

**Otávio de Azevedo Magalhães**

**A GENÉTICA DO CERATOCONE**

Tese apresentada à Universidade Federal do  
Rio Grande do Sul para obtenção do título de Doutor  
em Ciências (Genética e Biologia Molecular)

Orientadora: Profa. Dra. Lavínia Schüler-Faccicni

**Porto Alegre**

**2018**

### CIP - Catalogação na Publicação

de Azevedo Magalhães, Otávio  
Genética do Ceratocone / Otávio de Azevedo  
Magalhães. -- 2018.  
86 f.  
Orientadora: Lavinia Schuler-Faccini.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal do Rio  
Grande do Sul, Instituto de Biociências, Programa de  
Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular, Porto  
Alegre, BR-RS, 2018.

1. Genética. 2. Ceratocone. 3. Ectasia . I.  
Schuler-Faccini, Lavinia, orient. II. Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da UFRGS com os  
dados fornecidos pelo(a) autor(a).

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL**

Tese aprovada em 12/12/2018

Elaborada por Otávio de Azevedo Magalhães

**BANCA EXAMINADORA**

Profa. Dra. Juliana Maria Ferraz Sallum

Departamento de Oftalmologia - UNIFESP

---

Prof. Dr. Sérgio Kwitko

Programa de Pós-graduação em Ciências Cirúrgicas – UFRGS

---

Prof. Dr. Claiton Henrique Dotto Bau

Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular - UFRGS

## EPÍGRAFE

*"Toda verdade passa por três estágios.  
No primeiro, ela é ridicularizada.  
No segundo, é rejeitada com violência.  
No terceiro, é aceita como evidente por si própria".*

**Arthur Schopenhauer**



## **DEDICATÓRIA**

Dedico esta tese aos meus pais, José Antônio e Vera Lúcia, pelo exemplo de dedicação profissional e familiar, e à minha esposa Vanessa por me apoiar em todos os momentos e ter nos dado a nossa amada filha Carolina.

## AGRADECIMENTOS

À Profa. Dra. Lavínia Schüler-Faccini por permitir e incentivar a investigação desta instigante área de medicina.

À biomédica Thayne Kowalski pela sua capacidade laboral e habilidades na área de bioinformática.

Ao laboratório de genética em córnea liderado pelo Dr. Anthony Aldave na Universidade da Califórnia, Los Angeles pelo auxílio fundamental no alinhamento dos dados genéticos.

Ao laboratório de genética da UFRGS pelo empenho e disposição dos dados genéticos.

À Dra. Têmis Félix pela sua organização e disponibilidade para discutir assuntos sem o quais esta pesquisa não teria avançado.

À médica residente do Hospital Banco de Olhos de Porto Alegre, Helena Ceccin Rohenkohl pela ajuda e comprometimento com os pacientes.

À estudante Gabriela Wachholz pela vontade e interesse na iniciação ao mundo da pesquisa e ciência.

Ao pesquisador Joel Berwanger pela presteza e agilidade na análises da amostras recebidas.

Aos pacientes e seus familiares pela compreensão e vontade de ajudar a ciência.

## NORMALIZAÇÃO ADOTADA

Esta tese está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento desta publicação:

- Sistema de Bibliotecas da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, seguindo a orientação ABNT NBR 14724 para teses, dissertações e trabalhos de conclusão de curso.
- Referências: adaptado de *International Committee of Medical Journals Editors (Vancouver)*.
- Abreviaturas dos títulos dos periódicos de acordo com *List of Journal Indexed in Index Medicus*.

## LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

<b>SD</b>	-----	desvio padrão ( <i>Standard Deviation</i> )
<b>PCR</b>	-----	reação em cadeia da polimerase ( <i>Polymerase Chain Reaction</i> )
<b>SNP</b>	-----	polimorfismos de nucleotídeo único ( <i>Single Nucleotide Polymorphism</i> )
<b>EDS</b>	-----	síndrome de Ehlers-Danlos Syndrome ( <i>Ehlers-Danlos Syndrome</i> )
<b>OI</b>	-----	osteogênese imperfeita ( <i>Osteogenesis Imperfecta</i> )
<b>LCA</b>	-----	amaurose congênita de Leber ( <i>Leber Congenital Amaurosis</i> )
<b>POAG</b>	-----	glaucoma primário de ângulo aberto ( <i>Primary Open Angle Glaucoma</i> )
<b>BCS</b>	-----	síndrome da córnea quebradiça ( <i>Brittle Cornea Syndrome</i> )
<b>GWAS</b>	-	Estudo de associação ampla do genoma ( <i>Genome Wide Association Study</i> )
<b>WES</b>	-----	sequenciamento do exoma inteiro ( <i>Whole Exome Sequencing</i> )
<b>HGMD</b>	-	base de dados de mutações de genes humanos ( <i>Human Gene Mutation Database</i> )
<b>mRNA</b>	-----	RNA mensageiro ( <i>Messenger RNA</i> )
<b>BMP4</b>	-----	proteína morfogenética óssea 4 ( <i>Bone Morphogenetic Protein 4</i> )
<b>ZNF469</b>	-----	proteína nucleose dedo de zinco ( <i>Zinc Finger Protein 469</i> )
<b>IL-1</b>	-----	interleucina ( <i>Interleukin 1</i> )
<b>COL1A1</b>	-----	colágeno tipo I cadeia alfa I ( <i>Collagen Type I Alpha I chain</i> )
<b>COL1A2</b>	-----	colágeno tipo I cadeia alfa II ( <i>Collagen Type I Alpha II chain</i> )
<b>VSX1</b>	-----	Homeobox do sistema visual 1 ( <i>Visual System Homeobox 1</i> )
<b>CCT</b>	-----	espessura central da córnea ( <i>Central Cornea Thickness</i> )
<b>CFL1</b>	-----	cofilina 1 humana ( <i>Human Cofilin-1</i> )
<b>MMP</b>	-----	Metaloproteinase Matriz ( <i>Matrix Metalloproteinase</i> )
<b>MRVI1</b>	-	proteína murina de integração retroviral ( <i>Murine Retrovirus Integration Site</i> 1)
<b>GRCC10</b>	-----	gene cluster rico gene C10 ( <i>Gene Rich Cluster C10 Gene</i> )
<b>ARC</b>	-----	raio de curvatura anterior ( <i>Anterior Radius of Curvature</i> )

