DE
CERATOCONE**

CAMPINA GRANDE – PB

2017

DULCERIA COSTA DA SILVA

ANÁLISE DE VARIANTES NO GENE VSX1 EM PACIENTES PORTADORES DE CERATOCONE

Monografia apresentada ao curso de graduação em Ciências Biológicas da Universidade Estadual da Paraíba, em cumprimento à exigência para obtenção do Título de Bacharel em Ciências Biológicas.

Orientadora: Dra. Simone Silva dos Santos Lopes (UEPB)

Coorientador: Dr. Bruno Luiz Fonseca Schamber Reis (UNIFACISA)

CAMPINA GRANDE - PB

2017

É expressamente proibido a comercialização deste documento, tanto na forma impressa como eletrônica. Sua reprodução total ou parcial é permitida exclusivamente para fins acadêmicos e científicos, desde que na reprodução figure a identificação do autor, título, instituição e ano do Trabalho de Conclusão de Curso.

S586a Silva, Dulceria Costa Da.
Análise de variantes no gene *VSY1* em pacientes portadores de ceratocone [manuscrito] / Dulceria Costa da Silva. - 2017
67 p. : il. colorido.

Digitado.

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Ciências Biológicas) - Universidade Estadual da Paraíba, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, 2017.

"Orientação : Profa. Dra. Simone Silva dos Santos Lopes , Departamento de Biologia - CCBS."

"Coorientação: Prof. Dr. Bruno Luiz Fonseca Schamber Reis , FCM - Faculdade de Ciências Médicas de Campina Grande"

1. Ectasia corneana. 2. Cómea. 3. KTCN. 4. Mutação genética.

21. ed. CDD 576.5

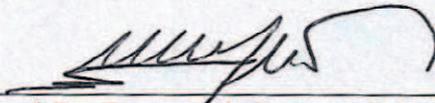
DULCERIA COSTA DA SILVA

ANÁLISE DE VARIANTES NO GENE *VSY1* EM PACIENTES PORTADORES DE
CERATOCONE

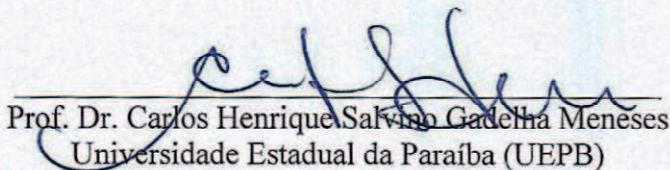
Trabalho de Conclusão de Curso apresentado
ao curso de Graduação em Ciências
Biológicas da Universidade Estadual da
Paraíba, como requisito parcial à obtenção do
Título de Bacharel em Ciências Biológicas.
Área de concentração: Genética Médica.

Aprovado em: 13/09/2017.

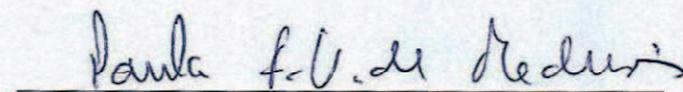
BANCA EXAMINADORA



Prof. Dr. Bruno Luiz Fonseca Schamber Reis
UNIFACISA



Prof. Dr. Carlos Henrique Salvino Gadelha Meneses
Universidade Estadual da Paraíba (UEPB)



Prof. Dr. Paula Frassinetti Vasconcelos de Medeiros
Universidade Federal da Campina Grande (UFCG)

A minha família e aos voluntários da pesquisa, DEDICO.

AGRADECIMENTOS

Infinitamente a Deus, por toda a misericórdia e paciência para comigo. Por ter sido meu guia, condição e capacidade até aqui.

A UNIFACISA pela oportunidade de desenvolver o projeto, bem como pela excelente estrutura e subsídios que proveu.

Ao querido orientador e mentor, Bruno Schamber, pelo privilégio de fazer parte do Núcleo de Genética Médica, pela confiança, constante acessibilidade e por todos os ensinamentos pessoais e profissionais. Sou imensamente grata e orgulhosa por ter sido sua orientanda!

Aos voluntários da pesquisa, nossa força motriz para a realização do trabalho.

Ao Dr. Diego Gadelha, Bianca Gadelha e Tarsila Paz, pela contribuição no âmbito clínico.

A Alex e a Rafaela pela contribuição experimental, paciência, dedicação e amizade de sempre.

A Geralda pela receptividade e carinho diários, a Fábio pela presteza nas coletas de sangue e a Iracema pela amizade, dedicação e impecável suporte técnico.

Aos professores Karina Saraiva, Simão Lindoso, Simone Lopes e Carlos Meneses, pela contribuição excepcional em minha formação. A Simone agradeço também a indicação para o estágio e a coorientação.

A Mallú – minha eterna dupla – pelo compartilhamento de madrugadas atarefadas, biscoitos, estresses, caronas...por quase ter me adotado e sobretudo pela amizade verdadeira! O agradecimento também se estende a Clara e Pedro pela paciência comigo e a Lúcia por ter sido uma mãe para mim.

A Bella pela paciência e companheirismo, principalmente no final do curso... a Mica pela luz e pela companhia nos congressos... Também a Paula, Carmem, Raony, Thayane e Swami. Agradeço a cada um pelos quatro anos e meio de amizade e paciência que tiveram comigo e pelos momentos incríveis que passamos juntos!

A Roberval por ter me convencido a falar sobre meus planos acadêmicos, que culminaram na indicação do estágio e a Igor Eloi pelos conselhos e apoio dados no início da realização deste projeto.

A Emanuene e Sara pela paciência, disponibilidade e irmandade.

A Marianne, Matias, Débora e Vinícius – minha família adotiva em Campina – pelo acolhimento, caronas para a igreja, conselhos e pelos momentos de descontração.

Aos demais amigos e anjos que a biologia e Campina Grande me apresentaram, bem como os que ficaram no Ceará e que certamente torceram muito por mim.

A toda a minha família, em especial a Jurani e Milca, por tudo o que vêm fazendo por mim e pela paciência que sempre tiveram.

Agradeço imensamente aos meus pais – Silvio e Gleide – e aos meus irmãos – Fernando, Silvia e Ana Késia – por todo apoio, sacrifícios, orações, pela paciência de ouvir as minhas reclamações e estresses e pelo amor incondicional.

A todos que, de alguma forma, contribuíram para a consolidação deste trabalho, meus sinceros agradecimentos. MUITO OBRIGADA!

Não que sejamos capazes, por nós, de pensar alguma coisa, como de nós mesmos; mas a nossa capacidade vem de Deus.

2 Coríntios, 3:5.

RESUMO

O ceratocone é uma doença ocular na qual a córnea adquire formato cônico em decorrência do afinamento e protrusão da sua porção central. Manifesta-se clinicamente como perda progressiva da acuidade visual, resultante do aumento da miopia e do astigmatismo irregular. O ceratocone é considerado uma doença complexa e multigênica, com penetrância incompleta e constitui a ectasia corneana mais comum, representando a principal causa de transplante de córnea no mundo. Dentre os vários genes considerados como envolvidos na doença, enfatiza-se *VSX1*, o qual codifica um fator de transcrição relacionado com a morfogênese craniofacial e com a recuperação do tecido corneano após traumas. Trabalhos anteriores têm mostrado resultados conflitantes quanto ao seu envolvimento no ceratocone, e não existem estudos buscando descrever variantes em *VSX1* na população brasileira. Neste sentido, este trabalho objetivou verificar se variantes em *VSX1* estão envolvidas com a patogênese do ceratocone em pacientes brasileiros. Foram analisados 174 indivíduos oriundos do Hospital da Visão e do serviço de Oftalmologia da Clínica Escola da faculdade de Ciências Médicas de Campina Grande, dos quais 73 possuíam diagnóstico clínico de ceratocone e 101 apresentavam córneas normais. Para a realização das análises moleculares, o DNA genômico foi extraído do sangue periférico dos probandos e dos voluntários e os cinco éxons do gene *VSX1* foram amplificados por PCR e sequenciados. Foram encontradas sete variantes em resíduos conservados de *VSX1*, sendo quatro de sentido trocado (L68H, D105E, R131S e G160D) e três sinônimas (S6S, P79P e G113G). Destas, L68H e P79P ainda não foram descritas em trabalhos anteriores. A variante L68H, assim como as variantes sinônimas, foi verificada apenas em pacientes ceratocônicos, enquanto D105E e R131S foram identificadas tanto em ceratocônicos quanto em indivíduos normais, os quais haviam declarado possuir familiares afetados com a doença. Análises *in silico* sugeriram que, exceto a G160D, todas as variantes não-sinônimas possuem potencial patogênico. Também foi verificado um paciente portador simultâneo das variantes L68H e R131S, que apresentou ceratocone bastante avançado, sugerindo que há atuação sinérgica destas variantes no agravamento da doença. Desta forma, os resultados obtidos indicam que as variantes L68H, D105E e R131S podem estar diretamente envolvidas na patogênese do ceratocone.

Palavras-chave: Ectasia corneana. Córnea. *KTCN*. Mutação genética.

ABSTRACT

Keratoconus is an ocular disease in which cornea acquires conical shape due to thinning and protrusion of its central portion. It manifests clinically as progressive loss of visual acuity resulting from increase of myopia and irregular astigmatism. Keratoconus is considered a complex and multigenic disease with incomplete penetrance and constitutes the most common corneal ectasia, representing the main cause of corneal transplantation in the world. Among the several genes considered to be involved in the disease, *VSX1* is emphasized, which encodes a transcription factor related to craniofacial morphogenesis and recovery of corneal tissue after trauma. Previous studies have shown conflicting results regarding *VSX1* involvement in keratoconus, and no previous studies describing gene variants in Brazilian population were performed. In this sense, this work aimed to verify if variants in *VSX1* are involved with the pathogenesis of keratoconus in Brazilian patients. A total of 174 individuals from the Vision Hospital and Ophthalmology service of the Clinic School of the School of Medical Sciences of Campina Grande were analyzed, of which 73 had a clinical diagnosis of keratoconus and 101 showed a normal corneas. For *VSX1* gene analysis, genomic DNA was extracted from peripheral blood of the probands and volunteers and its five exons of *VSX1* gene were amplified by PCR and sequenced. Seven variants were found in highly conserved *VSX1* residues, four of which were missense variants (L68H, D105E, R131S and G160D) and three were synonymous variants (S6S, P79P and G113G). Of these, L68H and P79P were not described in previous studies. L68H, as well as synonymous variants, were verified only in keratoconic patients, whereas D105E and R131S were identified in both keratoconic and normal individuals, which had been reported to have relatives affected with the disease. *In silico* analysis showed that except for G160D, all non-synonymous variants are potentially pathogenic to *VSX1* function. One patient carrying both L68H and R131S variants presented advanced keratoconus, suggesting a synergistic action of both alterations, contributing to the worsening of the disease. Thus, the obtained results support that variants L68H, D105E and R131S may be directly involved in the pathogenesis of keratoconus.

Keywords: Corneal ectasia. Cornea. *KTCN*. Genetic mutation.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: Esquema representando as camadas anatômicas da córnea.....	18
Figura 2: Ceratoglobo.....	21
Figura 3: Degeneração marginal pelúcida.....	22
Figura 4: Ceratocone.....	24
Figura 5: Topografia de córnea evidenciando os principais índices topográficos utilizados para diagnóstico.....	27
Figura 6: Localização citogenética do gene <i>VSX1</i>	34
Figura 7: Estrutura do gene <i>VSX1</i>	34
Figura 8: Eletroferogramas evidenciando as variantes não-sinônimas identificadas no trabalho.....	45
Figura 9: Gel de agarose 1% evidenciando o padrão de bandas da variante D105E após digestão com enzima <i>HpyCH4IV</i>	46
Figura 10: Gel de agarose 1% evidenciando o padrão de bandas da variante R131S após tratamento com a enzima <i>EaeI</i>	46
Figura 11: Alinhamento múltiplo da sequência de aminoácidos de <i>VSX1</i> de diferentes espécies.....	49
Figura 12: Heredograma - família 1.....	52
Figura 13: Heredograma - família 2.....	53

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Descrição dos oligonucleotídeos iniciadores utilizados para realização das PCRs..	38
Tabela 2: Caracterização dos grupos quanto à sexo e idade.....	42
Tabela 3: Caracterização dos grupos quanto aos índices topográficos.	42
Tabela 4: Variantes alélicas encontradas no estudo.	44
Tabela 5: Resultados da predição do impacto das variantes avaliados nas plataformas PolyPhen-2, SIFT e PMUT.	48
Tabela 6: Dados topográficos dos indivíduos pertencentes às famílias que participaram da construção dos heredogramas.....	51

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

D	Dioptria
DNA	<i>Desoxirribonucleic acid</i> (Ácido desoxirribonucleico)
EDTA	<i>Ethylenediamine tetracetic acid</i> (Ácido etilenodiamino tetra-acético)
MEC	Matriz Extracelular
MMP	<i>Matrix metalloproteinases</i> (Metaloproteinasas de matriz)
pb	Pares de base
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i> (Reação em cadeia da polimerase)
RFLP	<i>Restriction Fragment Length Polymorphism</i> (Polimorfismo no comprimento de fragmentos de restrição)
ROS	<i>Reactive Oxygen Species</i> (Espécies Reativas de Oxigênio)
SNP	<i>Single Nucleotide Polymorphism</i> (Polimorfismo de Nucleotídeo Simples)
T _m	<i>Melting temperature</i> (Temperatura de desnaturação)
TIMP	<i>Tissue Inhibitors of Metalloproteinases</i> (Inibidores teciduais de metaloproteinasas)
UV	Ultravioleta

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	14
2 OBJETIVO.....	16
2.1 OBJETIVO GERAL.....	16
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	16
3 REFERENCIAL TEÓRICO	17
3.1 CÓRNEA.....	17
3.1.1 Ectasias corneanas.....	19
3.2 CERATOCONE	23
3.2.1 Epidemiologia	25
3.2.2 Diagnóstico	25
3.2.3 Intervenções e tratamentos.....	28
3.2.4 Etiologia.....	28
3.2.5 Gene <i>VSX1</i>.....	33
4 JUSTIFICATIVA.....	35
5 MATERIAL E MÉTODOS.....	36
5.1 ASPECTOS ÉTICOS	36
5.2 AMOSTRAGEM.....	36
5.3 CRITÉRIOS DE INCLUSÃO	36
5.4 DIAGNÓSTICO	36
5.5 MATERIAL BIOLÓGICO	37
5.6 ANÁLISES MOLECULARES	37
5.6.1 Extração de DNA.....	37
5.6.2 Reação em Cadeia de Polimerase (PCR).....	37
5.6.3 Purificação do DNA e sequenciamento.....	39
5.6.4 RFLP-PCR	39
5.7 BIOINFORMÁTICA	40

5.7.1 Análise das sequências	40
5.7.2 Predição do potencial patogênico das variantes	40
6 RESULTADOS.....	41
6.1 CARACTERIZAÇÃO DOS GRUPOS.....	41
6.2 ANÁLISES MOLECULARES	43
6.3 PREDIÇÃO DO IMPACTO DAS VARIANTES NA ESTRUTURA DA PROTEÍNA	47
6.4 ANÁLISES FAMILIARES.....	50
7 DISCUSSÃO.....	54
8 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	59
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	61

1 INTRODUÇÃO

O ceratocone é uma doença ocular crônica, caracterizada pela protrusão da porção central da córnea e afinamento de sua espessura, conseqüentemente acarretando depleção progressiva da acuidade visual. Constitui a ectasia corneana mais comum, com prevalência entre 8 a 55 por 100.000 e incidência em torno de 1:2000, a depender dos métodos e critérios de diagnóstico utilizados, bem como de acordo com o grupo étnico (JEYABALAN, 2013).

A doença pode afetar indivíduos de ambos os sexos e geralmente aparece durante a puberdade, progredindo durante duas ou três décadas, quando tende a se estabilizar ou, em casos extremos, pode levar à cegueira. Por conseguinte, o ceratocone causa grande impacto na saúde pública, visto que além de afetar a qualidade de vida dos indivíduos por toda a vida adulta, representa a principal causa de transplante de córnea nos países ocidentais (GOMES, 2015; LECHNER, 2013; WHEELER, 2012).