**PCR** ----- raio de curvatura posterior (*Posterior Radius of Curvature*)

**K** ----- Ceratometria (*Keratometry*)

® ----- marca registrada

## RESUMO (LÍNGUA VERNÁCULA)

Nas últimas décadas, o ceratocone tem sido descrito como uma doença multifatorial envolvendo complexas interações entre fatores genéticos e ambientais, que contribuem para a manifestação da doença. A identificação dessa doença em gêmeos monozigóticos chamou a atenção para seu componente genético. Apesar da forma esporádica ser considerada a apresentação mais comum, a história familiar positiva é vista em aproximadamente 11% dos pacientes. Um estudo há mais de duas décadas relatou o aumento da presença de KC em parentes de primeiro grau de indivíduos afetados, correspondendo a 15 a 65 vezes a da população em geral. Um grande número de genes candidatos tem sido estudado em relação à patogênese do ceratocone. No entanto, a maior parte desses resultados não foram confirmados. Casos familiares oferecem uma oportunidade para identificar novas associações genéticas e posteriormente testar a segregação de tais variantes com a doença. A característica da ectasia corneana é o adelgaçamento progressivo e a protrusão que ocorre naturalmente ou cirurgicamente. Associações genéticas têm sido descritas entre ceratocone e desordens do tecido conectivo, juntamente com colágeno anormal, incluindo síndrome de Ehlers-Danlos, displasia congênita do quadril, síndrome de Marfan e osteogenesis imperfecta (OI). A OI é uma desordem hereditária rara, causada principalmente por mutações no gene *COL1A1* ou *COL1A2*. O colágeno tipo I constitui aproximadamente 60% do total de colágeno corneano humano e compõe a maior parte do colágeno escleral. Essas condições foram postuladas ser diretamente atribuídas à composição anormal de fibras de colágeno. Para explorar essas hipóteses, realizamos a análise do sequenciamento total do exoma humano (WES) em duas famílias não relacionadas para avaliar se quaisquer variantes genéticas poderiam ter um papel importante na patogênese do ceratocone. Além disso, avaliamos os perfis corneanos de indivíduos com OI devido à mutação do gene do colágeno I.

## RESUMO (LÍNGUA INGLESA)

Recently, keratoconus has been described as a multifactorial disease involving complex interactions between genetic and environmental factors, which contribute to the manifestation of the disease. The identification of keratoconus in monozygotic twins brought attention to its genetic component. Although the sporadic form is considered the most common presentation, positive family history is seen in approximately 11% of patients. An earlier study reported an increased prevalence of KC in first-degree subjects, corresponding to 15 to 65 times that of the general population. A large number of candidate genes have been studied regarding the pathogenesis of keratoconus. However, most of these genes were not confirmed. Family cases provide an opportunity to identify new genetic associations and subsequently test the segregation of such variants with the disease. The characteristic of corneal ectasia is progressive thinning and protrusion that occurs naturally or surgically. Genetic associations have been described between keratoconus and connective tissue disorders, along with abnormal collagen, including Ehlers-Danlos syndrome, congenital hip dysplasia, Marfan syndrome and Osteogenesis imperfecta (OI). OI is a rare hereditary disorder, mainly caused by mutations in the *COL1A1* or *COL1A2* gene. Type I collagen constitutes approximately 60% of the total human corneal collagen and makes up most of the scleral collagen. These conditions were postulated to be directly attributed to the abnormal composition of collagen fibers.

To explore these hypotheses, we performed the analysis of total human exome sequencing (WES) in two unrelated families to assess whether any genetic variants could play a significant role in keratoconus pathogenesis. In addition, we evaluated the corneal profiles of individuals with OI due to the mutation of the collagen I gene.

## SUMÁRIO

<b>1 – INTRODUÇÃO</b> .....	12
1.1 - ASSOCIAÇÃO COM OUTRAS DOENÇAS GENÉTICAS E AGREGAÇÃO FAMILIAR .....	18
1.2 - PADRÕES DE HERANÇA.....	18
1.3 - GENÉTICA MOLECULAR .....	18
1.3.1 - ESTUDOS DE ASSOCIAÇÃO AMPLA DO GENOMA (GWAS) .....	20
1.3.2 - SEQUENCIAMENTO DE NOVA GERAÇÃO (WES) .....	20
1.4 - GENÉTICA DO COLÁGENO .....	21
1.5 – EXPRESSÃO GÊNICA .....	22
<b>2 - JUSTIFICATIVA.....</b>	<b>24</b>
2.1 – OBJETIVO GERAL.....	24
2.2 – OBJETIVO SECUNDÁRIO .....	24
<b>3 - CAPÍTULO 1</b> .....	<b>26</b>
3.1 - ARTIGO 1 .....	26
3.2 - TABELAS ARTIGO 1 .....	39
3.3 - FIGURAS ARTIGO 1 .....	40
<b>4 - CAPÍTULO 2</b> .....	<b>41</b>
4.1 - ARTIGO 2 .....	41
4.2 - TABELAS ARTIGO 2 .....	53
4.3 - FIGURAS ARTIGO 2 .....	55
<b>5 – DISCUSSÃO GERAL.....</b>	<b>57</b>
<b>6 – CONCLUSÃO</b> .....	<b>60</b>
<b>7 – CONSIDERAÇÕES FINAIS</b> .....	<b>61</b>
<b>8 - REFERÊNCIAS</b> .....	<b>62</b>
<b>9 – ANEXOS</b> .....	<b>76</b>
9.1 - ANEXO 1. APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA MÉDICA.....	76



9.2 ANEXO 2. TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO.....	80
9.3 ANEXO 3. PUBLICAÇÃO EM REVISTA INDEXADA.....	82
9.3 ANEXO 4. ACEITE EM REVISTA INDEXADA.....	83

## 1. INTRODUÇÃO

O ceratocone (OMIM148300) tradicionalmente é descrito como uma degeneração ectásica progressiva não-inflamatória da córnea.<sup>1-5</sup> É considerado uma das principais causas de transplante de córnea em todo o mundo, sendo que no Brasil ainda é considerado a principal causa.<sup>2,5</sup> Sua manifestação clínica geralmente inicia-se na puberdade, podendo estabilizar, avançar lentamente até a quarta década de vida ou progredir rapidamente necessitando ceratoplastia.<sup>1,3</sup> Observa-se neste período progressivo afinamento e protrusão da região central da córnea. Essa distorção provoca erros refrativos, aberrações e conseqüente baixa de acuidade visual, podendo inclusive provocar cegueira legal.<sup>1,2</sup> Devido ao seu maior entendimento e exames de imagem mais avançados, diagnostica-se pacientes cada vez mais cedo e em maior número.<sup>6</sup> Pode ser visto em todas as etnias sem prevalência por gênero, apresentando sintomas variados conforme o estágio da doença.<sup>2,3</sup> Sua prevalência na literatura oscila muito (37 a 2300 casos por 100.000 indivíduos) conforme sua localização, acesso populacional aos meios saúde e critérios utilizados.<sup>3,7,8</sup> As descrições de maior prevalência mundiais estão no Oriente Médio e na zona rural da Índia, e isso pode ocorrer pelo clima ou consanguinidade encontrado nestes locais.<sup>9,10</sup>

A suspeita diagnóstica acontece quando um paciente, normalmente na adolescência, apresenta diminuição progressiva da visão, não conseguindo atingir visão de 20/20 (100% de eficiência visual) com a melhor correção óptica em um ou em ambos os olhos.<sup>1,3</sup> Trocas frequentes de óculos ou lentes de contato são necessárias nesse período. A qualidade visual é reduzida, podendo o paciente observar múltiplas imagens de um mesmo objeto (poliopia), “fantasmas”, diplopia

monocular, aumento da sensibilidade à luz (fotofobia) e *glare*. Os achados oftalmológicos clássicos são reflexo em tesoura à retinoscopia, presença de depósito férrico circundando a base do ceratocone (anel de *Fleischer*), linhas verticais esbranquiçadas no estroma central do ápice corneano (estrias de *Vogt*), além de cicatriz no estroma central e afinamento junto ao ápice à biomicroscopia em casos avançados. Outros sinais são visualizados sem o auxílio do microscópio, como o da gota de óleo observado através do reflexo vermelho à oftalmoscopia direta (sinal de *Charleaux*) e o reflexo nasal em forma de seta à iluminação temporal da córnea (sinal de *Rizutti*).<sup>11</sup> Por último, é possível visualizar o formato cônico da córnea à descensão ocular junta à pálpebra inferior (sinal de *Munson*).<sup>2,11</sup> A média de idade do diagnóstico entre os pacientes que necessitarão ceratoplastia por ceratocone é de 15,4 anos (SD  $\pm 3.95$ ).<sup>11</sup> O curso da doença pode apresentar uma progressão rápida, com necessidade de realizar procedimento para sua estabilização ou transplante de córnea ainda na adolescência, ou estabilizar na fase adulta, podendo inclusive ser identificado na quinta ou sexta década como um achado eventual em um exame oftalmológico.<sup>12</sup>

Anatomicamente, todas as camadas corneanas podem estar envolvidas na doença avançada. A tríade clássica do ceratocone ao exame anatomopatológico consiste no afinamento do estroma corneano, quebras na camada de Bowman e depósitos de ferro na camada basal do epitélio.<sup>13</sup> Os achados no estroma corneano incluem compactação e perda do arranjo das fibras de colágeno na sua porção anterior, diminuição no número de lamelas de colágeno e substituição de ceratócitos por fibroblastos normais e degenerativos.<sup>14</sup> As alterações histopatológicas iniciais demonstram distensão da camada de Bowman, que é substituída por ceratócitos e material colágeno. O epitélio é irregular em espessura (afinado na região de maior abaulamento) e sua membrana basal alterada nas áreas com comprometimento da camada de Bowman.<sup>15</sup> A membrana de Descemet é afetada nos raros casos de

hidrópsia aguda, em que há uma quebra da sua integridade provocando edema significativo do estroma corneano.<sup>15</sup> Há uma separação dessa em relação à superfície posterior do estroma e uma importante retração, formando rolos ou saliências. Em até 4 meses o endotélio se estenderá sobre a membrana de Descemet e estroma desnudado e reestabelecerá sua integridade.<sup>15</sup> O endotélio dos pacientes com ceratocone geralmente é normal.<sup>16</sup> Do ponto de vista bioquímico, a degradação da membrana basal do epitélio corneano, a diminuição das fibrilas de colágeno e a apoptose dos ceratócitos são eventos apontados como responsáveis pelo seu progressivo afinamento.<sup>17,18</sup>