Embora tenha sido descrito há mais de 150 anos e nas últimas décadas tenha havido grandes avanços no que se trata de acurácia dos métodos de diagnóstico e manejo da doença, os mecanismos fisiopatológicos envolvidos no desenvolvimento e progressão do ceratocone ainda não são completamente conhecidos. Considera-se que ele seja uma doença multifatorial e multigênica e que mutações específicas em determinados genes estejam relacionadas a graus variáveis da doença (GOMES, 2015; WHEELER, 2012).

Um dos genes mais enfatizados nos estudos e que em muitos casos é relatado como envolvido no desenvolvimento do ceratocone é *VSX1* (*Visual System Homeobox 1*). Seu produto é um fator de transcrição que regula a expressão dos genes envolvidos no desenvolvimento craniofacial durante a embriogênese e que também é essencial para a manutenção e proliferação das células corneanas adultas, podendo ser expresso durante os processos de reparo quando a córnea sofre alguma injúria (BARBARO, 2006; GORDON-SHAAG, 2015).

Desta forma, observa-se que variantes neste gene podem ser a causa de um comportamento anômalo das estruturas corneanas e, de alguma forma convergir para o fenótipo de ceratocone. Contudo, embora o gene *VSX1* tenha sido relacionado com ceratocone desde o início dos anos 2000 e haja constância em pesquisas a este respeito, sua relação efetiva com o desenvolvimento da doença não foi completamente esclarecida. Por este motivo, acreditamos que este trabalho possa contribuir para o esclarecimento da influência de variantes em *VSX1* no desenvolvimento de ceratocone. Além disso, devido à extrema escassez

de dados sobre genética no ceratocone no Brasil, o presente trabalho representa uma das primeiras fontes de resultados experimentais em nossa população, sendo o primeiro a tratar do gene *VSX1*.

2 OBJETIVO

2.1 OBJETIVO GERAL

Verificar a presença de variantes no gene *VSX1* e sua relação com o ceratocone humano.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Selecionar pacientes com diagnóstico clínico de ceratocone;
2. Sequenciar a região exônica do gene *VSX1* em pacientes portadores de ceratocone;
3. Realizar PCR-RFLP para confirmação das variantes encontradas no gene *VSX1*;
4. Predizer o impacto das variantes não-sinônimas na função da proteína *VSX1*;
5. Construir os heredogramas de famílias informativas obtidas no projeto.

3 REFERENCIAL TEÓRICO

3.1 CÓRNEA

A córnea é a estrutura mais anterior do olho e consiste em uma lente transparente e curva que, conjuntamente com a esclera, compõem a túnica fibrosa ocular. Tais características – transparência e curvatura – garantidas pela composição rica em colágeno e proteoglicanos, promovem a focalização inicial da luz pelo olho. Além de ser uma das principais estruturas oculares envolvidas na refração da luz, a córnea também atua como barreira de proteção contra influências externas e é responsável pela filtração de parte dos raios ultravioleta presentes na luz solar (MICHELACCI, 2013; WILSON & LAST, 2004). Anatomicamente, pode ser dividida em cinco camadas: epitélio, camada de Bowman, estroma, membrana de Descemet e endotélio, como mostra a Figura 1.

O epitélio corneano constitui a superfície anterior da córnea, que encontra-se em contato com o filme lacrimal. Trata-se de um epitélio estratificado pavimentoso não-queratinizado. Como característica deste tipo de tecido, as células são firmemente aderidas e desempenham função de proteção, já que são a principal barreira que separa o organismo do ambiente externo. O epitélio pode ainda ser subdividido em três camadas: a mais profunda (camada de células basais) é a única capaz de sofrer mitose, sendo responsável pela renovação celular e manutenção do epitélio. Uma vez que estas células avançam no processo de maturação e ocorre o processo de descamação formam-se as outras camadas: intermediária ou de células aladas e camada superficial ou escamosa (ARAUJO & GOMES, 2015). Posteriormente ao epitélio está a camada de Bowman, uma estrutura acelular, composta por um condensado de material produzido pelas células presentes no estroma. Dentre outras funções, atua como suporte para a organização do epitélio e constitui o limite que separa o epitélio do estroma (DELMONTE & KIM, 2011).

O estroma compõe a maior parte da estrutura da córnea, constituindo cerca de 80% a 90% da sua espessura. O tipo celular mais representativo da córnea, chamado de ceratócito, está presente nesta camada. Estas células são tipos de fibroblastos que secretam colágeno e outras substâncias da matriz extracelular, tais como glicoproteínas e proteoglicanos. Assim, o estroma corneano desempenha um papel crucial para assegurar a forma, estabilidade e resistência mecânica da córnea (ARAUJO & GOMES, 2015; DELMONTE & KIM, 2011).

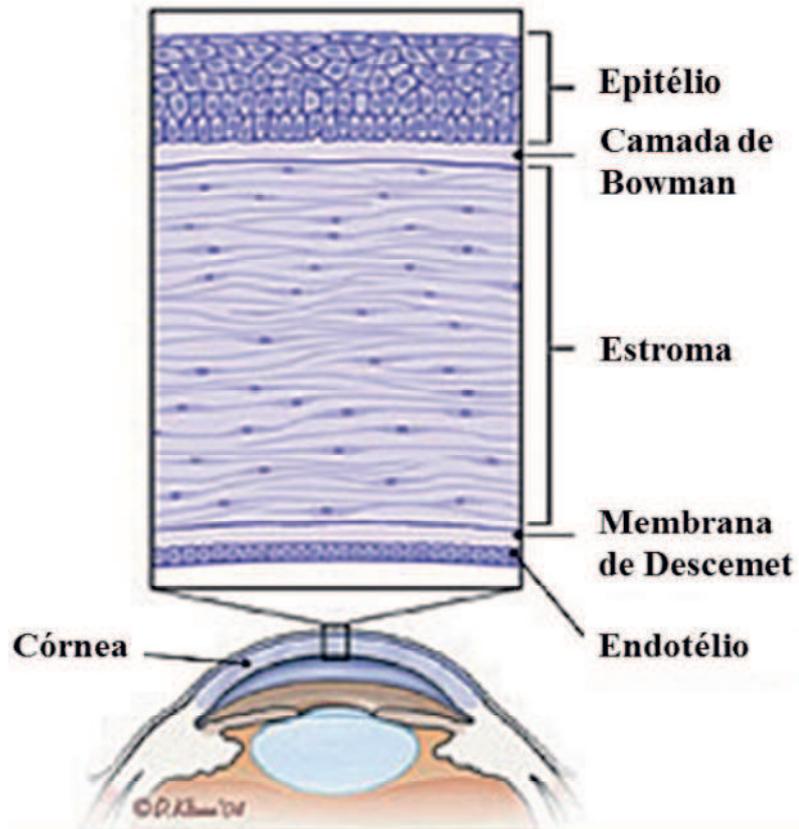


Figura 1: Esquema representando as camadas anômicas da córnea. Fonte: Adaptado de Wilson & Last, (2004).

A membrana de Descemet é uma fina lâmina basal secretada pelo endotélio, composta por uma trama de fibrilas de colágeno. É frouxamente ligada ao estroma, sem nenhuma junção mecânica específica (BINDER, 1991; JOHNSON, 1982). Posteriormente há o endotélio, um epitélio poligonal simples não-proliferativo que forma a superfície corneana posterior e desempenha papel fundamental na regulação do metabolismo corneano (ARAÚJO & GOMES, 2015).

A matriz extracelular (MEC) secretada pelas células de tecido conjuntivo consiste em uma mistura de componentes de natureza fibrilar (tais como colágeno, elastina e laminina), não-fibrilar (proteoglicanos e glicoproteínas), microfibrilar (microfibrilas associadas ao colágeno e à elastina) e enzimas de reciclagem de matriz (tais como as metaloproteinases). A MEC confere as propriedades mecânicas e estruturais dos tecidos, além de influenciar no comportamento celular (SOUSA & PINHAL, 2011). O principal componente proteico da MEC corneana é o colágeno, especialmente do tipo IV. Em mamíferos, esta molécula é presente em membranas basais, conferindo a estas estruturas uma maior capacidade de resistência a trações. No tecido corneano, o colágeno IV é secretado pelos ceratócitos estando, portanto, distribuído principalmente no estroma, embora seja também encontrado em menores quantidades na camada de Bowman e membrana de Descemet (CUMMINGS, 2016).

Cabe citar ainda que a córnea é uma estrutura avascular que depende dos nutrientes presentes no humor aquoso e no filme lacrimal para manutenção de seu metabolismo, bem como das características do microambiente do entorno para homeostase. Sua estabilidade e funcionamento dependem tanto das características biomecânicas conferidas pelos componentes estruturais supracitados quanto de fatores ambientais, de forma que quando há um desequilíbrio em pelo menos um destes fatores, é possível o estabelecimento de alguma ectasia corneana (DELMONTE & KIM, 2011).

3.1.1 Ectasias corneanas

Ectasias são definidas como doenças caracterizadas por dilatação ou distensão de alguma estrutura (GOMES, 2015). As ectasias corneanas compõem um grupo de doenças caracterizadas por afinamento, protrusão e conseqüente distorção da superfície da córnea, estando isentas de qualquer processo inflamatório. São incluídas neste grupo o ceratoglobo, a degeneração marginal pelúcida e o ceratocone (MAHARANA, 2016). Ainda não há consenso se estas três condições são doenças distintas ou apenas variações fenotípicas de uma mesma patologia (JINABHAI, 2011).

O ceratoglobo (Figura 2) é uma condição rara, caracterizada por afinamento difuso e protusão globular da córnea, que se acentua na periferia. Assim como o ceratocone, também manifesta-se como miopia e astigmatismo, levando à perda da acuidade visual (FECAROTTA & HUANG, 2014; WALLANG & DAS, 2013). São vistos tanto casos congênitos quanto adquiridos, porém sua etiologia e patogênese não são claras, embora possam estar associadas a deficiências na produção de colágeno, tendo em vista que a doença pode estar acompanhada de condições que se estabelecem a partir de deficiências no tecido conjuntivo, como é o caso das síndromes de Eblers-Danlos e de Marfan, hiperflexibilidade articular e *osteogenesis imperfecta*. Estas deficiências também podem ser vistas em associação ao ceratocone. Um ponto crucial para considerar que o ceratoglobo seja uma doença à parte é que, ao contrário do ceratocone, o desenvolvimento do ceratoglobo não está associado a atopia, ao uso de lentes de contato ou fricção ocular, que são os principais fatores ambientais supostamente envolvidos com a manifestação do ceratocone (FECAROTTA & HUANG, 2014).

A degeneração marginal pelúcida (Figura 3) é caracterizada por apresentar uma protusão cônica que geralmente ocorre na porção inferior da córnea, embora mais raramente possa afetar os quadrantes superior, nasal e temporal da córnea. A doença manifesta-se inicialmente entre a segunda e terceira década de vida, porém não existem indícios de ser hereditária (JINABHAI, 2011).

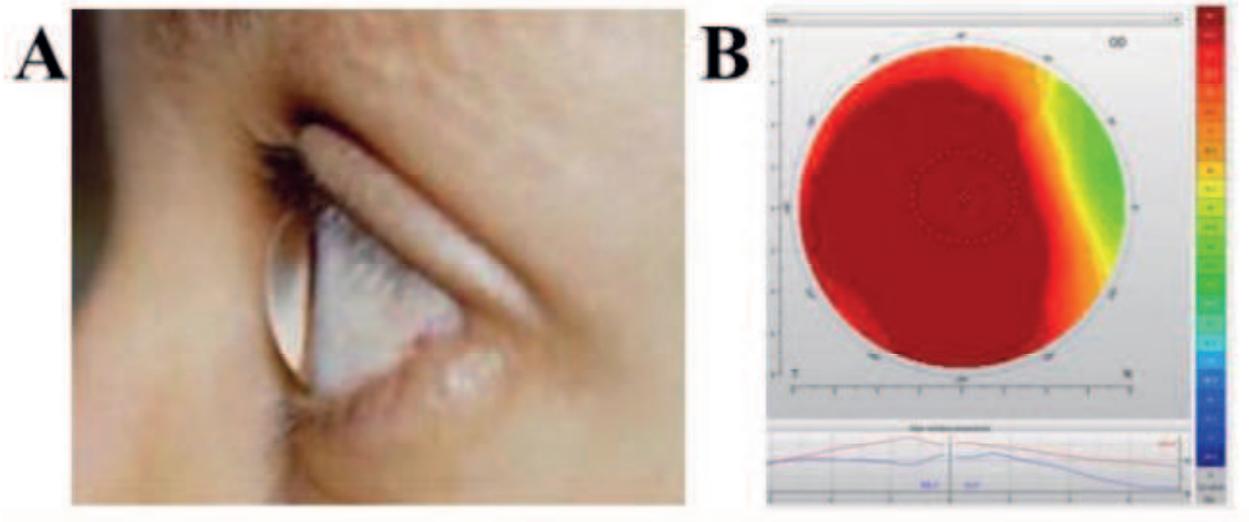


Figura 2: Ceratoglobo. Aspecto visual **(A)** e topografia de córnea **(B)**. Fonte: Adaptado de Fecarotta & Huang, 2014.

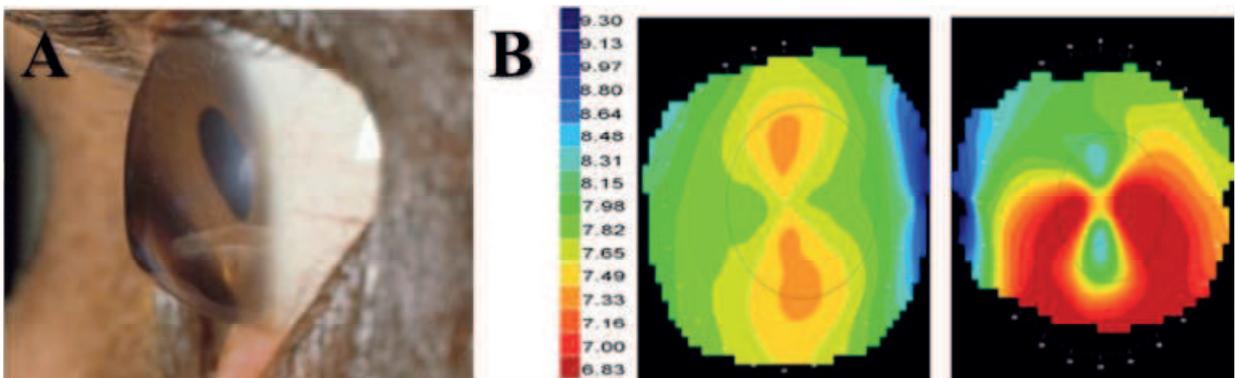


Figura 3: Degeneração marginal pelúcida: Aspecto visual (A) e topografia de córnea comparando um olho normal (à esquerda) e um olho afetado (à direita) (B). Fonte: Adaptado de Jinabhai (2011).

3.2 CERATOCONE

O ceratocone (Figura 4) é um termo utilizado para descrever uma afecção ocular caracterizada por afinamento e protrusão da córnea com astigmatismo irregular e consequente diminuição na acuidade visual. É considerada uma doença multifatorial e multigênica, na qual os elementos genéticos atuam de modo complexo com muitos fatores ambientais e condições sistêmicas, o que pode conduzir a fenótipos heterogêneos da doença (JEYABALAN, 2013). Após uma evolução silenciosa, os primeiros sintomas da doença são vistos na adolescência, quando geralmente ocorre o diagnóstico, e se agravam progressivamente até a terceira ou quarta década de vida, onde geralmente se estabilizam (ROMERO-JIMÉNEZ, 2010, WHEELER, 2012).

A doença é uma das principais patologias que afetam o segmento ocular anterior e constitui a principal causa de transplante de córnea nos países desenvolvidos. No Brasil, este padrão também é acompanhado, como é demonstrado pelos trabalhos publicados por Adam Netto (2014), Brito & Veitzman (2000), Calix Netto (2006), Cattani (2002), Cavalcanti (2004) e Flores (2007). A etiologia da doença vêm sendo estudada por diversos grupos, porém permanece desconhecida. No entanto, são elencados diversos fatores ambientais e genéticos que podem estar envolvidos com a doença, tendo em vista sua heterogeneidade nos aspectos clínico, bioquímico, genético e epidemiológico.