O diagnóstico do ceratocone pode ser feito tanto pelo exame clínico biomicroscópico em casos moderados e avançados, quanto por exames complementares de imagem em casos incipientes. Na última década, novos equipamentos de tomografia permitiram avaliar não somente a ceratometria e curvatura anterior, como toda a espessura (mapa paquimétrico) e a curvatura posterior da córnea.<sup>6</sup> Esses novos métodos possibilitam o diagnóstico precoce, identificando casos subclínicos anteriormente não visualizados à ceratometria e topografia simples. A identificação de casos frustros e incipientes são fundamentais para determinar o verdadeiro modo de herança e construir o heredograma em famílias com ceratocone.<sup>19</sup> *Rabinowitz*, em extensa revisão da literatura anterior à introdução da tomografia de córnea, sugeriu que somente com equipamentos que possibilitassem a detecção precoce e precisa do ceratocone seria possível construir heredogramas e investigar o papel dos genes na sua fisiopatologia.<sup>2</sup>

A etiologia dessa condição é provavelmente multifatorial, ou representa o caminho final para uma variedade de diferentes processos patológicos.<sup>13,14</sup> Fatores ambientais como o ato de coçar os olhos e a associação com doenças atópicas foram descritos por diversos autores.<sup>20,21</sup> Também há uma clara contribuição da

genética na patogênese do ceratocone. Isto é evidenciado pela herança familiar do ceratocone, pela maior concordância entre gêmeos monozigóticos em relação aos dizigóticos; e sua associação com outras doenças genéticas conhecidas, como a síndrome de Down.<sup>22</sup>

## **1.1 ASSOCIAÇÃO COM OUTRAS DOENÇAS GENÉTICAS E AGREGAÇÃO FAMILIAR**

O ceratocone é predominantemente encontrado como uma condição clínica isolada.<sup>3</sup> A associação entre ceratocone, síndrome de Down e diversas doenças genéticas raras como a amaurose congênita de Leber (LCA), síndrome de Marfan, osteogênese imperfeita (OI) e Ehlers-Danlos (EDS) foi relatada.<sup>22-25</sup> A relação direta entre essas doenças e a ectasia corneana não é totalmente esclarecida. Entre as possíveis associações descritas estão desde as mutações do metabolismo colágeno, principal componente da córnea, até o estímulo mecânico direto, como no sinal óculo-digital de Franceschetti na LCA e quadros atópicos na síndrome de Down.<sup>22,26</sup>

Uma revisão de relatos recente indica uma provável relação genética entre afinamento corneano em diferentes doenças. Variantes do gene *ZNF469* possivelmente contribuam com a redução da diminuição da curvatura central no ceratocone e com a síndrome da córnea frágil (BCS), assim como variantes no gene *COL5A1* no ceratocone e EDS.<sup>23</sup> O ceratocone é comumente uma manifestação da BCS e EDS, que normalmente dividem sintomas similares. Portanto, a via molecular que leva ao afinamento corneano pode ser comparável nessas doenças. Da mesma forma, variantes no gene *COL1A1* podem potencialmente ser responsável pelo afinamento corneano na OI, glaucoma primário de ângulo aberto (POAG) e miopia, porém mais dados são necessários.<sup>22</sup> Diferentes variantes no mesmo gene podem contribuir para a redução na espessura da córnea nessas doenças. Uma conexão

reversa entre o POAG e o ceratocone em relação ao gene *FNDC3B* foi observada em um estudo que indicava uma provável relação entre o ceratocone e o POAG.<sup>27</sup> A OI pode estar relacionado ao BCS e ao POAG.<sup>27</sup> Como a OI compartilha várias características clínicas comuns com o BCS, como córnea fina, esclera azul, pele elástica, anomalias dentárias e perda auditiva condutiva, existe uma hipótese de que o gene *ZNF469* seja um gene candidato em pacientes com OI que não têm mutação no gene *COL1A1* ou *COL1A2*. A córnea fina não parece por si só ser um fator de risco para ceratocone e miopia, porque seu afinamento ocorre devido à progressão desses distúrbios. Na Figura 1 podemos observar a relação genética e fenotípica entre doenças com baixa espessura central da córnea (CCT).

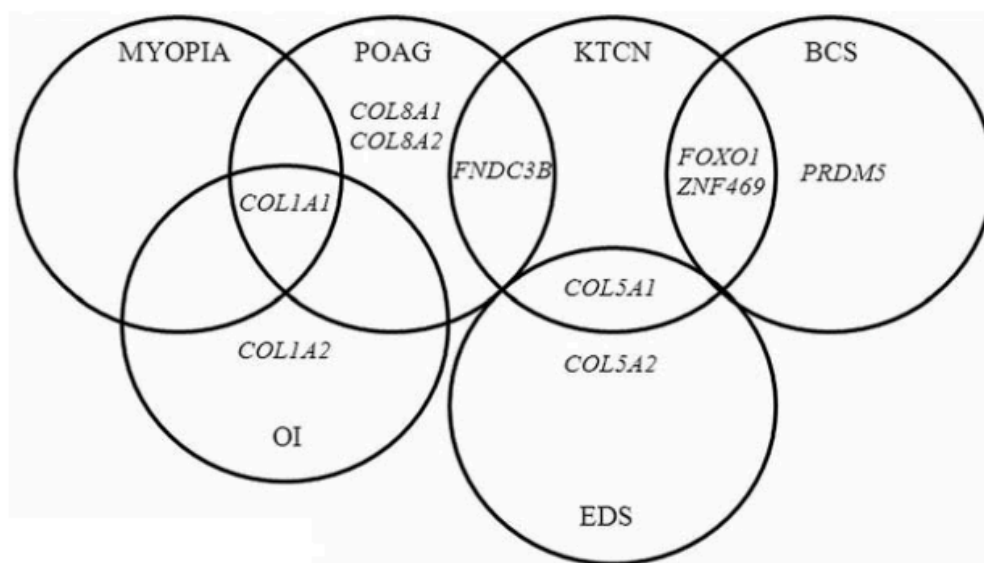


Figura 2. Relação entre os genes que possivelmente estejam envolvidos no afinamento corneano e doenças relacionados. POAG: glaucoma primário de ângulo aberto; BCS: síndrome da córnea quebradiça; KTCN: ceratocone; OI, osteogênese imperfecta; EDS: síndrome de Ehlers–Danlos syndrome; Myopia: miopia. Adaptado Swierkowska J<sup>27</sup>

O primeiro forte indício do papel da genética na patogênese do ceratocone foi a concordância desta doença em gêmeos monozigóticos.<sup>28-30</sup> Em um estudo com 18

pares de gêmeos, todos os 13 indivíduos monozigóticos apresentaram concordância fenotípica, enquanto 4 dos 5 dizigóticos mostraram as mesmas características corneanas.<sup>29</sup> Além da maior prevalência em gêmeos, a história familiar positiva está presente em uma minoria significativa dos casos, evidenciando que uma de suas principais causas é a genética.<sup>31</sup> Alguns estudos mostraram até 11% de história familiar positiva nos portadores de ceratocone.<sup>32,33</sup> Casos mais recentes e com maior número de portadores demonstraram prevalência de 3,34% em indivíduos de primeiro-grau, correspondendo de 15 a 65 vezes a mais em relação à população em geral.<sup>34</sup>

## **1.2 PADRÕES DE HERANÇA**

A maioria dos estudos sugere um padrão de herança autossômica dominante com penetrância incompleta e expressividade variável.<sup>33,35</sup> O grau de penetrância observado foi de aproximadamente 20%.<sup>35,37</sup> Outros padrões de herança também foram descritos, como autossômico recessivo e não-mendeliano complexo.<sup>34,38</sup> O aumento da prevalência do ceratocone em populações com alta incidência de casamentos consanguíneos também sugere um padrão recessivo de herança.<sup>10</sup> Apenas um estudo relatou a associação do ceratocone com uma doença com herança dominante ligado ao cromossomo X.<sup>39</sup> Devido à prevalência estimada do ceratocone ser praticamente a mesma entre homens e mulheres na maioria das populações, não há motivo para acreditar que seu padrão de herança seja ligado ao cromossomo sexual. É preciso salientar também, que boa parte dos estudos que avaliaram o padrão de herança do ceratocone aconteceram antes do advento do tomógrafo de córnea e por isso, não levaram em consideração formas subclínicas ou frustras do ceratocone, que é uma forma abortiva da desordem e não representa o padrão de normalidade da córnea.

### 1.3 GENÉTICA MOLECULAR

O primeiro estudo molecular realizado em córneas com ceratocone identificou o aumento da expressão gênica de RNA mensageiro (RNAm) da enzima lisossomal *catepsina G*.<sup>40</sup> A partir do começo deste século, outros estudos descreveram *linkage* em pelo menos dez diferentes cromossomos (21, 20q12, 20 p11-q11, 17, 16q, 15q, 14q11.2, 14q24.3, 13, 9, 5q14.3-q21.1, 5q32-33, 3p14-q13, 2p24 e 2q21.3) em pacientes com ceratocone.<sup>41-52</sup> A primeira mutação a ser estudada foi o gene *visual system homeobox 1 (VSX1)*. Detectado em algumas populações específicas e pesquisado há mais de 10 anos, não existe consenso sobre seu efeito.<sup>53-56</sup> Casos esporádicos de ceratocone não mostraram diferença quando comparados a controles em relação à prevalência de mutações nesse gene.<sup>57,58</sup> Por sua vez, um defeito no gene *superóxido dismutase 1 (SOD1)*, que está localizado no cromossomo 21 e associado à síndrome de Down pode ter relação com o aumento do dano oxidativo na córnea e afinamento.<sup>59</sup> Estudos mostraram que elementos desencadeadores desse dano, como o peróxinitrito e o óxido nítrico podem aumentar a degradação enzimática encontrada no estroma corneano em pacientes com ceratocone.<sup>60</sup> Por sua vez, o gene *RAB3GAP1* que decodifica a subunidade catalítica da *Rab3 GTPase* da proteína *RAB3GAP*, é um importante regulador da exocitose na transmissão hormonal e neurotransmissora mediada pelo cálcio.<sup>61,62</sup> Múltiplas mutações foram observadas no gene *RAB3GAP1* em pacientes com síndrome de Warburg micro, uma doença autossômica recessiva caracterizada por inúmeros defeitos no desenvolvimento neurológico e ocular, incluindo microcórnea, atrofia óptica e catarata congênita.<sup>63,64</sup> Recentemente, observou-se que variantes do gene decodificador da enzima *lisiloxidase (LOX)* localizado no *locus* 5q23.2 podem estar envolvidas com o desenvolvimento do ceratocone, tanto em casos esporádicos como familiares. Essa proteína é responsável por iniciar o *cross-linking* entre o colágeno e a elastina, através da catalisação do grupo *amino-epsilon* em