Quando se trata de patobiologia, a dificuldade de mais esclarecimentos pode ser decorrente do fato de os esforços das pesquisas serem voltados a pacientes que exibem um estágio da doença relativamente avançado, no qual é possível que os mecanismos primários da patologia sejam confundidos com sinais secundários, tais como inflamações ou efeitos degenerativos. Assim como não é descartado que o o fenótipo clínico observado no ceratocone possa ser uma via final comum a diferentes processos patológicos (DAVIDSON, 2014; SHERWIN & BROKES, 2004).

Análises histopatológicas mostram que o epitélio pode sofrer degeneração das suas células basais, acompanhado pelo pouco desenvolvimento da camada de Bowman, que também pode apresentar rompimentos e erupções na organização das fibras colágenas (RABINOWITZ, 1998; SHERWIN & BROKES, 2004). No estroma, as principais características são a compactação e perda no arranjo das fibrilas, diminuição do número de lamelas, além da possibilidade de degeneração dos ceratócitos. As duas camadas posteriores são, geralmente as menos afetadas: a membrana de Descemet só é afetada em casos de hidrópsia aguda e o endotélio geralmente é normal (RABINOWITZ, 1998).

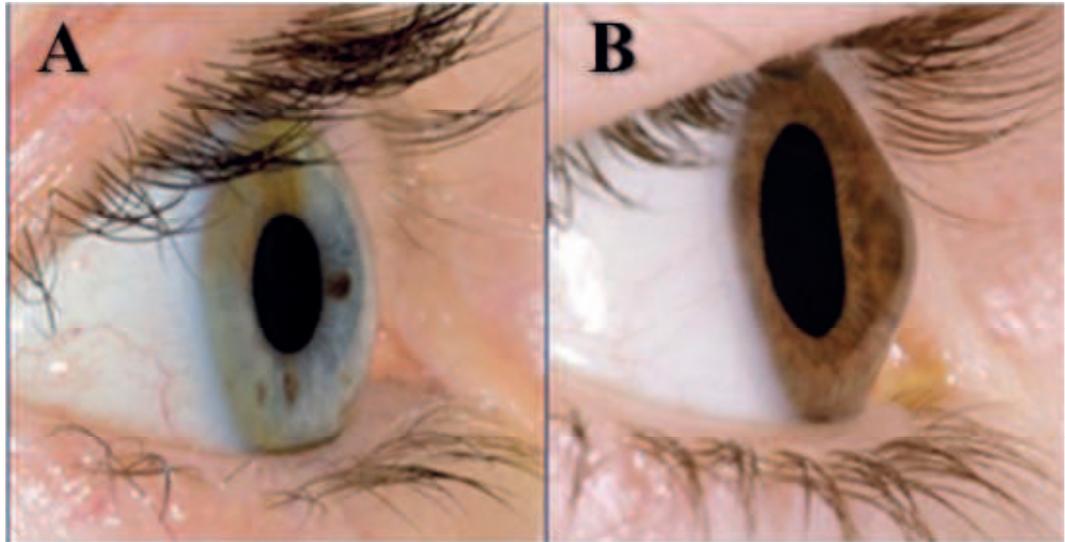


Figura 4: Ceratocone: Fenótipo característico de uma córnea normal (A) e protrusão corneana característica da doença (B). Fonte: Keratoconus NZ. Disponível em: <http://www.kcnz.co.nz/what-is-keratoconus.html>. Acessado em 20 jan. 2017.

3.2.1 Epidemiologia

Os dados epidemiológicos do ceratocone no mundo ainda são escassos e inconclusivos, este último pode ser atribuído, em parte à falta de padronização dos métodos e critérios utilizados para diagnóstico (GALVIS, 2015). Os levantamentos mostram que doença afeta tanto homens quanto mulheres. Contudo, não se pode concluir se há tendência de afetar majoritariamente um ou outro, visto que trabalhos publicados nos últimos 40 anos apresentam resultados conflitantes (GORDON-SHAAG, 2015).

Estudos de incidência e prevalência da doença apresentam resultados distintos nas diferentes populações já estudadas. Os dados relativos à incidência variam entre 1,3 a 25 por 100.000 e à prevalência variam entre 0,3 por 100.00 a 2.500 por 100.000 (GALVIS, 2015; VAZIRANI & BASU, 2013). Embora ainda não haja consenso sobre a relação de ancestralidade ou influências étnicas com o desenvolvimento de ceratocone, alguns estudos apontam que a doença tem prevalência três vezes maior em indivíduos caucasianos do que em japoneses (TANABE, 1987). Outros estudos considerando caucasianos e asiáticos (indianos, paquistaneses e bangaleses) apontaram que os asiáticos têm entre 4,4 e 7,5 vezes mais tendência de desenvolver a doença, que também se manifesta de modo mais severo. Esta preponderância tem sido associada a elevados casos de consanguinidade neste grupo (GEORGEOU, 2004; PEARSON, 2000). Em um artigo de revisão, Gordon-Shaag (2015) sumariza os resultados das principais pesquisas que apresentam dados epidemiológicos e relata que a interpretação dos dados deve ser feita cuidadosamente, visto que muitos dos métodos de diagnóstico utilizados nos estudos podem não ser adequados.

Embora a doença seja vista como uma deficiência isolada na maioria dos casos, uma fração considerável dos pacientes pode apresentar ceratocone associado a outras condições sindrômicas ou anormalidades cromossômicas – tais como Síndrome de Down, Síndrome de Turner, Síndrome de Marfan, Síndrome de Ehlers-Danlos e Síndrome de Apert – e afecções oculares, tais como catarata, amaurose congênita de Leber e outras distrofias da retina e da córnea, tais como distrofia corneana amorfa posterior (BONIS, 2011; BURDON & VICENT, 2013).

3.2.2 Diagnóstico

O ceratocone pode ser diagnosticado com base em várias características clínicas, identificáveis a depender do estágio da doença, dentre as quais está a presença de anéis de deposição de ferro ao redor da base do cone (anel de Fleischer), estrias estromais (estrias de Vogt), reflexo “em gota de óleo” (sinal de Charleux), abaulamento da pálpebra inferior em

foma de “V” quando o paciente olha para baixo (sinal de Munson), bem como eventos de hidrópsia e cicatrização (VAZIRANI & BASU, 2013). Contudo, atualmente o padrão-ouro para diagnóstico consiste na topografia de córnea, também chamada de videoceratografia. Tal método se baseia na obtenção de mapas da superfície corneana externa, utilizando o sistema de cores para representar os níveis de elevação e curvatura, onde cores quentes (alaranjado e vermelho) representam zonas mais elevadas, cores frias (tons de roxo e azul) referem-se a regiões mais planas e tons de verde representam regiões intermediárias (Figura 5). Além da representação cromática das características da superfície corneana, a topografia permite sua mensuração matemática dos seus critérios geométricos, possibilitando diferenciar de modo preciso os padrões topográficos em córneas saudáveis de córneas acometidas por patologias de ordem ectática (CARVALHO, 2005; CAVAS-MARTINEZ, 2016).

Córneas acometidas por ceratocone apresentam três características marcantes que as diferenciam de córneas normais. A primeira é uma área geralmente na porção central ou inferior onde há um aumento no poder refrativo, rodeada por áreas concêntricas de potência decrescente, a segunda é a assimetria entre o poder refrativo dos meridianos inferior e superior e a terceira é o astigmatismo irregular, que representa a presença de irregularidades na superfície da córnea decorrente da sua hiperprolação. (RABINOWITZ, 1998).

De modo a padronizar o diagnóstico do ceratocone, foi estabelecido uma série de critérios de diagnóstico baseados em índices topográficos da córnea. O mais utilizado estabelece um critério de diagnóstico que considera como portadores pacientes que apresentam córneas com ceratometria central (K) maior que 47,20 dioptrias (D), curvatura da córnea inferior comparada à da córnea superior (I-S) maior que 1,20 D e mudança do eixo radial do astigmatismo (astigmatismo irregular, ou SRAX) maior que 21 graus (RABINOWITZ 1995). Um outro índice, denominado KISA, se baseia no cálculo conjunto da ceratometria central (K), índice (I-S), o astigmatismo regular (AST) e valor de SRAX (RABINOWITZ, 1999). A fórmula de cálculo está apresentada abaixo:

$$\text{KISA\%} = \frac{\text{K} \times \text{I-S} \times \text{AST} \times \text{SRAX} \times 100}{300}$$

Como resultado, um índice KISA maior que 100% é obtido de córneas que possuem ceratocone clinicamente detectável, valores entre 60% e 100% são considerados como casos suspeitos e valores abaixo de 60% são obtidos em olhos normais (RABINOWITZ, 1999; SEDGHHIPOUR, 2012).

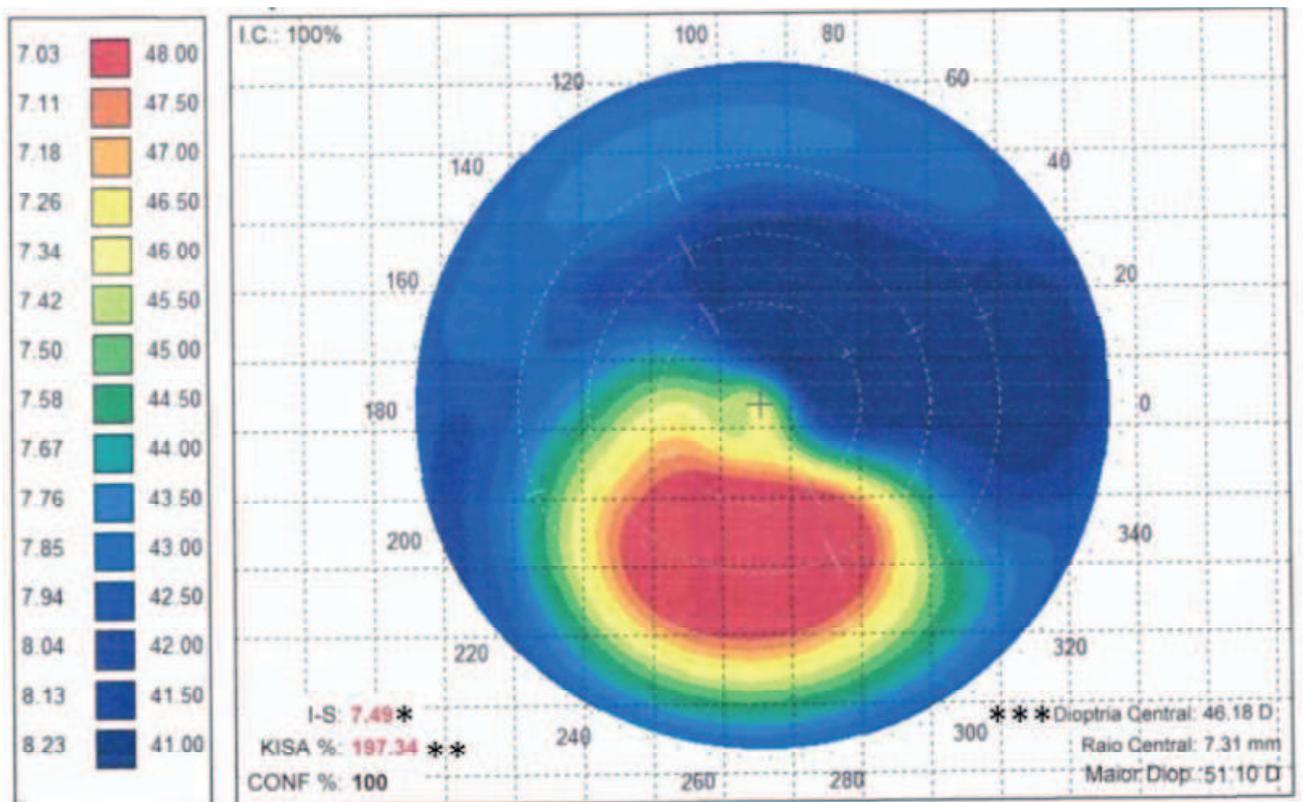


Figura 5: Topografia de córnea evidenciando os principais índices topográficos utilizados para diagnóstico. I-S (*), KISA () e a ceratometria central (***). Fonte: Acervo próprio.**

3.2.3 Intervenções e tratamentos

Ainda não há cura para a doença, porém algumas intervenções são recomendadas no intuito de estabilizá-la ou retardar a sua progressão. Tais intervenções são definidas de acordo com o grau de severidade e evolução clínica de cada paciente. Em casos mais leves, recomenda-se o uso de óculos. Em estágios intermediários, utiliza-se lentes de contato gelatinosas e, caso não seja viável, opta-se por lentes rígidas gás-permeáveis. Adicionalmente, recomenda-se a implantação de anéis intracorneanos ou o *cross-linking* corneano. A introdução de anéis acrílicos na córnea pode aumentar a regularidade de sua curvatura, auxiliando na adaptação às lentes de contato e na reabilitação visual, enquanto o *cross-linking* combina o uso de riboflavina e radiação UV para aumentar a formação de ligações covalentes entre as moléculas de colágeno, aumentando a resistência da córnea (ERTAN & COLIN, 2007; MASTROPASQUA, 2015).

Nos casos mais graves, nos quais nenhuma das alternativas acima são eficientes para a melhoria da qualidade visual, o último recurso possível é o transplante de córnea, também chamado ceratoplastia. Nesta técnica, é realizada uma intervenção cirúrgica que consiste na remoção do tecido corneano deficiente, seguida pelo enxerto de uma córnea doada por um indivíduo saudável. É possível que haja a remoção total do tecido corneano, cuja ceratoplastia é dita penetrante, ou apenas uma remoção parcial, chamada lamelar. Embora apresente resultados eficazes na grande maioria dos pacientes, em uma parcela considerável dos pacientes esta técnica não apresenta resultados definitivos, pois mesmo após o transplante, seja ele penetrante ou lamelar, é possível que ao longo dos anos haja recorrência da doença (ARNALICH-MONTIEL, 2016).

3.2.4 Etiologia

É bem estabelecido que o ceratocone tem etiologia complexa, contando com envolvimento de fatores ambientais que atuam potencializando a doença caso haja uma predisposição genética (GALVIS, 2015).

Os fatores de risco ambientais têm sido extensamente estudados e buscam auxiliar no diagnóstico e na identificação de indivíduos susceptíveis. Embora os resultados nem sempre sejam conclusivos, os fatores que têm tido maior destaque pela sua influência são: fricção ocular, uso de lentes de contato, hipersensibilidade alérgica e exposição à radiação UV. A determinação da contribuição relativa de cada um dos fatores supracitados ainda é desconhecida, visto que em muitos casos há uma relação direta entre eles (GORDON-SHAG, 2012; NADERAN, 2015).

Diversos estudos vêm mostrando uma relação direta entre o ato de friccionar os olhos cronicamente com o ceratocone. Diversos trabalhos provêm evidências de que o microtrauma causado pela fricção vigorosa além de danificar mecanicamente a córnea, estimula a expressão de proteases que degradam os componentes da matriz extracelular, bem como aumenta a expressão mediadores de inflamação. Todavia, alguns autores não consideram a fricção ocular como um fator de risco efetivo para o desenvolvimento do ceratocone quando isoladamente (GORDON-SHAAG, 2012; McMONNIES, 2009).

Também é bem estabelecido que haja ligação entre ceratocone a doenças autoimunes, especialmente hipersensibilidade a alérgenos. Manifestações bem descritas são atopia, asma, eczema, ceratoconjuntivite e conjuntivite alérgica. Acredita-se que a alergia acarrete uma inflamação, que faz o indivíduo coçar os olhos vigorosamente, levando à injúria tecidual e a consequências semelhantes ao item acima (MERDELER, 2015; NADERAN, 2015). Quanto ao uso de lentes de contato, acredita-se que a inserção deste tipo de corpo estranho pode modificar a fisiologia corneana, contribuindo para aumento da evaporação do filme lacrimal e com isto levar à fricção ocular (McMONNIES, 2016).