determinados resíduos de lisina.<sup>65</sup> Acredita-se que a combinação de determinados alelos em certos nucleotídeos simples possam afetar o balanço e a interação dessas isoformas, gerando enfraquecimento e protrusão da córnea.<sup>66</sup>

### **1.3.1 ESTUDOS DE ASSOCIAÇÃO AMPLA DO GENOMA (GWAS)**

Nos últimos 10 anos, estudos de associação ampla do genoma expandiram o conhecimento sobre as doenças oculares. Estes permitiram analisar em larga escala milhões de marcadores SNPs (polimorfismos de nucleotídeo único) em todo o genoma através de *microarrays*. A maioria dos GWAS são projetados para um grande número de pacientes e comparados a uma grande coorte de controle. Pesquisas longitudinais independentes europeias identificaram através da CCT a associação entre os *loci FOXO1*, *FNDC3B* e ceratocone.<sup>67,68</sup> Um estudo de coorte americano encontrou associação com o gene *COL5A1* utilizando também o GWAS.<sup>69</sup> A CCT também foi utilizada em uma coorte australiana, que replicou dois polimorfismos identificados nos genes *MPDZ-NF1B* e *ZNF469*.<sup>70,71</sup> Os latinos também foram avaliados pela CCT, e o gene *LOC100506532* localizado entre a região *RXRA* e *COL5A1* do cromossomo 9 pode ser considerado uma variante funcional nessa população.<sup>72</sup> Também foi observado aumento no número de cópias de DNA mitocondrial em um estudo de GWAS, o que pode indicar defeitos na cadeia respiratória dessa organela em pacientes com ceratocone.<sup>73,74</sup>

### **1.3.2 SEQUENCIAMENTO DE NOVA GERAÇÃO - Estudo do Exoma (*Whole Exome Sequencing – WES*):**

Nos últimos anos, com a importante redução dos custos do sequenciamento de nova geração, possibilitou-se o aumento da rapidez e acurácia diagnóstica dos testes genéticos. A partir de 2012 iniciaram-se os sequenciamentos nos maiores centros universitários do mundo. Em apenas um exame de sangue ou saliva é

possível investigar mais de 20.000 genes.<sup>75</sup> O exoma é a parte codificante do genoma humano, correspondendo a apenas 1% do seu total. Até o presente momento, as mutações presentes nas regiões codificantes de proteínas contabilizam cerca de 85% de todas conhecidas até o momento. A estratégia mais utilizada para a identificação de variantes funcionais é a de trio. Nessa estratégia é realizado o sequenciamento do probando e de seus pais. Uma média de 60 milhões de pares independentes ou 9,7 *Gigabytes* de dados de sequência são gerados por amostra. Isso permite abranger 100 vezes a região de referência dos éxons codificadores de proteína e a região dos flancos intrônicos, com mais de 94% dessas bases relatadas no *Human Gene Mutation Database (HGMD)* e uma cobertura de 10 vezes ou mais. Outra parte desafiante do teste é a interpretação das variantes no contexto dos bancos de dados disponíveis. Após a extração dos dados em formato primitivo, é necessário realizar o alinhamento da sequência de DNA. Somente após esta etapa torna-se possível avaliar as variantes de cada indivíduo ou sua associação em diversos *softwares* com extensos bancos de dados e informações gênicas de diversas populações. Com isso, é possível identificar e comparar a frequência de alelos raros em indivíduos saudáveis e acometidos por determinada doença. Por último, a interpretação das mutações e suas alterações fenotípicas exigem a formação de uma equipe multidisciplinar capaz de validar as informações obtidas. A análise do WES já mostrou associação com o aumento de diagnósticos moleculares de condições raras.<sup>76</sup>

#### **1.4 GENÉTICA DO COLÁGENO**

O afinamento da córnea no ceratocone parece resultar da perda de componentes estruturais. Muitos pesquisadores acreditam que esse processo esteja relacionado com alterações bioquímicas das fibras do colágeno corneano.<sup>11</sup> Os colágenos tipos I, III, IV, V, VI, VII e VIII foram identificados na córnea (Tabela 1). As distribuições desses diferentes tipos de colágeno nas seções corneanas estudadas apareceram

inalteradas no ceratocone, sendo a única diferença observada a presença de tecido cicatricial na camada de Bowman de algumas amostras.<sup>77</sup> Experimentos de imunofluorescência em segmentos da córnea também revelaram que a distribuição das bases do colágeno são dependentes da idade, sendo essa característica não alterada no ceratocone.<sup>77</sup> Com base em achados ultra-estruturais, autores postulam que as enzimas lisossomais são liberadas após a degeneração das células epiteliais, levando a rupturas observadas na membrana basal adjacente e nos tecidos estromais subjacentes.<sup>78</sup> Tais processos de degradação proteolítica afetariam principalmente componentes da matriz extracelular sensível à proteinase, tais como os proteoglicanos de queratano e o sulfato de dermatano.