Além das condições supracitadas, a exposição à radiação UV é considerada como um fator de risco adicional, tendo em vista seu potencial como causador de estresse oxidativo e como modulador da expressão gênica. A alta prevalência da doença em regiões onde há alta incidência de radiação – tais como o Oriente Médio – comparada a locais onde há baixa incidência de raios solares – como Rússia e a porção norte dos Estados Unidos – pode ser um indício da efetividade da deste fator como agente estressor. Embora não sejam encontradas publicações que averiguem o efeito da exposição UV no desenvolvimento de ceratocone em humanos, experimentos com modelos animais já verificaram que a radiação UV modula a expressão de alguns genes relacionados com a degradação da matriz extracelular, enquanto outros identificaram aumento na apoptose das células corneanas e perda de ceratócitos, levando ao afinamento da córnea (CHANDLER, 2008; GORDON-SHAAG, 2012; GORDON-SHAAG, 2015b; NEWKIRK, 2007; PODSKOCHI, 2000).

Os indícios de base genética do ceratocone são suportados pelo aumento da incidência em famílias que possuam membros afetados, já que entre 5% a 28% dos casos é possível se identificar um histórico familiar. O estabelecimento de uma relação diretamente proporcional entre ceratocone e consanguinidade reforça ainda mais a existência de um componente genético envolvido na doença (GORDON-SHAAG, 2013).

Na condição de doença genética, o ceratocone mais comumente se expressa como uma doença autossômica dominante com penetrância incompleta e fenótipo variável, embora

em alguns casos sejam vistas herança ligada ao X e herança autossômica recessiva, esta última em famílias que apresentam altos níveis de consanguinidade (JEYABALAN, 2013; RABINOWITZ, 1998).

Até o momento, os estudos moleculares vêm sendo guiados pela escolha de genes candidatos – com base no conhecimento de suas características funcionais ou baseados em evidências providas por estudos bioquímicos – e/ou pelo mapeamento de *loci* candidatos por meio de estudos de associação genômica e de ligação. Uma grande diversidade de genes já foi elencada, mas as análises individuais destes genes são capazes de conferir explicabilidade somente para uma pequena parcela dos casos e os resultados entre trabalhos são conflitantes (BURDON & VICENT, 2013; BYKHOVSKAYA, 2016; ZHANG, 2015).

Durante a evolução da doença, é comum que se verifique aumento nos níveis de espécies reativas de oxigênio (ou ROS, do inglês “*Reactive Oxygen Species*”), o que tem levado diversas investigações a se concentrarem em genes de defesa contra tais moléculas. Além disso, estudos de ligação apontaram o envolvimento *locus* 20p11.2, no qual se encontra o gene *SOD1* (*Superoxide Dismutase 1*), que codifica uma enzima antioxidante citoplasmática que atua na neutralização de ROS. Uma deleção intrônica de sete pares de bases no sítio de *splicing* do íntron 2 deste gene é o principal achado dos trabalhos e é indicada como tendo relação com o ceratocone por ocasionar a síntese de uma isoforma proteica falha na neutralização de substâncias que causem estresse oxidativo, tais como ROS (JEYABALAN, 2013).

Considerando-se que o colágeno é o principal componente da córnea e desempenha um papel crucial para a resistência mecânica deste tecido, os genes codificadores de colágeno são fortes candidatos a estarem relacionados ao desenvolvimento de ceratocone, sobretudo quando se tem o conhecimento da associação entre ceratocone e doenças causadas por disfunções no tecido conjuntivo. Tanto estudos de ligação genética quanto análise de polimorfismos têm mostrado variantes em genes da família do colágeno que atuam como fatores de risco para ceratocone, especialmente nos genes *COL4A3* e *COL4A4*, que codificam colágeno tipo IV (SARAVANI, 2015; STABUC-SILIH, 2009).

Outro cenário possível para o desenvolvimento de ceratocone seria alguma disfunção no arranjo das fibras colágenas. Nesta vertente o principal candidato é o gene *LOX*, codificador da enzima lisil-oxidase, a qual catalisa a reticulação polimérica (ou *cross-link*) entre as fibras de colágeno e elastina. Desta forma, mutações neste gene teriam potencial para causar uma diminuição do *cross-link* e assim culminar no enfraquecimento e distensão da córnea. Alguns trabalhos já identificaram SNPs que podem ser associados ao

desenvolvimento do ceratocone (BYKHOVSKAYA, 2016; HASANIAN-LANGROUDI, 2014; ZHANG, 2015).

Como a matriz extracelular é fundamental para as características biomecânicas da córnea e tendo em vista que suas características são dependentes da relação entre sua formação e degradação as enzimas degradadoras de colágeno e elastina, contidas na família das metaloproteinases de matriz (ou MMPs) e seus respectivos inibidores, contidos na superfamília dos TIMPs (*Tissue Inhibitors of Metalloproteinases*) têm sido alvo de estudos. Foi demonstrado que a expressão MMPs é estimulada pela radiação UV em células corneanas de cães (CHANDLER, 2008). Em humanos a expressão diferencial de MMPs e TIMPs tem se mostrado comum em córneas ceratocônicas, sugerindo que mecanismos de regulação destes genes podem apresentar alguma deficiência ou que sua expressão seja influenciada por fatores externos, tais como raios UV (JEYABALAN, 2013; BONIS, 2011).

O desbalanço entre proliferação e apoptose dos ceratócitos evidencia que genes envolvidos com sinalização celular podem estar relacionados com o ceratocone. Estudos de ligação e análises moleculares identificaram significativo risco de desenvolvimento da doença em indivíduos que possuem polimorfismos em genes codificadores de citocinas, tais como de interleucinas (*IL1A*, *IL1B*, *IL1R*) e genes de vias de sinalização para apoptose (*SLC4A11*) (KIM, 2008; MIKAMI, 2013; NOWAK, 2013; WANG, 2015). O quadro abaixo sumariza os principais resultados de trabalhos envolvendo os genes supracitados.

Quadro: Principais genes relacionados com o ceratocone e alterações gênicas descritas.

Gene	Localização citogenética	Referência no OMIM	Alteração genética	Substituição
SOD1	21q22.11	147450	Deleção intrônica c.169 + 50 delTAAACAG	--
COL4A3	2q36.3	120070	SNP rs13424243	G43R
			SNP rs55703767	D326Y
			SNP rs10178458	P141L
			SNP rs6436669	E162G
			SNP rs11677877	H451R
			SNP rs34019152	G484G
			SNP rs28381984	P574L
COL4A4	2q36.3	120131	SNP rs2229814	P482S
			SNP rs2228555	V1516V
			SNP rs2228557	F1644F
			SNP rs2229813	M1327V
			SNP rs56247709	G789G
			SNP rs1800516	G545A
LOX	5q23.1	153455	SNP rs2956540	--
			SNP rs10519694	--
			SNP rs10519694	--
			SNP rs1800449	R158Q
TIMP3	22q12.3	188826	--	--
MMP9	20q13.12	120361	--	--
IL1A	2q14.1	147760	SNP rs2071376	--
IL1B	2q14.1	147720	SNP rs1143627	--
			SNP rs16944	--
IL1RN	2q14.1	147679	SNP rs2071459	--
SLC4A11	20p13	610206	Deleção intrônica c.2558+149 2558+203	--

3.2.5 Gene *VSX1*

O gene *VSX1* (*Visual System Homeobox 1*) que também é sinônimo de *RINX* (*Retinal Inner Nuclear Layer Homeobox*), *PPDC* (do inglês “*Posterior Polymorphous Dystrophy*”, em alusão à sua relação com distrofia corneana amorfa posterior) e *KTCN* (do inglês “*keratoconus*”, em alusão a sua relação com ceratocone), está contido na superfamília dos homeobox, dentro da família *VSX* (*Visual System Homeobox*). A superfamília dos genes homeobox é bastante conservada nos eucariotos e é conhecida principalmente por codificar fatores de transcrição críticos para a morfogênese. Estes fatores de transcrição possuem um domínio de ligação ao DNA que contém cerca de 60 aminoácidos, conhecido como homeodomínio. Todavia, após o estágio embrionário, sua expressão está relacionada com a manutenção celular e com respostas metabólicas (BOBOLA & MERABET, 2016). Dentro dos homeobox, a família *VSX* (também conhecida como *CVC*, por incluir *Ceh-10*, *Vsx1* e *Chx-10*) contém um outro motivo não modular adjacente ao homeodomínio, chamado de domínio Prd-L:CVC (de “*CVC paired-like to homeodomain*”), essencial para o desenvolvimento ocular durante a embriogênese, embora seu mecanismo de atuação ainda não seja claro (CLARK, 2008).

VSX1 está localizado em 20p11-q11 (Figura 6), possui cerca de 6,9 Kb e cinco éxons (Figura 7). Sua expressão é crítica para o desenvolvimento embrionário ocular e craniofacial, especificamente na diferenciação e manutenção celular destes tecidos. Além disso, córneas adultas que sofreram algum processo de injúria e que estejam passando por processos de remodelamento tecidual também podem ativar a expressão de *VSX1* para a transformação de fibroblastos em miofibroblastos (HAYASHI, 2005; VICENT, 2013).

Os indícios de que o gene *VSX1* está relacionado com o ceratocone surgiram por meio da realização de estudos de ligação, e o trabalho de Heon (2002) foi o primeiro a relacionar mutações neste gene ao ceratocone e à distrofia corneana amorfa posterior. Desde então, dezenas de trabalhos vêm sendo publicados reafirmando esta relação, embora o papel patológico das mutações não seja completamente compreendido (BONIS, 2011). Mesmo que presente em apenas uma pequena parcela da população, a ocorrência de determinadas mutações em *VSX1* é, de certa forma, conservada. Entre as principais mutações encontradas de modo recorrente estão P58L, R131S, R166W, L159M, D144E, G160D e H244R (BONIS, 2011; SAEERAD, 2011).

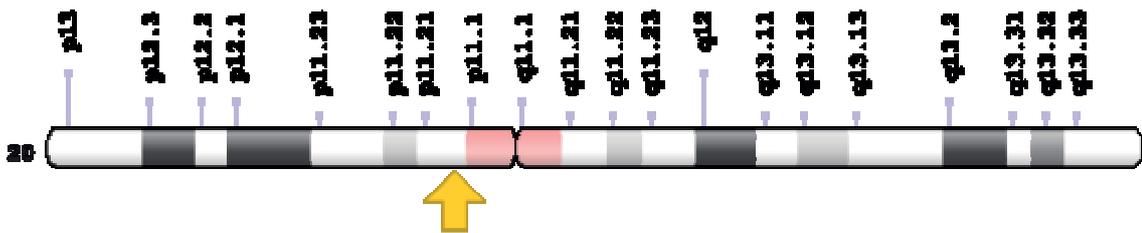


Figura 6: Localização citogenética do gene *VSX1*. Fonte: Genome Decoration Page (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/tools/gdp>). Acesso em 25 mar. 2017.

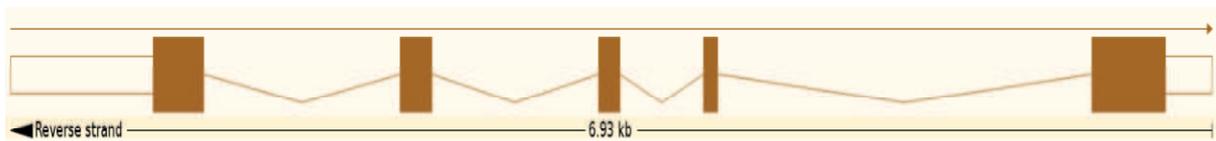


Figura 7: Estrutura do gene *VSX1*. Esquema apresentado seus cinco éxons (retângulos hachurados), íntrons (linhas) e regiões UTR 5' e 3' (retângulos vazios). Fonte: Ensembl Genome Browser. (<http://www.ensembl.org/index.html>). Acesso em 25 mar. 2017.

4 JUSTIFICATIVA

De acordo com o que já foi publicado até o momento, sugere-se que o ceratocone é uma doença de natureza poligênica e multifatorial. Trabalhos anteriores envolvendo famílias permitiram a identificação de pelo menos 17 *loci* gênicos, apontando uma heterogeneidade genética para esta doença. Dentre estes, foi mostrado que variantes alélicas no gene *VSX1* se associaram de certa forma com o desenvolvimento da doença em alguns indivíduos, embora possam existir fatores ambientais ainda desconhecidos e que estejam envolvidos sua gênese. É possível que diferentes variantes possam estar relacionadas à graus variáveis de ceratocone nos indivíduos, e ainda é desconhecido o perfil de variantes de maior prevalência na população brasileira. Apesar da grande quantidade de estudos já realizados no intuito de determinar uma associação genética com o ceratocone, pouco se sabe sobre os mecanismos moleculares envolvidos. Acreditamos que este trabalho irá contribuir fornecendo novos dados científicos que possam esclarecer melhor o envolvimento de variantes no gene *VSX1* com o desenvolvimento do ceratocone.

5 MATERIAL E MÉTODOS

5.1 ASPECTOS ÉTICOS

O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Médicas de Campina Grande (FCM-CG) (parecer CAAE 3511514.8.0000.5175) e a pesquisa foi conduzida seguindo os princípios da Declaração de Helsinque, bem como de acordo com as diretrizes e normas relacionadas a pesquisas com seres humanos, elaboradas pelo Conselho Nacional de Saúde e apresentadas na resolução 466/12. Todos os envolvidos foram informados sobre sua participação no projeto e assinaram um Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

5.2 AMOSTRAGEM

O estudo foi realizado com pacientes que frequentam o serviço de oftalmologia da Clínica Escola da FCM-CG e do Hospital da Visão, entre janeiro de 2013 e julho de 2016. Os dois centros recebem diariamente pacientes provenientes de Campina Grande e de cidades do entorno, caracterizando um grupo representativo da população das mesorregiões paraibanas Agreste e Borborema.

5.3 CRITÉRIOS DE INCLUSÃO

Foram incluídos no grupo afetado pacientes de ambos os sexos portadores de ceratocone que obedeceram aos critérios topográficos de Rabinowitz (1995; 1999). Assim, foram considerados ceratocônicos pacientes que possuem $K > 47,2$ D, $I-S > 1,4$ D e/ou $KISA > 100\%$. Para o grupo normal foram selecionados indivíduos sem ceratocone, de acordo com os critérios supracitados. Foram excluídos deste trabalho os pacientes que tenham sido submetidos previamente a procedimento de cirurgia refrativa e portadores de outras afecções oculares envolvendo a córnea ou a superfície ocular.

5.4 DIAGNÓSTICO

O diagnóstico clínico foi realizado por meio de ceratometria de córnea, realizada em topógrafo Eyeteck CT2000 SLE (Eyeteck Equipments, São Paulo, Brasil) e tomógrafo Schwind Sirius Scheimpflug (Eye-tech-Solutions, GmbH & Co. Kleinostheim, Alemanha).

5.5 MATERIAL BIOLÓGICO

Cada participante doou 5 mL de sangue venoso que foram coletados em tubos contendo EDTA 0,5%. Posteriormente as amostras foram encaminhadas ao Núcleo de Genética Médica e estocadas a -20°C até a realização das análises moleculares.

5.6 ANÁLISES MOLECULARES

5.6.1 Extração de DNA

O DNA genômico foi extraído pelo método de eluição de ácidos nucléicos em coluna de sílica utilizando o kit comercial HiPurA Blood Genomic DNA Miniprep Purification Kit (Himedia, EUA) seguindo as instruções do fabricante. Após a extração, cada amostra foi quantificada utilizando espectrofotometria em escala nanométrica (NanoVue Plus, GE, EUA) e estocada em *freezer* a -20°C.

5.6.2 Reação em Cadeia de Polimerase (PCR)

Para verificar a presença de variantes, todos os éxons do gene *VSX1* foram amplificados por Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), a partir do DNA genômico, e submetidos ao sequenciamento. Para tanto, foram sintetizados oligonucleotídeos iniciadores de acordo com as sequências validadas anteriormente por Sae-Rad (2011) (Tabela 1). As reações foram realizadas em volume final de 25µL, contendo 12,5µL de GoTaq Green Master Mix (Promega, EUA), 5 pmol de cada oligonucleotídeo iniciador (*forward* e *reverse*) e 1 µL de DNA. A termociclagem foi realizada de acordo com as seguintes condições: 5 minutos a 95°C para desnaturação inicial, seguido por 35 ciclos de: 1 minuto a 95°C para desnaturação das fitas, 1 minuto para anelamento dos iniciadores, cujas temperaturas de anelamento encontram-se disponíveis na Tabela 1, e 1 minuto a 72°C para elongação da nova cadeia. Ao finalizar estes 35 ciclos, houve uma etapa adicional de 1 minuto a 95°C para desnaturação, 5 minutos a 72°C destinados à extensão final e 10 minutos a 4°C para que ocorresse a parada da reação.

Os produtos de PCR obtidos em cada reação foram submetidos a separação eletroforética em gel de agarose a 1% contendo brometo de etídeo (0,5µg/ml) e visualizados sob luz UV emitida por transiluminador LPix (Loccus Biotecnologia, Brasil) para avaliação da sua qualidade e especificidade.

5.6.3 Purificação do DNA e sequenciamento

Os produtos de PCR contendo os amplicons foram purificados utilizando o kit QIAquick PCR Purification Kit (QIAGEN, Alemanha). A concentração e pureza do DNA foram avaliadas por espectrofotometria em equipamento NanoVue Plus (GE, EUA), considerando-se para o sequenciamento apenas as amostras em que relação da absorbância em 260nm e 280nm (A260/A280) estivessem entre 1,7 e 2,0.

As reações de sequenciamento foram realizadas em volume final de 7,5 µL, contendo o DNA purificado (na quantidade de 25 ng por trecho contendo 100 pb a ser sequenciado) e 10 picomoles dos oligonucleotídeos *forward* ou *reverse*. As amostras foram sequenciadas bidirecionalmente por eletroforese capilar em aparelho ABI3730, utilizando-se polímero POP7 e BigDye v3.1 pela empresa Myllesus Biotecnologia (Belo Horizonte, Brasil). Os dados obtidos foram confirmados por, no mínimo, dois sequenciamentos independentes.

5.6.4 RFLP-PCR

Com o intuito de triar o DNA de indivíduos normais para as variantes R131S e D105E, partiu-se para o desenvolvimento e padronização de um ensaio de digestão enzimática por endonucleases de restrição. Para tanto, sintetizamos um novo par de iniciadores (Tabela 1) por meio do *software* Primer3 v.0.4.0 (<http://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/>), a fim de incluir os sítios de restrição das duas variantes no mesmo amplicon. Para esta PCR é esperado um amplicon de 560 pb, que foi digerido independentemente com as enzimas de restrição *EaeI* (para validação da variante R131S) e *HpyCH4IV* (validando a variante D105E). Cada mix de reação foi realizado em volume final de 15µL – contendo 5µL de produto de PCR, 0,5µL de enzima, 1,5µL de tampão NEB CutSmart (New England Biolabs, Ipswich, MA, EUA) e 8µL de água – e incubado a 37°C por 5 horas. Posteriormente, 5µL da reação de digestão foram misturados a 2µL de tampão de amostra BlueJuice Gel Loading Buffer (Invitrogen, EUA) e o volume resultante foi aplicado em gel de agarose 1% com brometo de etídio (0,5µg/mL), submetido a separação eletroforética a 80 volts por 35 minutos e exposto a luz UV para que as bandas fossem reveladas. As imagens foram capturadas por equipamento de fotodocumentação LPix.

O alelo selvagem para a variante D105E possui dois sítios de clivagem para a enzima *HpyCH4IV*, gerando fragmentos de 54, 104 e 400 pb. Já o alelo mutante tem um destes sítios abolidos, resultando em dois fragmentos de 54 e 504 pb. Indivíduos heterozigotos, por sua vez, apresentarão 4 fragmentos, de 54, 104, 400 e 504 pb. No caso da variante R131S, após a

digestão, indivíduos sem a variante apresentam 3 sítios de clivagem, gerando fragmentos de 83, 106, 275 e 96 pb. Em indivíduos homocigotos para a variante, o primeiro sítio de clivagem é abolido, resultando em três fragmentos, de 189, 275 e 96 pb. Amostras heterocigotas, portanto, possuem 5 fragmentos, de 83, 96, 106, 189 e 275 pb. A genotipagem da variante L68H por meio da técnica de RFLP-PCR não foi possível devido à ausência de sítios apropriados para digestão por enzima de restrição que englobassem a base trocada, sendo necessário o sequenciamento do éxon 1 de todos os indivíduos do grupo.

5.7 BIOINFORMÁTICA

5.7.1 Análise das sequências

A análise dos eletroferogramas obtidos a partir do sequenciamento foi realizada utilizando o *software* Sequence Scanner 2 v.2.0 (Applied Biosystems, EUA). Posteriormente, a sequência dos amplicons foi alinhada à sequência de referência recuperada do banco de dados GenBank (depositada sob número NM_014588) por meio do *software* Sequence Viewer v.7.0.2 (CLCBio, Dinamarca).

5.7.2 Predição do potencial patogênico das variantes

A predição do impacto de variantes não-sinônimas na estrutura proteica foi realizada por meio das ferramentas SIFT (<http://sift.jcvi.org/>), Poly-phen2 (<http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/>) e PMUT (<http://mmb.pcb.ub.es/PMut/>). Estes algoritmos geram resultados em forma de *scores*, que se estendem de 0 a 1. Na plataforma SIFT, *scores* entre 0 a 0,5 são obtidos em variantes consideradas como patogênicas, enquanto valores maiores que 0,5 são obtidos em variantes tidas como benignas. Por outro lado, PMUT e PolyPhen-2 consideram valores próximos de 0 como benignos e valores que se aproximam de 1 como deletérios (NG & HENIKOFF, 2001).

Adicionalmente, para analisar a conservação dos aminoácidos mutantes encontrados neste estudo foi realizado um alinhamento múltiplo entre a sequência primária de aminoácidos codificada pela sequência ancestral do gene *VSX1* humano e sequências de genes ortólogos de organismos filogeneticamente próximos à espécie humana utilizando-se o *software* Clustal Omega (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>).

6 RESULTADOS

6.1 CARACTERIZAÇÃO DOS GRUPOS

Foram selecionados 73 pacientes para compor o grupo afetado, dos quais 26 indivíduos (35,6%) declararam possuir familiares acometidos pela doença e os 47 pacientes restantes (64,3%) foram considerados como portadores de ceratocone esporádico. Os homens representaram 34,3% da amostra, enquanto o sexo feminino representou 65,7%. A idade média dos indivíduos do grupo foi igual a 32,8 anos (desvio padrão $\pm 14,5$ anos) e a mediana foi igual a 29 anos (Tabela 2). Quanto aos índices topográficos, a dioptria central (K) apresentou média de 51,01 D (desvio padrão $\pm 4,81$) e mediana igual a 49,47 D. A relação I-S teve média de 4,20 D ($\pm 3,30$) e mediana igual a 3,54 D. Já o KISA apresentou média de 550,64% ($\pm 811,90$) e mediana igual a 168%, como mostra a Tabela 3.

O grupo normal foi composto por 101 indivíduos, dos quais 29 (28,7%) pertencem ao sexo masculino e 72 (71,3%) pertencem ao sexo feminino. A idade média dos indivíduos do grupo foi igual a 41,1 anos (desvio padrão $\pm 15,2$ anos) e a mediana foi igual a 40,5 anos (Tabela 2). Quanto aos dados topográficos, a média do K foi igual a 45,17 D (com desvio padrão $\pm 5,78$) e mediana igual a 45,99. A média do I-S foi 0,69 D ($\pm 0,74$) e a mediana foi igual a 0,51 D. O índice KISA do grupo apresentou média de 15,57% ($\pm 23,83$) e a mediana foi igual a 5% (Tabela 3).

Tabela 2: Caracterização dos grupos quanto à sexo e idade.

Grupo	N	Sexo		Idade		
		M	F	Média	Desvio padrão	Mediana
Afetado	73	25 (34,3%)	48 (65,7%)	32,8	14,5	29
Normal	101	29 (28,7%)	72 (71,3%)	41,1	15,2	40,5

Tabela 3: Caracterização dos grupos quanto aos índices topográficos.

Índice	K			I-S			KISA		
	Média	Desvio padrão	Mediana	Média	Desvio padrão	Mediana	Média	Desvio padrão	Mediana
Afetado	51,01	4,81	49,47	4,20	3,30	3,54	550,64	811,90	168
Normal	45,17	5,78	45,99	0,69	0,74	0,51	15,57	23,83	5

6.2 ANÁLISES MOLECULARES

Foi realizado o sequenciamento completo dos cinco éxons do gene *VSX1* em pacientes afetados pelo ceratocone. As sequências obtidas foram avaliadas em busca de variantes comparando-se com a sequência de referência do gene *VSX1* recuperada do banco de dados do GenBank. Foram encontradas 3 variantes não-sinônimas no éxon 1 e uma no éxon 2 de *VSX1*, constituídas por uma transversão de timina para adenina (c.206T>A) levando à troca de leucina por histidina no resíduo 68 (L68H); uma transversão c.391G>T, levando à troca de arginina por serina no resíduo 131 (R131S); uma transversão c.313G>T que leva à troca de aspartato por glutamato no resíduo 105 (D105E) e uma transição (c.815G>A) que acarreta a substituição de glicina por aspartato no resíduo 160 (G160D) (Tabela 4). As variantes R131S, D105E e G160D já foram descritas em outros trabalhos e estão depositadas no dbSNP sob os descritores rs6050307, rs6115023 e rs74315433, respectivamente. Contudo, a variante L68H é nova e ainda não foi identificada em trabalhos envolvendo pacientes de outros países. No total, seis pacientes (9,5%) portaram a variante R131S, dois outros pacientes apresentaram a variante L68H (4,1%), a variante D105E foi verificada em cinco probandos (6,8%) e um paciente apresentou a variante G160D (1,4%) (Tabela 4). Um indivíduo afetado se mostrou portador simultâneo das variantes R131S e L68H. Desta forma, variantes não-sinônimas estiveram presentes em quatorze indivíduos do grupo afetado (19,1%) A Figura 8 apresenta os trechos de eletroferogramas que evidenciam as variantes não-sinônimas encontradas em nosso trabalho.

No grupo normal, após a digestão foram verificados quatro indivíduos (3,6%) portadores da variante R131S e dois indivíduos (1,8%) portadores da variante D105E, ambas em estado de heterozigose. A variante L68H não foi identificada em nenhum indivíduo e até o momento não analisamos a presença da G160D neste grupo. As Figuras 9 e 10 apresentam géis representativos da genotipagem das variantes D105E e R131S, respectivamente.

Variantes sinônimas foram verificadas apenas em indivíduos portadores de ceratocone. O SNP S6S (rs8123716) decorrente da transversão c.18G>T, foi verificado em cinco pacientes (6,8%), enquanto o SNP G113G, (rs6037016) decorrente da transição c.339C>T foi encontrado em dois pacientes (2,6%). Também foi identificada uma variante nova, P79P, decorrente da transição c.337G>A, presente em dois pacientes (2,6%). Estes dados estão apresentados na Tabela 4.

Tabela 4: Variantes alélicas encontradas no estudo.

Variante alélica	Substituição	Éxon	Frequência	
			Grupo afetado	Grupo normal
g.25081904 (c.206T>A)	L68H	1	3 (4,1%)	0 (0,0%)
g.25081782 (c.313G>T)	D105E	1	5 (6,8%)	2 (1,8%)
g.25081706 (c.391G>T)	R131S	1	7 (9,5%)	4 (3,6%)
g.25082081 (c.18G>T)	S6S	1	5 (6,8%)	0 (0,0%)
g.25081874 (c.337G>A)	P79P	1	2 (2,6%)	0 (0,0%)
g.25081738 (c.339C>T)	G113G	1	2 (2,6%)	0 (0,0%)
g.25079460 (c.815G>A)	G160D	2	1 (1,4%)	NA

NA – Não analisado.

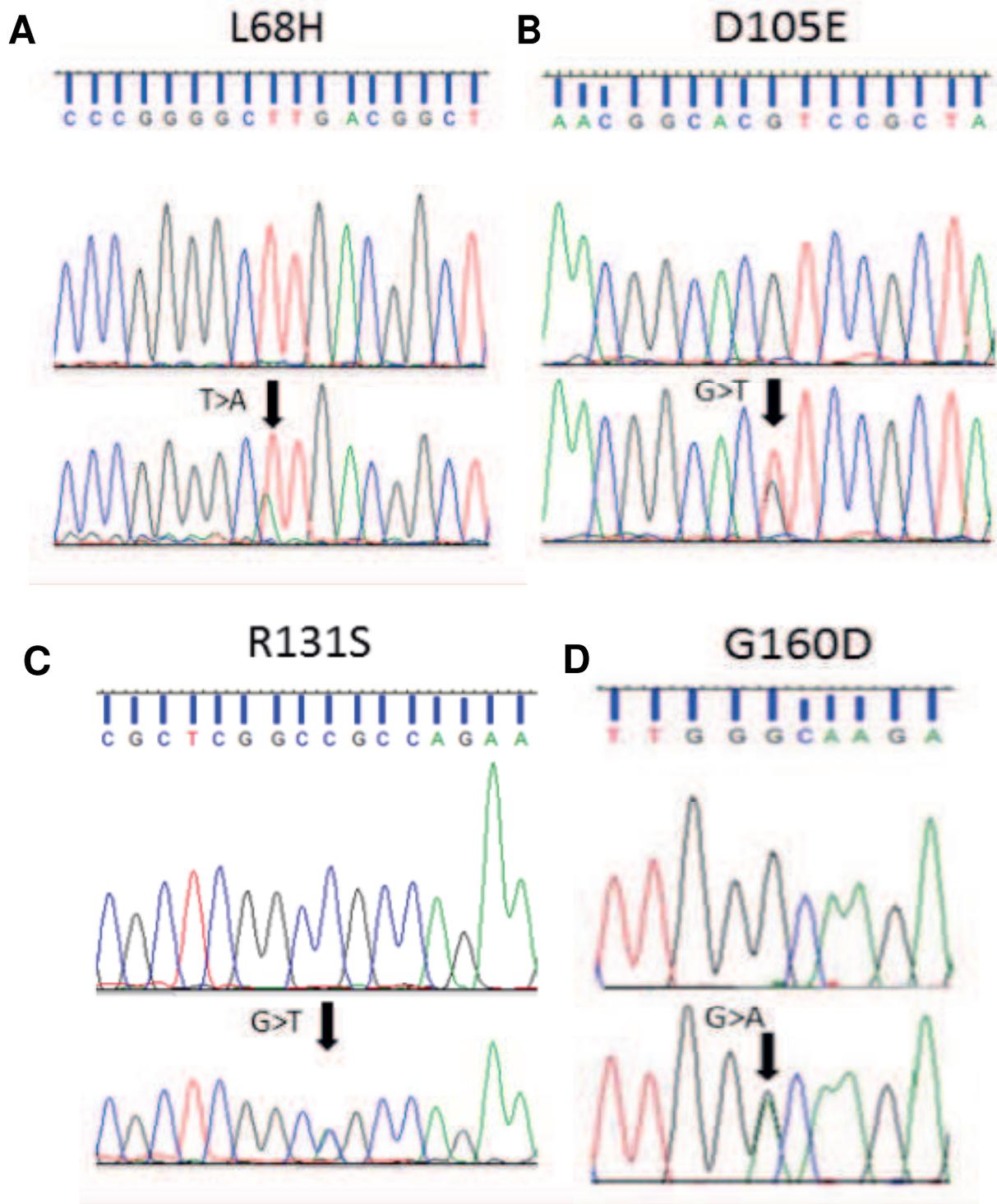


Figura 8: Eletroferogramas evidenciando as variantes não-sinônimas identificadas no trabalho. (A) L68H (c.206T>A), (B) D105E (c.313G>T), (C) R131S (c.391G>T) e (D) G160D (c.748G>A). As setas mostram o pico referente à variante encontrada. O eletroferograma da variante R131S refere-se à fita *reverse*.