Tabela 1. Conteúdo e tipo de colágeno estimado na córnea de um adulto sem alteração (% relativa ao peso seco da córnea)<sup>77</sup>

Tipo I	50 – 55%
Tipo III	<1%
Tipo IV	<1%
Tipo V	8-10%
Tipo VI	25-30%
Tipo VII	<1%
Tipo VIII	<1%
Total colágeno	90-95%

A análise dos genes *COL4A1* e *COL4A2* em 15 famílias equatorianas com ceratocone, somados ao estudo de *COL8A1* e *COL8A2* em 50 pacientes com ceratocone não-relacionados, não detectou quaisquer variante patogênica.<sup>79,80</sup> No entanto, em outro estudo populacional, variantes no gene *COL5A1* apresentaram uma associação significativa com o risco em pacientes com ceratocone.<sup>67</sup> É provável que essas variantes possam ter uma influência no afinamento da córnea no ceratocone e EDS, uma vez que as vias moleculares da redução da CCT em ambas as doenças podem ter alguns elementos semelhantes.

## 1.5 EXPRESSÃO GÊNICA NO CERATOCONE

Diversos estudos apontam que o afinamento da córnea no ceratocone ocorre como resultado da degradação do colágeno corneano.<sup>81-88</sup> Atividades enzimáticas alteradas e estresse oxidativo têm sido propostos como fatores relacionados à patogênese das ectasias corneanas.<sup>89-91</sup> Os níveis de metaloproteinases da matriz 2 e 9 (*MMP-2* e *MMP-9*) demonstraram estar aumentados em córneas com ceratocone em comparação a córneas normais, e os níveis de inibidores de proteinases nos tecidos mostraram estar diminuídos nas córneas com ceratocone, como o inibidor da  $\alpha$ 1-protenase.<sup>88,89</sup> Possivelmente, a desorganização ultraestrutural dos componentes da matriz, causada por degradação proteolítica e reparo incompleto, seja responsável pela redução da resistência mecânica dos tecidos no ceratocone.

Em geral, os dados dos estudos de expressão gênica sugerem envolvimento dos genes envolvidos na apoptose, diferenciação celular, e vias de proliferação que suporta a via proteômica na patogênese do ceratocone. Infelizmente, nenhum dos estudos ajudou a validar genes identificados a partir de dados genéticos baseados em DNA, com a exceção de genes da matriz extracelular (*TIMP1* e *TIMP3*).<sup>90</sup> Poucos estudos investigaram o transcriptoma de mRNA para identificar genes e vias da doença.<sup>91,92</sup> A análise de microarrays de 11 pacientes com ceratocone e 8 com epitélio normal identificou 47 genes que foram sobrerregulados e 9 genes que foram reprimidos. O gene *KRT72* foi o gene mais supra-regulado neste estudo.<sup>93</sup> Outro estudo identificou genes em via de apoptose que foram diferencialmente expressos sugerindo um papel no afinamento estromal.<sup>94</sup> A análise diferencial baseada em PCR no estroma corneano de fibroblastos cultivados em córneas normais e com ceratocone evidenciou aumento da expressão de genes expressos em ceratócitos

humanos (*BMP4*, *CFL1* e *MRVI1*) e redução de outros (*ACTA2*, *GRCC10*, *TIMP1*, *TIMP3* e *SSTR1*).<sup>95</sup> *Wilson et al* demonstrou que a perda dos ceratócitos do estroma anterior, que ocorre tanto na abrasão epitelial como na ablação subepitelial, é o provável agente responsável pela apoptose celular nessa camada.<sup>96</sup> A interleucina-1 (IL-1) foi apontada como responsável por essa sinalização. Foi demonstrado que a IL-1 provoca morte e quimiotaxia negativa dos ceratócitos *in vitro*. Além disso, pode regular a expressão das colagenases metaloproteinases e fatores de complemento. Por fim, esse mesmo autor demonstrou que foi encontrado 4 vezes mais receptores de IL-1 nas córneas com ceratocone em relação às normais.<sup>96</sup>

## **2. JUSTIFICATIVA**

Uma vez que diversos genes foram descritos na literatura internacional e implicados ao aparecimento do ceratocone, pretendemos identificar se essas variantes podem estar relacionadas ao seu desenvolvimento em indivíduos brasileiros.

### **2.1 OBJETIVO GERAL**

Investigar o papel da genética na patogênese do ceratocone, através do sequenciamento do exoma humano em famílias brasileiras não-relacionadas.

### **2.2 OBJETIVO SECUNDÁRIO**

Definir o perfil corneano de pacientes com osteogênese imperfeita (mutação no colágeno do tipo I).

### 3. CAPÍTULO 1

#### 3.1 ARTIGO 1

##### **Whole-Exome Sequencing in Familial Keratoconus: The Challenges of a Genetically Complex Disorder.**

Otavio A. Magalhaes<sup>1</sup>, MD, MSc; Thayne W. Kowalski<sup>2</sup>, MSc; Gabriela E. Wachholz<sup>2</sup>,  
Lavinia Schuler-Faccini<sup>2</sup>, MD, PhD.

**Financial support:** The Brazilian National Council for Scientific and Technological Development. The funding organization had no role in the design or conduct of this research.