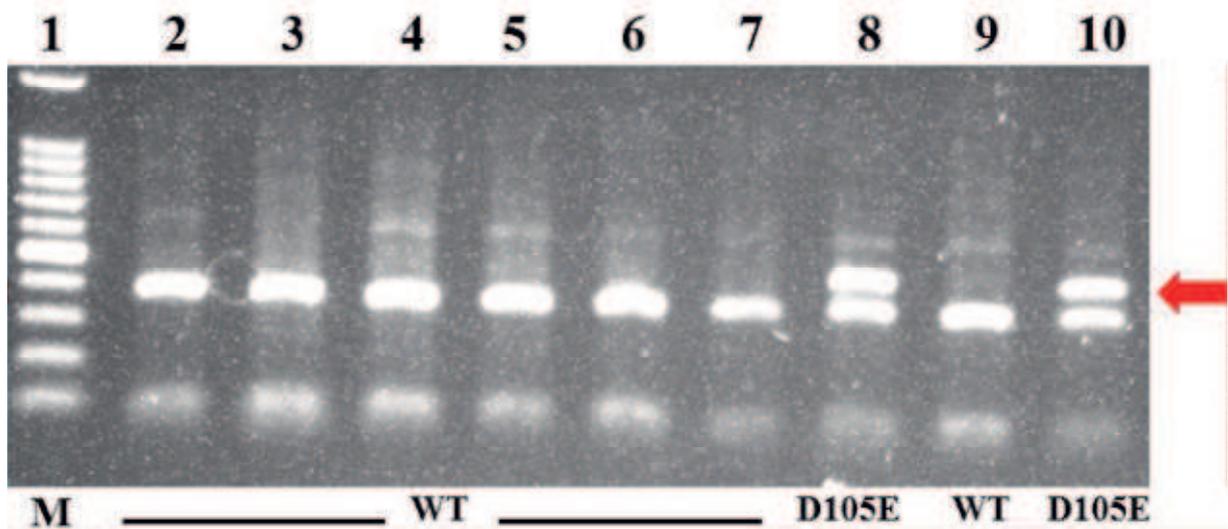


Figura 9: Gel de agarose 1% evidenciando o padrão de bandas da variante D105E após digestão com enzima *HpyCH4IV*. É mostrado o padrão molecular de 100pb (M) na canaleta 1, amostras de indivíduos portadores do alelo GG (canaletas 1-7 e 9) e duas amostras de indivíduos GT (canaletas 8 e 10).

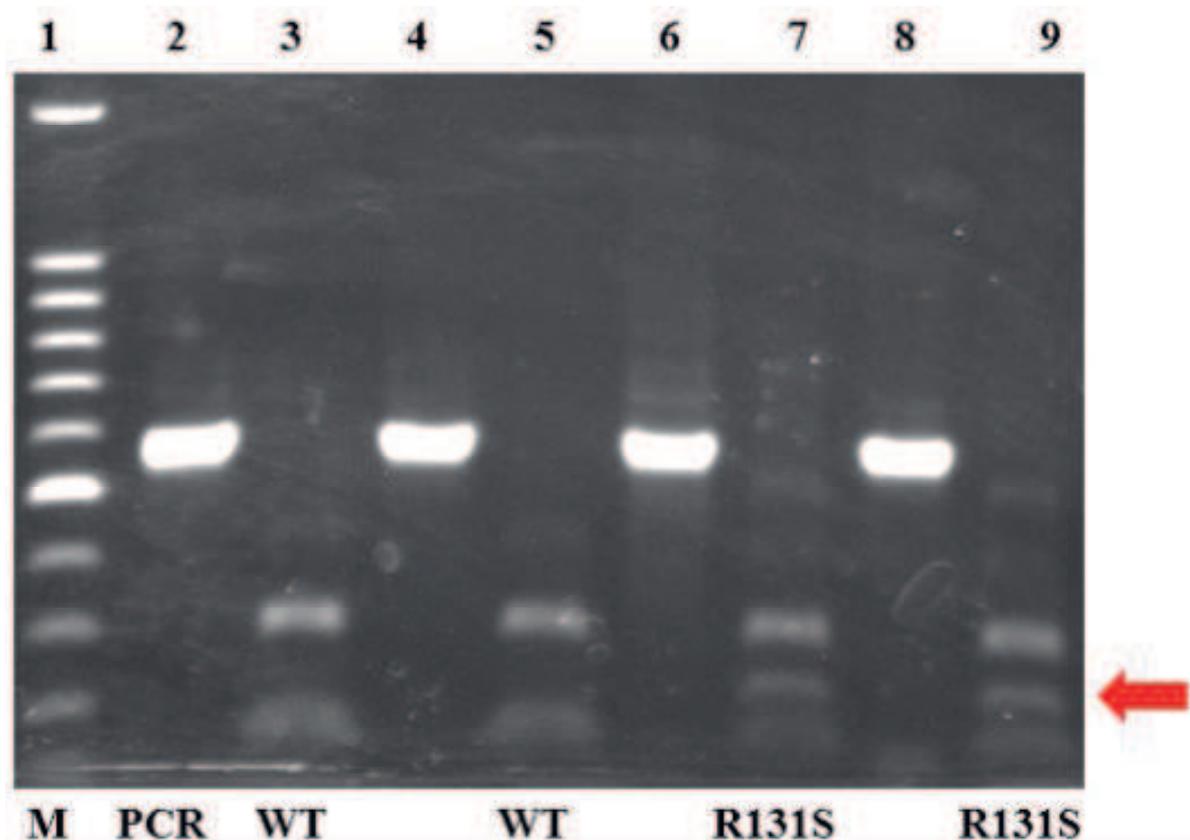


Figura 10: Gel de agarose 1% evidenciando o padrão de bandas da variante R131S após tratamento com a enzima *EaeI*. É mostrado o marcador de 100pb (M) na canaleta 1, os amplicons gerados após a PCR, na altura de 560pb (canaletas 2, 4, 6 e 8), duas amostras indivíduos portadores do alelo GG após a digestão (canaletas 3 e 5) e duas amostras de indivíduos GT após a digestão (canaletas 7 e 9).

6.3 PREDIÇÃO DO IMPACTO DAS VARIANTES NA ESTRUTURA DA PROTEÍNA

Foram realizadas análises *in silico* no intuito de prever se as variantes não-sinônimas L68H, D105E, R131S e G160D têm potencial para causar efeitos deletérios na estrutura proteica de VSX1. Para tanto, utilizando ferramentas de bioinformática, optamos por realizar as análises nas plataformas SIFT, PMUT e PolyPhen-2. A variante L68H foi predita como patogênica pelos algoritmos SIFT e PMUT (*scores* de 0,02 e 0,66, respectivamente), enquanto a variante D105E foi considerada patogênica pelo Poly-Phen-2 e pelo PMUT (*scores* de 0,99 e 0,66, respectivamente) e a variante R131S foi considerada patogênica apenas pelo PMUT, com *score* de 0,87. A variante G160D por sua vez foi considerada como benigna por todos os algoritmos, como mostra a Tabela 5.

Os resultados obtidos no alinhamento do Clustal Omega revelaram que os resíduos ancestrais, isto é, a leucina na posição 68, o aspartato na posição 105 e a arginina na posição 131 são conservados ao longo da evolução, como mostra a Figura 11. O alinhamento da variante G160D foi realizado em trabalho anterior, o qual verificou que o resíduo glicina na posição 160 não é conservado (DASH, 2010).

Tabela 5: Resultados da predição do impacto das variantes avaliados nas plataformas PolyPhen-2, SIFT e PMUT. Os dados em negrito representam variantes consideradas patogênicas.

Variante	PolyPhen	SIFT	PMUT
L68H	0,08	0,02	0,66
D105E	0,99	0,57	0,66
R131S	0	0,92	0,87
G160D	0,078	0,61	0,35

	A	B	C
	68	105	131
<i>H. sapiens</i>	APCPGPGLDGSSLAR...	APCLLLADVDFLPPR...	RPPPALGRQKRSDSV
<i>I. tridecemlineatus</i>	TPCPGPGLGGSCLAR...	APCLLLADMDFLPPG...	RPPPALGRQKRCEV
<i>G. gorilla</i>	APRPGPGLDGSSLAR...	APCLLLADVDFLPPR...	RPPPALGRQKRSEV
<i>P. troglodytes</i>	APCPGPGLDGSSLAR...	APCLLLADVDFLPPR...	RPPPALGRQKCEV
<i>P. abelli</i>	APCPGPGLDGSSLAR...	APCLLLTDVDFLPPR...	RPPPALGRQKRSEV
<i>B. taurus</i>	APRAGPGLGGSPAR...	APCLLLADVDFLPPPE...	RPPPSAARQKRSEV
<i>E. caballus</i>	---PGPGLGGPCLAR...	RPCLLLADVDFLPPPE...	RPPPALGRQKRSEV
<i>M. mulatta</i>	APCLGPGLDHSSLAR...	APCLLLADVDFLPPR...	RQPPALGRQKRSEV
<i>M. murinus</i>	ALCSGPGLSGSSTAR...	APCLLLADVDFLPPG...	LPPPALGRQRSEV

Figura 11: Alinhamento múltiplo da sequência de aminoácidos de VSX1 de diferentes espécies. Os resíduos selvagens leucina na posição 68, aspartato na posição 105 e arginina na posição 131 estão apresentados em negrito e são conservados em todas as espécies analisadas.

6.4 ANÁLISES FAMILIARES

As análises familiares foram realizadas com o objetivo de verificar se seria possível identificar uma associação entre as variantes e ceratocone nos casos familiares. Partindo dos pacientes portadores de alguma variante, tentamos entrar em contato com suas respectivas famílias, a fim de realizar a caracterização clínica e as análises moleculares. Ao final, obtivemos sucesso em montar heredogramas de duas famílias.

Na primeira família (Figura 12), as análises partiram de um probando de 17 anos de idade portador das variantes L68H e R131S, que foi submetido a transplante da córnea esquerda aos 15 anos devido o grau avançado da doença. A topografia da córnea direita deste paciente evidenciou um KISA de 261% e dioptria central de 57,04 D. Foi verificado que sua irmã de 16 anos de idade não porta nenhuma das variantes identificadas neste estudo, mas foi diagnosticada previamente com ceratocone no olho direito, embora a condição seja mais branda quando comparada ao irmão. A mãe destes indivíduos mostrou índices topográficos normais e não apresenta nenhuma das variantes. Nesta família não obtivemos êxito em contactar o pai.

Na segunda família, partimos de um probando de 16 anos, heterozigoto para a variante R131S (Figura 13). Este indivíduo apresentou KISA com valor de 214% na córnea esquerda e declarou ainda ter histórico de atopia ao longo da vida. A variante foi encontrada em sua mãe, também em heterozigose. As topografias corneanas dos outros membros da família se mostraram normais. Os dados topográficos de cada membro desta família e da anterior estão descritos na Tabela 6.

Tabela 6: Dados topográficos dos indivíduos pertencentes às famílias que participaram da construção dos heredogramas.

ID do indivíduo	K		Ast		I-S		KISA	
	OD	OE	OD	OE	OD	OE	OD	OE
FI/I.1	46,87	46,99	0,4	0,39	0,28	0,03	9,79	0,0
FI/II.1	47,42	46,9	2,39	1,99	1,86	0,79	1,52	1,36
FI/II.2	57,04	TR	1,73	TR	0,01	TR	261,36	TR
FII/I.1	44,53	44,42	0,58	0,3	0,16	0,12	0,0	0,0
FII/I.2	46,82	46,87	0,67	0,95	0,21	0,98	0,0	3,01
FII/II.1	45,45	45,5	1,35	0,44	5,91	1,05	214,8	34,01
FII/II.2	46,3	45,75	0,14	0,38	0,19	0,01	16,33	0,0

(FI: Família 1; FII: Família 2; OD: olho direito; OE: Olho esquerdo; TR: Transplantado).

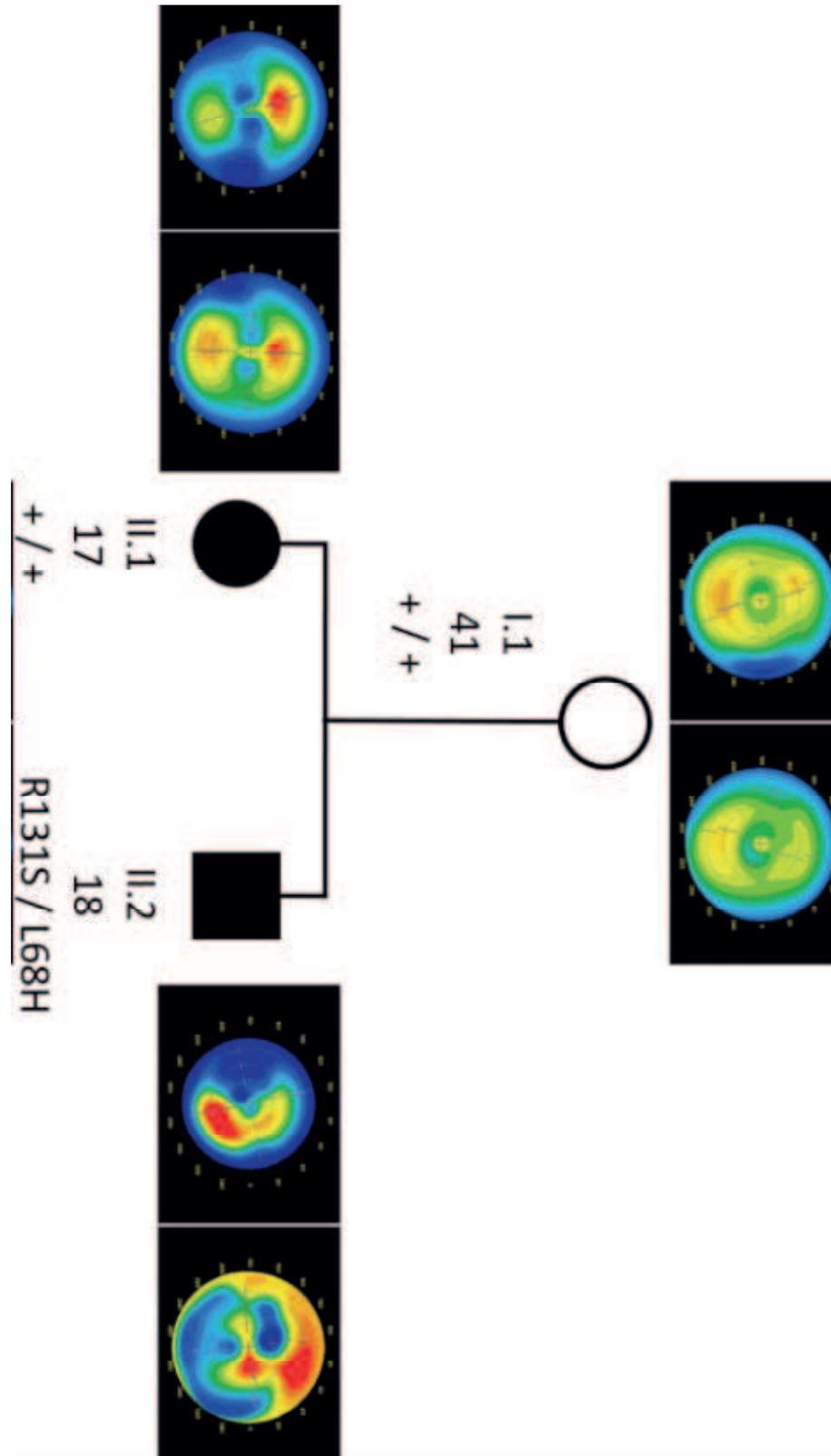


Figura 12: Heredograma - família 1. Símbolos pretos representam indivíduos clinicamente afetados com a doença, enquanto símbolos brancos representam indivíduos normais. Ao lado de da representação de cada membro familiar estão apresentadas as imagens topográficas de ambas as córneas e abaixo segue a identificação correspondente à família, a idade e o genótipo.

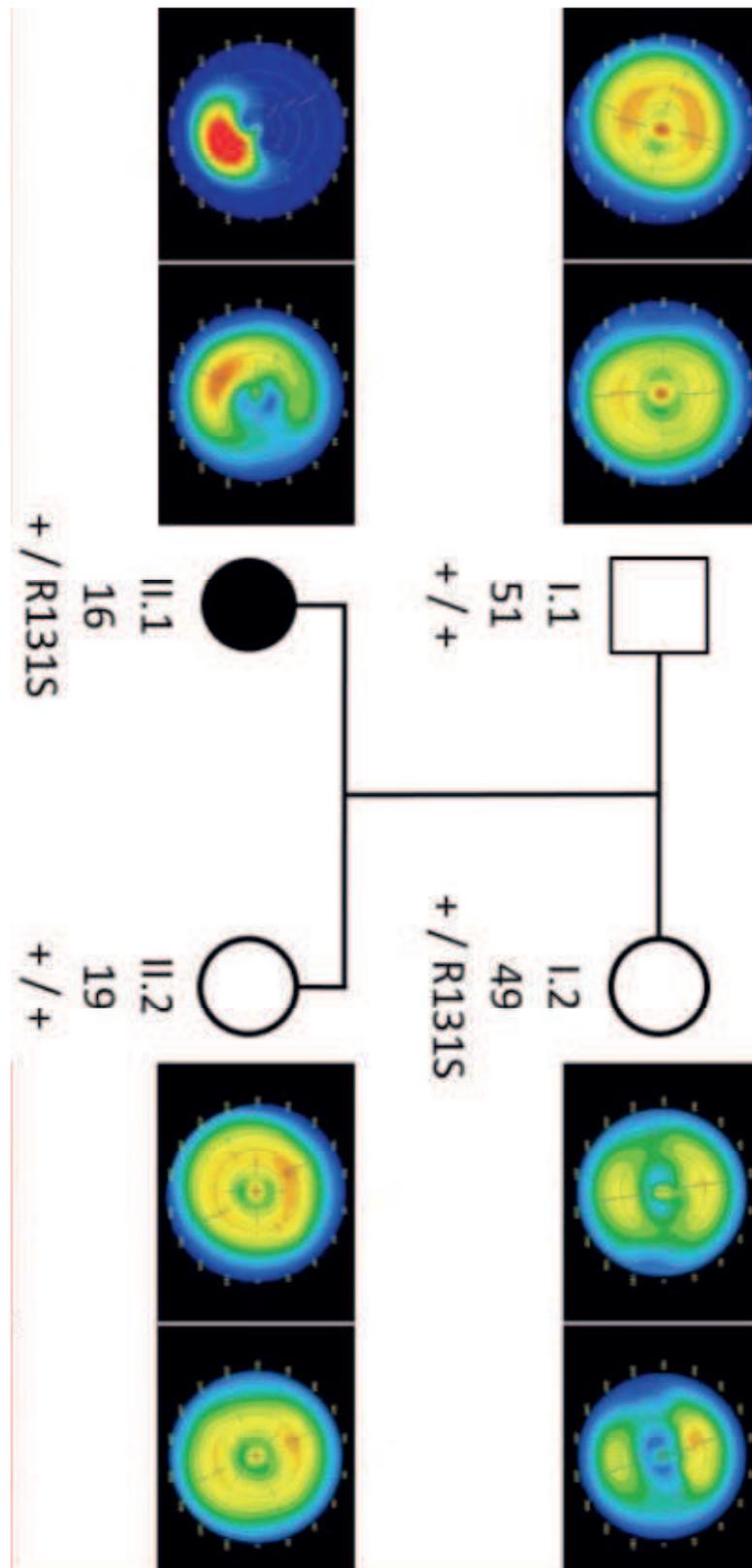


Figura 13: Heredograma - família 2. Símbolos pretos representam indivíduos clinicamente afetados com a doença, enquanto símbolos brancos representam indivíduos normais. Ao lado de da representação de cada membro familiar estão apresentadas as imagens topográficas de ambas as córneas e abaixo segue a identificação correspondente à família, a idade e o genótipo.

7 DISCUSSÃO

Estudos de ligação e moleculares têm identificado diversos genes que podem estar relacionados com a manifestação do ceratocone. Dentre estes genes está *VSX1*, um fator de transcrição envolvido com a morfogênese craniofacial, com o desenvolvimento ocular e que também está relacionado com a transformação de fibroblastos quando o tecido corneano sofre algum trauma. Desta forma, mutações poderiam acarretar a diminuição na afinidade na ligação do fator de transcrição codificado por *VSX1* ao DNA, levando a deficiências na transformação do ceratócitos em miofibroblastos após traumas corneanos e, assim acarretar o enfraquecimento e afinamento deste tecido, levando ao fenótipo clínico característico (DASH, 2010; DEHKORDI, 2013; HAYASHI, 2005). Os resultados de diversos trabalhos apresentam resultados conflitantes quanto à relação de *VSX1* em ceratocone, primeiramente porque os níveis de expressão em córneas adultas são ínfimos ou ausentes, e segundo porque muitos trabalhos não encontram mutações em indivíduos afetados, enquanto indivíduos saudáveis por vezes as carregam (DASH, 2010).

Em nosso trabalho, realizamos um estudo a fim de investigar se variantes no gene *VSX1* poderiam ter relação com a doença. Nós identificamos sete variantes alélicas no gene *VSX1*, das quais quatro são não-sinônimas (L68H, D105E, R131S e G160D) e outras três (S6S, P79P e G113G) são sinônimas. As variantes identificadas estão presentes majoritariamente em indivíduos pertencentes ao grupo caso, embora tenhamos indivíduos saudáveis portando variantes. Nestes últimos, todos declararam possuir familiares afetados com ceratocone.

Nós verificamos que a frequência de variantes possivelmente patogênicas em nossos pacientes (19%) foi maior do que as de outros trabalhos, que variaram entre 3,2% a 8,75% (BONIS, 2011; DASH, 2010; KOK, 2012). A alta frequência de variantes patogênicas em nossa amostra está em consonância com os indícios de que os fatores genéticos contribuem de modo distinto para o desenvolvimento da doença em cada população, embora haja, de alguma forma, convergência para um mesmo fenótipo clínico. Contudo é necessário um tamanho amostral maior para verificar esta hipótese.

Não foram encontradas publicações que tenham descrito a variante L68H em *VSX1*, assim como não há registros nas plataformas dbSNP ou ExAC. Já as variantes D105E (rs6115023), R131S (rs6050307) e G160D (rs74315433) já foram identificadas em outros estudos. A variante R131S é apontada como envolvida com a manifestação da doença

(WANG, 2013), o papel patogênico da variante G160D ainda é incerto (BISCEGLIA, 2005; BONIS, 2011; DASH, 2010). Contudo, todas as variantes carecem de estudos estruturais e/ou bioquímicos que comprovem estes dados.

De acordo com os algoritmos preditores de impacto da substituição de aminoácidos na estrutura proteica, exceto para a G160D, todas as demais variantes não-sinônimas encontradas têm potencial patogênico. Contudo, considerando que os algoritmos utilizados têm como principal análise a conservação dos aminoácidos e não suas características físico-químicas e levando em conta que a glicina é um aminoácido pequeno e apolar e o aspartato um aminoácido polar ácido, não descartamos que esta variante cause alguma mudança significativa na proteína, sendo necessária adoção de metodologias complementares para testar sua patogenicidade.

As análises apontaram ainda que os aminoácidos ancestrais nas posições 68, 105 e 131 são conservados ao longo da evolução e, deste modo, formas mutantes poderiam ter influências negativas sobre o sucesso evolutivo de seus portadores. Outros estudos já verificaram que os genes pertencentes à família *Vsx* são estruturalmente e funcionalmente conservados ao longo da escala filogenética, assim como consideraram que suas formas mutantes podem ser responsáveis por doenças oculares degenerativas (STRICKLER, 2002).

O potencial patogênico das variantes L68H e R131S é reforçado quando analisamos os dados topográficos do paciente que carrega as mesmas simultaneamente. Este paciente apresentou ceratocone elevado na córnea esquerda necessitando de transplante aos 15 anos, idade considerada precoce para tal procedimento quando se compara com os resultados obtidos por outros trabalhos (JAVADI, 2005; AL-MOHAIMEED, 2013). No olho direito, apresentou valores topográficos condizentes com ceratocone elevado. Assim, consideramos que as duas variantes possam estar agindo sinergicamente, aumentando a severidade da doença no probando.

As análises familiares nos permitiram verificar segregação da variante R131S entre mãe e filha da família 2, embora apenas a filha tenha desenvolvido a doença, o que pode ser atribuído à penetrância incompleta do ceratocone, hipótese esta comumente levantada em diversos trabalhos científicos. Na família 1, o probando portador das variantes L68H e R131S, provavelmente as herdou de seu pai, tendo em vista a ausência das mesmas nas amostras da mãe e da irmã. A irmã do probando, mesmo sem variantes em *VSX1*, apresenta uma forma mais leve de ceratocone, reforçando as evidências levantadas por outros trabalhos de que a doença tem natureza poligênica. Portanto, *VSX1* pode atuar como acentuador da severidade

da doença em subgrupos genéticos específicos, embora mais evidências sejam necessárias para corroborar este fato (KOK, 2012).

Em nosso trabalho verificamos a presença de variantes em indivíduos saudáveis, mas que possuíam familiares afetados. Este é um resultado comum a outros estudos, e pode se dar devido ao efeito patogênico destas variantes ser decorrente de interações gene-gene, entre genótipo e ambiente ou as mesmas terem penetrância incompleta (SAEE-RAD, 2011). Nestes casos, o ideal seria que houvesse um acompanhamento destes indivíduos sobretudo quando o paciente ainda é jovem e está sujeito a manifestação da doença no futuro. Desta forma, poderíamos compreender melhor se estas variantes identificadas em *VSX1* possuem algum efeito deletério na função da proteína.

Quanto às variantes sinônimas, verificamos os polimorfismos S6S, P79P e G113G apenas em indivíduos do grupo afetado, o que pode ser indicativo de que estas variantes podem ser utilizadas como marcadores de susceptibilidade à doença. Até o momento também não encontramos nenhuma publicação que relate a variante P79P e a mesma não está presente em nenhuma plataforma de depósito de SNPs, o que nos leva a tratá-la como uma variante nova. Todos os polimorfismos encontrados carecem de estudos que investiguem sua relação com modificações nos níveis de expressão gênica. Neste sentido, a troca de nucleotídeos poderia interferir no processamento do RNA mensageiro, criando ou abolindo sítios de *splicing* e acarretando a expressão de isoformas da proteína. As variantes sinônimas também podem afetar a expressão gênica graças ao fenômeno de utilização de códons preferenciais para o mesmo aminoácido, ou seja, mesmo que hajam diversos códons para um mesmo aminoácido, alguns deles serão mais frequentes e mais utilizados em detrimento dos demais, em conformação a isto, a concentração dos RNA transportadores que se ligam a estes códons será maior em comparação aos códons menos utilizados. Desta forma, as variantes sinônimas podem levar à requisição de RNA transportadores mais ou menos abundantes na córnea, podendo influenciar a velocidade da tradução e levar à expressão heteróloga de *VSX1*.

Além disso, nós não descartamos a possibilidade das variantes sinônimas estarem relacionadas com modificações epigenéticas, em especial com eventos de metilação que poderiam alterar a expressão de *VSX1* nesses indivíduos. Estudos adicionais serão necessários para se esclarecer o envolvimento destes polimorfismos no desenvolvimento da doença.

A dificuldade de compreensão da relação do gene *VSX1* com o ceratocone recai sobre o fato de o mecanismo molecular de atuação das proteínas que possuem homeodomínio não ser claro, dificultando também o entendimento de sua relação com condições patogênicas

(BOBOLA & MERABET, 2016). O fato de realizarmos análise do gene *VSX1* individualmente representa outra limitação para a compreensão dos fatores genéticos envolvidos com o ceratocone, tendo em vista a natureza complexa da doença. Isto porque quando se realiza análises de genes individuais, deixando de lado todo o *background* genético, possíveis interações gênicas não são avaliadas.

Até o momento, a grande maioria das publicações experimentais sobre ceratocone são voltadas para a busca por mutações. Todavia é bem conhecido que mecanismos epigenéticos também são responsáveis por uma significativa porção de outras doenças, como por exemplo o câncer. Estudos proteômicos mostram desbalanços na expressão de uma série de genes, mas não há esforços efetivos no sentido de compreender mecanismos epigenéticos que contribuem para o desenvolvimento e progressão do ceratocone. Um dos poucos trabalhos que citam a participação da epigenética no ceratocone é o artigo de revisão de McMonnies (2014), o qual relata a possibilidade da exposição a estressores ambientais modificar o padrão de metilação do DNA e, ao longo do tempo, levar ao aparecimento do fenótipo clínico.

Outra questão que nós não consideramos e que pode influenciar a compreensão da doença foi a consanguinidade. Diversos trabalhos já verificaram uma forte correlação deste fator com o ceratocone, no sentido de que ao passo que a consanguinidade diminui a variabilidade genética, aumenta-se as chances da expressão de mutações recessivas deletérias (GORDON-SHAAG, 2013). A população paraibana apresenta altos índices de casamentos consanguíneos, com frequência variando entre 6% a 41% (WELLER, 2012) e, desta forma, é possível que este seja um fator que influencie significativamente a dinâmica genética que leva ao desenvolvimento do ceratocone em nossa população.

Uma outra possibilidade é que, em casos onde não são encontradas causas genéticas, o fenótipo clínico do ceratocone seja resultado de fenocópias, causadas por traumas mecânicos na córnea, devido ao uso de lentes de contato e ao hábito de coçar os olhos, por exemplo (BISCEGLIA, 2005; DAVIDSON, 2014). Diante do que foi exposto, se faz necessário que haja uma investigação mais ampla da patobiologia do ceratocone, combinando análises genéticas e bioquímicas. Neste sentido, a genômica estrutural e sobretudo a funcional, bem como análises de proteômica, podem atuar como base para a caracterização molecular dos subtipos da doença, de modo semelhante ao que já é realizado com outras patologias complexas. A partir daí, os esforços podem se voltar para esclarecer se há correlação entre determinados fatores ambientais com dados subtipos moleculares.

Outro fator que merece atenção é o fato de haver alta incidência de ceratocone em regiões geográficas de clima quente e seco, que possuem altos níveis de incidência de raios

solares. A diminuição da viabilidade celular e modificação características biomecânicas da matriz extracelular de fibroblastos expostos à radiação UV já é comprovada *in vitro* e tem sido atribuída a deficiências na neutralização de danos oxidativos, levando a maiores níveis de apoptose dos ceratócitos (KOK, 2012; PHILIPS, 2007). A presença de espécies reativas de oxigênio em grandes concentrações tem se mostrado comum em córneas ceratocônicas (GORDON-SHAAG, 2012; GORDON-SHAAG, 2015b) e não há estudos verificando a influência de espécies reativas de nitrogênio, embora o potencial destas substâncias para causar danos oxidativos e levar a condições patológicas já seja bem descrito (MARTÍNEZ & ANDRIANTSITOHAINA, 2009). Arelado a isto, diversos trabalhos têm verificado relação do ceratocone com uma deleção no sítio de *splicing* em um dos íntrons do gene *SOD1*, o qual codifica uma enzima antioxidante. Deste modo, é possível que a isoforma da proteína gerada a partir desta deleção tenha atividade reduzida e, assim, os radicais livres lesem o tecido corneano, contribuindo para o estabelecimento do ceratocone (BYKHOVSKAYA, 2016; JEYABALAN, 2013; UDAR, 2006).

Estes dados são especialmente importantes considerando que as condições climáticas da Paraíba e de boa parte do Brasil seriam propícias ao desenvolvimento da doença. Desta forma, não descartamos que os efeitos modulador da expressão gênica e sobretudo estressor da radiação solar estejam fortemente relacionados com a manifestação do ceratocone em nossa amostra.

Pesquisas sobre ceratocone na população brasileira são extremamente escassas em todos os âmbitos. No que se refere à genética, a saber, nós encontramos apenas um trabalho, de Reis (2016) que buscou avaliar a ocorrência de um SNP no gene *DOCK9*. Levando em consideração a heterogeneidade genética entre as diferentes populações no que se trata de ceratocone, o nosso trabalho provê dados que auxiliarão na conjectura do perfil de variantes em nossa população.

8 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Neste trabalho, nós identificamos sete variantes de nucleotídeo único no gene *VSX1*, sendo quatro variantes de sentido trocado (L68H, D105E, R131S e G160D) e três variantes sinônimas (S6S, P79P e G113G), das quais duas, L68H e P79P, não foram descritas em nenhuma outra população estudada. De acordo com análises *in silico*, as variantes não-sinônimas L68H, D105E e R131S têm potencial para causar impacto na estrutura proteica. Também foi estudado um paciente portador de duas destas variantes, L68H e R131S, que apresentou um quadro severo de ceratocone em ambos os olhos. Este achado é sugestivo de uma atuação sinérgica das duas variantes, que podem estar interferindo na estrutura tridimensional da proteína *VSX1* de modo mais significativo quando comparado a cada uma das variantes isoladamente, levando a uma acentuação da severidade da doença.

Nós identificamos variantes sinônimas apenas em indivíduos do grupo afetado e as variantes de sentido trocado em pacientes do grupo afetado e em indivíduos do grupo normal que possuem familiares portadores de ceratocone. Estes resultados corroboram com os indícios de penetrância incompleta da doença. Tendo em vista que o ceratocone se trata de uma doença complexa, o conhecimento dos hábitos de vida e de fatores ambientais a que os indivíduos são expostos, juntamente com o conhecimento do perfil genético dos indivíduos são necessários para uma melhor compreensão da relação genótipo-fenótipo.

Também consideramos que o aumento do tamanho da amostra e uma maior acurácia na triagem dos pacientes são essenciais para uma melhor compreensão da influência das variantes na manifestação da doença. Contudo, os nossos resultados sugerem que variantes no gene *VSX1* são um componente genético importante na manifestação do ceratocone. Além disso, nossos dados estão entre as primeiras contribuições do perfil de variantes da população de pacientes ceratocônicos brasileira.

Dentre as nossas perspectivas a curto prazo, está a realização de ensaios de modelagem molecular para visualizar o efeito deletério das variantes não-sinônimas na estrutura proteica, bem como realizar ensaios *in silico* a fim de analisar se a presença das variantes sinônimas está associada a algum evento de *splicing* ou de metilação do DNA que possam estar envolvidos no desenvolvimento do ceratocone.

A médio e longo prazo, nós pretendemos investigar a incidência e prevalência da doença e estimar a frequência dos alelos encontrados em nosso estudo na população. No âmbito molecular, pretendemos realizar ensaios para verificar fatores epigenéticos que possam estar afetando a expressão de *VSX1* e ensaios *in vitro* que avaliem a influência das

variantes descritas no trabalho na função proteica. Além disso, temos intuito de realizar estudos de ancestralidade em nossa amostra. Adicionalmente, pretendemos realizar sequenciamento completo do genoma de famílias que possuam histórico da doença, especialmente aquelas que possuam gêmeos monozigóticos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAM NETTO, A.; BOTELO, C. A. S.; FELICÍSSIMO, L. C. Indicações e perfil epidemiológico dos pacientes submetidos à ceratoplastia. **Rev. Bras. Oftalm.**, 2014;73(3): 162-166.

AL-MOHAIMEED; M. M. Penetrating keratoplasty for keratoconus: visual and graft survival outcomes. **International journal of health sciences**, 2013;7(1):57-63.

ARAUJO, A. L.; GOMES, J. A. P. Corneal stem cells and tissue engineering: Current advances and future perspectives. **World Journal of Stem Cells**, 2015;7(5):806-814.

ARNALICH-MONTIEL, F.; DEL BARRIO, J. L. A.; ALIÓ, J. L. Corneal surgery in keratoconus: which type, which technique, which outcomes?. **Eye and vision**, 2016;3(1)2.

BARBARO, V., et al. Expression of VSX1 in human corneal keratocytes during differentiation into myofibroblasts in response to wound healing. **Investigative ophthalmology & visual science**, 2006;47(12):5243-5250.

BINDER, P. S., et al. A. High-voltage electron microscopy of normal human cornea. **Invest Ophthalmol Vis Sci**, 1991;32:2234-2243.

BISCEGLIA, L., et al. VSX1 mutational analysis in a series of Italian patients affected by keratoconus: detection of a novel mutation. **Investigative ophthalmology & visual science**, 2005;46(1):39-45.

BOBOLA, N., MERABET, S. Homeodomain proteins in action: similar DNA binding preferences, highly variable connectivity. **Current Opinion in Genetics & Development**, 2017;43,1-8.

BONIS, P., et al. Mutational screening of VSX1, SPARC, SOD1, LOX and TIMP3 in keratoconus. **Mol. Vis.** 2011;17:2482-2494.

BRITO, P. R.; VEITZMAN, S. Causas de cegueira e baixa visão em crianças. **Arq Bras Oftalmol.**, 2000;63(1):49-54.

BURDON, K. P.; VICENT, A. L. Insights into keratoconus from a genetic perspective. **Clin. Exp. Optom.** 2013;96:146-154.

BYKHOVSKAYA, Y.; MARGINES, B.; RABINOWITZ, Y. S. Genetics in keratoconus: Where we are? **Eye and vision**, 2016;3:16.

CALIX NETTO, M. J., et al. Principais indicações de transplante penetrante de córnea em um serviço de referência no interior de São Paulo (Sorocaba - SP, Brasil). **Arq Bras Oftalmol.** 2006; 69(5):661-4.

CARVALHO, L. A. V. Técnicas para facilitar o diagnóstico da topografia de córnea in vivo. **Arq. Bras. Oftalmol.**, 2005;68(2):205-212.

CATTANI, S., et al. Indicações de transplante de córnea no Hospital de Clínicas de Porto Alegre. **Arq. Bras. Oftalmol.**, 2002;65(1):95-8.

CAVALCANTI, M. T. D., et al. Ceratocone: resultados visuais, complicações e qualidade de vida após ceratoplastia penetrante realizada por médico residente. **Arq Bras Oftalmol.**, 2004;67(3):415-8.

CAVAS-MARTÍNEZ, F., et al. Corneal topography in keratoconus: state of the art. **Eye and Vision**, 2016;3(1):5.

CHANDLER, H. L.; KUSEWITT, D. F.; COLITZ, C. M. H. Modulation of matrix metalloproteinases by ultraviolet radiation in the canine cornea. **Veterinary ophthalmology**, 2008;11(3):135-144.

CLARK, A. M., et al. Negative regulation of Vsx1 by its paralog Chx10/Vsx2 is conserved in the vertebrate retina. **Brain research**, 2008;1192:99-113.

CUMMINGS, C. F., et al. Extracellular chloride signals collagen IV network assembly during basement membrane formation. **J. Cell Biol.**, 2016;213(4):479-494.

DASH, D. P., et al. Mutational screening of VSX1 in keratoconus patients from the European population. **Eye**, 2010;24(6):1085-1092.

DAVIDSON, A. E., et al. The pathogenesis of keratoconus. **Eye**, 2014;28:189-195.

DEHKORDI, F. A., 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):646-51.

DELMONTE, D. W.; KIM, T. Anatomy and physiology of the cornea. **J. Cataract Refract. Surg.**, 2011;37(3):588-98.

ERTAN, A.; COLIN, J. Intracorneal rings for keratoconus and keratectasia. **J. Cataract Refract. Surg.**, 2007;33(7):1303-14.

FECAROTTA, C. M.; HUANG, W. W. Pediatric genetic disease of the cornea. **Journal of Pediatric Genetics**, 2014;3:195-207. DOI 10.3233/PGE-14102.

FLORES, V. G. C.; DIAS H. L. R.; CASTRO R. S. Indicações para ceratoplastia penetrante no Hospital das Clínicas-UNICAMP. **Arq. Bras. Oftalmol.**, 2007;70(3):505-8.

GALVIS, V., et al. Keratoconus: an inflammatory disorder? **Eye**, 2015;29:843-859.

GEORGEOU, T., et al. Influence of ethnic origin on the incidence of keratoconus and associated atopic disease in Asian and white patients. **Eye**, 2004;18:379-83.

GOMES, J. A. P., et al. Global consensus on keratoconus and ectatic disorders. **Cornea**, 2015;34:359-369.

GORDON-SHAAG, A.; MILLODOT, M.; SHNEOR, E. The epidemiology and etiology of keratoconus. **International journal of keratoconus and ectatic corneal diseases**, 2012;1(1):7-15.

GORDON-SHAAG, A., et al. Is Consanguinity a Risk Factor for Keratoconus? **Optom. Vis. Sci.**, 2013;90:448-454.

GORDON-SHAAG, A., et al. The genetic and environmental factors for keratoconus. **BioMed research international**, 2015;2015.

GORDON-SHAAG, A., et al. Risk factors for keratoconus in Israel: a case-control study. **Ophthalmic and Physiological Optics**, 2015;35(6):673-681.

HASANIAN-LANGROUDI, F., et al. Association of Lysyl oxidase (LOX) polymorphisms with the risk of Keratoconus in an Iranian population. **Ophthalmic genetics**, 2015;36(4):309-314.

HAYASHI, T.; HUANG, J.; DEEB, S. S. Expression of *Rinx/Vsx1* during postnatal eye development in cone-bipolar, differentiating ganglion, and lens fiber cells. **Jpn J. Ophthalmol.**, 2005;49:93-105.

HÉON, E., et al. VSX1: a gene for posterior polymorphous dystrophy and keratoconus. **Hum. Mol. Genet.**, 2002;11(9):1029-36.

JAVADI M. A., et al. Outcomes of penetrating keratoplasty in keratoconus. **Cornea**, 2005;24(8):941–946.

JEYABALAN, N., et al. Genetic and genomic perspective to understand the molecular pathogenesis of keratoconus. **Indian J. Ophthalmol.**, 2013;61:384-388.

JINABHAI, A.; RADHAKRISHNAN, H.; O'DONNELL, C. Pellucid corneal marginal degeneration: A review. **Contact Lens Anterior Eye**, 2011;34(2):56-63.

JOHNSON, D. H.; BOURNE, W. M.; CAMPBELL, R. J. The ultrastructure of descemet's membrane changes with age in normal corneas. **Arch. Ophthalmol.**, 1982;100:1942-1947.

KIM, S. H., et al. Association of -31 T4C and -511 C4T polymorphisms in the interleukin 1 beta (IL1B) promoter in Korean keratoconus patients. **Mol. Vis.**, 2008;14:2109–2116.

KOK, Y. O.; TAN, G. F. L.,; LOON, S. C. Review: keratoconus in Asia. **Cornea**, 2012;31(5):581-593.

LECHNER, J., et al. Mutational analysis of MIR184 in sporadic keratoconus and myopia. **Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.**, 2013;54:5266–5272.

MAHARANA, P. K., et al. Management of advanced corneal ectasias. **British Journal of Ophthalmology**, 2016;100:34-40.

MARTÍNEZ, M. C.; ANDRIANTSITOHAINA, R. Reactive nitrogen species: molecular mechanisms and potential significance in health and disease. **Antioxidants & redox signaling**, 2009;11(3):669-702.

MASTROPASQUA, L. Collagen cross-linking: when and how? A review of the state of the art of the technique and new perspectives. **Eye and Vision**, 2015:2-19.

McMONNIES, C. W. Mechanisms of rubbing-related corneal trauma in keratoconus. **Cornea**, 2009;28(6):607-615.

McMONNIES, C. W. Epigenetic mechanisms might help explain environmental contributions to the pathogenesis of keratoconus. **Eye & contact lens**, 2014;40(6):371-375.

McMONNIES, C. W. Eye rubbing type and prevalence including contact lens 'removal-relief' rubbing. **Clinical and Experimental Optometry**, 2016;99(4):366-372.

MERDLER, I., et al. Keratoconus and allergic diseases among Israeli adolescents between 2005 and 2013. **Cornea**, 2015;34(5):525-529.

MICHELACCI, Y. M. Collagens and proteoglycans of the corneal extracellular matrix. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, 2003;36:1037-1046.

MIKAMI, T., et al. Interleukin 1 beta promoter polymorphism is associated with keratoconus in a Japanese population. **Mol. Vis.**, 2013;19:845–851.

NADERAN, M., et al. Characteristics and associations of keratoconus patients. **Contact Lens and Anterior Eye**, 2015;38(3):199-205.

NEWKIRK, K. M., et al. Ultraviolet radiation-induced corneal degeneration in 129 mice. **Toxicol. Pathol.**, 2007;35:819–826.

NG, P. C.; HENIKOFF, S. Predicting deleterious amino acid substitutions. **Genome Res.**, 2001;11:863–874.

NOWAK, D. M., et al. Substitution at IL1RN and Deletion at SLC4A11 Segregating with Phenotype in Familial Keratoconus Linkage between Loci and KTCN. **Investigative ophthalmology & visual science**, 2013;54(3):2207-2215.

PEARSON, A. R., et al. Does ethnic origin influence the incidence or severity of keratoconus? **Eye**, 2000;93:403-09.

PHILIPS, N., et al. Regulation of the extracellular matrix remodeling by lutein in dermal fibroblasts, melanoma cells, and ultraviolet radiation exposed fibroblasts. **Arch. Dermatol. Res.**, 2007;299(8):373-379.

PODSKOCHY, A.; GAN, L.; FAGERHOLM, P. Apoptosis in UV-exposed rabbit corneas. **Cornea**, 2000;19:99–103.

RABINOWITZ, Y. S. Keratoconus. **Surv. Ophthalmol.**, 1998;42:297-319

RABINOWITZ Y. S. Videokeratographic indices to aid in screening for keratoconus. **J. Refract. Surg.**, 1995;11:371–9.

RABINOWITZ, Y. S.; RASHEED, K. KISA% index: A quantitative videokeratography algorithm embodying minimal topographic criteria for diagnosing keratoconus. **J. cataract refract. surg.**, 1999;25(10):1327-1335.

REIS, L. M., et al. Análise da relação da ocorrência de polimorfismo de nucleotídeo único do gene DOCK9 em ceratocone. **Revista Brasileira de Oftalmologia**, 2016;75(3):223-227.

ROMERO-JIMÉNEZ, M.; SANTODOMINGO-RUBIDO, J.; WOLFFSOHNC, J. S. Keratoconus: A review. **Contact Lens & Anterior Eye**, 2010;33:157–166.

SAEE-RAD, S., et al. Mutational analysis of VSX1 and SOD1 in Iranian patients with keratoconus. **Mol. Vis.**, 2011;17:3128-3136.

SARAVANI, R., et al. Evaluation of Possible Relationship Between COL4A4 Gene Polymorphisms and Risk of Keratoconus. **Cornea**, 2015;34(3):318-322.

SEDGHIPOUR, M. R.; SADIGH, A. L.; MOTLAGH, B. F. Revisiting corneal topography for the diagnosis of keratoconus: use of Rabinowitz's KISA index. **Clinical Ophthalmology**, 2012;6 181–184.

SHERWIN, T.; BROKES, N. H. Morphological changes in keratoconus: pathology or pathogenesis. **Clin. Exp. Ophthalmol.**, 2004;32(2):211-217.

SOUZA, R. S.; PINHAL, M. A. S. Interações em processos fisiológicos: a importância da dinâmica entre matriz extracelular e proteoglicanos. **Arquivos Brasileiros de Ciências da Saúde**, 2011;36(1):48-54.

STABUC-SILIH, M., et al. Polymorphisms in COL4A3 and COL4A4 genes associated with keratoconus. **Mol. Vis.**, 2009;15:2848-2860.

- STRICKLER, A. G.; FAMUDITIMI, K.; JEFFERY, W. R. Retinal homeobox genes and the role of cell proliferation in cavefish eye degeneration. **Int. J. Dev. Biol.**, 2002;46:285-294.
- TANABE, U., et al. Prevalence of keratoconus patients in Japan. **Nihon GakkaiZasshi**, 1985;89:407-11.
- UDAR, N., et al. SOD1 : A candidate gene for keratoconus. **Cornea**, 2006;47:3345-3351.
- VAZIRANI, J.; BASU, S. Keratoconus: current perspectives. **Clinical Ophthalmology**, 2013;7:2019–2030.
- VICENT, A. L., et al. Screening the Visual System Homeobox 1 gene in keratoconus and posterior polymorphous dystrophy cohorts identifies a novel variant. **Mol. Vis.**, 2013;19:852-860.
- WALLANG, B. S.; DAS, S. Keratoglobus. **Eye**, 2013;27:1004-1012.
- WANG, Y., et al. Association of Interleukin-1 Gene Single Nucleotide Polymorphisms with Keratoconus in Chinese Han Population. **Current eye research**, 2015:1-6.
- WELLER, M., et al. Consanguineous unions and the burden of disability: A population-based study in communities of Northeastern Brazil. **American Journal of Human Biology**, 2012;24(6):835-840.
- WHEELER, J., et al. The genetics of keratoconus: a review. **Reproductive Sys Sexual Disord.**, 2012;Suppl 6.
- WILSON, S. A.; LAST, A. Management of corneal abrasions. **Am Fam Physician**, 2004;70(1):123-128.
- ZHANG, J. et al. Association of Common Variants in LOX with Keratoconus: A Meta-Analysis. **PLoS ONE**, 2015;10(12):e0145815.