**Conflict of interest:** No conflicting relationship exists for any author.

**Running head:** Whole-Exome Sequencing in Familial Keratoconus

**Address for reprints (corresponding author):** 333 Mostardeiro Street, Office 503. Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil. Email: [otaviomaga@yahoo.com.br](mailto:otaviomaga@yahoo.com.br). Telephone +55(51)98148-8104

##### **Authors' affiliations:**

1 – Genetic and Molecular Biology Post-Graduation Program, PhD Candidate at Federal University of Rio Grande do Sul, Brazil. Porto Alegre Eyes Bank Hospital.

2 – Genetic and Molecular Biology Post-Graduation Program, Federal University of Rio Grande do Sul, Brazil.

**Key words:** Keratoconus, Whole-exome sequencing, Next generation sequencing; ectasia; genetics

## **ABSTRACT**

### **Objective**

The underlying genetic causes of keratoconus (KCN) remain largely unknown. To address this, we conducted whole-exome sequencing (WES) in two Brazilian families with KCN.

### **Methods**

WES was performed on six KCN-affected individuals of two unrelated pedigrees from Southern Brazil. Candidate gene filtering was used to identify pathogenic variants in a modified-trio analysis (one parent and two children). All affected subjects underwent detailed corneal tomography evaluation. Variants that were clinically relevant and present in affected individuals at minor allele frequencies <1% were evaluated in the 1000 Genomes Project single nucleotide polymorphism, ABraOM and transcription gene (RefSeq and Ensembl) databases.

### **Results**

A sequence variant in chromosome 1 (q21.3), within the filaggrin (*FLG*) gene was observed in family 1. All tested family members shared a heterozygous missense pathogenic variant in the c.4678C>T position. In family 2, exome analysis indicated a sequence variant in chromosome 16 (q24.2) within the zinc finger 469 encoding gene (*ZNF469*). Family 2 members shared a heterozygous missense variant in the c.1489G>A position. The exomes of the two families were also evaluated for variants in the genes that were shared among all affected individuals. Filtering criteria did not identify any rare sequence variants in a single gene that segregated in both families.



## **Conclusion**

Our findings indicate that a complete genotype–phenotype correlation could not be observed, suggesting that KCN is a genetically heterogeneous disorder. In addition, we believe that WES based segregation analyses might not be the best strategy to identify variants in isolated KCN families.

**Keywords:** keratoconus; cornea ectasia; whole-exome sequencing; next-generation sequencing.

## INTRODUCTION

Massively-parallel DNA sequencing (next-generation sequencing) technology has emerged as an important method of identifying pathogenic variants that cause thousands of serious conditions.<sup>1</sup> Recent developments in sequencing technology have now reached the point at which a genome can be sequenced within a few days for a reasonable cost.<sup>2</sup> These extraordinary developments may revolutionize diagnosis of any disorder with a genetic background and improve understanding of the mechanisms behind many diseases.<sup>1</sup> Accurate clinical interpretation of whole-exome sequencing (WES) data, which comprises the whole protein-coding region of the genome, is challenging as it requires expertise in molecular diagnosis and genetic counseling in addition to a bioinformatics specialist's knowledge of the patient's suspected or diagnosed disease.<sup>2</sup>

Keratoconus (KCN) (OMIM148300) has been traditionally described as a progressive non-inflammatory thinning and protrusion of the central cornea. Its clinical manifestation usually begins at puberty and may stabilize, advance slowly to the fourth decade of life, or progress rapidly to the point of needing a corneal transplant.<sup>3,4</sup> Over recent decades, KCN has been described as a multifactorial disease involving complex interactions between genetic and environmental factors, which contribute to the disease's manifestation.<sup>4,5</sup> Identification of this disease in monozygotic twins has drawn attention to its genetic component.<sup>6</sup> Despite the sporadic form being considered the most common presentation, positive family history is seen in approximately 11% of patients.<sup>7</sup> A previous study reported a prevalence of 3.34% of KCN in first-degree subjects, corresponding to 15–65 times that found in the general population.<sup>8</sup> Several surveys indicate that the most likely

pattern of inheritance is autosomal dominant with incomplete penetrance or variable expressivity.<sup>9-11</sup> A large number of candidate genes have been studied in relation to KCN pathogenesis.<sup>12,13</sup> Nevertheless, the majority of these genes have not been confirmed. To explore the genetic basis of KCN, we undertook WES analysis in two families in order to assess whether any genetic variants could play a major role in the KCN pathogenesis.

## **METHODS**

This study was approved by the Federal University of Rio Grande do Sul Clinical Hospital Ethical Committee/Review Board (under protocol number 15-0559 and CAAE 49171315.0.0000.5327) and adhered to the principles of the Declaration of Helsinki. Written consent for genetic analysis was obtained from all participants.

### **Clinical Evaluation**

Two pedigrees with previous KCN diagnosis underwent complete ophthalmic examination and corneal tomography.

Family 1 was composed of a mother and her two daughters (Figure 1). The father was deceased, and his data was not available. The mother later had dizygotic male twins with another man (without KCN). The oldest daughter presented *Vogt's* striae in both corneas based on biomicroscopy. She had been subjected to intra-corneal ring segment (ICRS) implantation in the left eye at the age of 23. The mother and the youngest daughter exhibited slightly conical and thin corneas based on ophthalmic examination. Both daughters used rigid contact lenses to correct compound myopic astigmatism. One of the twins presented subclinical KCN (forme fruste) identified by corneal tomography. The other twin had a normal corneal profile without thinning or topographic alteration.

Family 2 was composed of a keratoconic mother and her two sons, both with KCN. The mother exhibited slightly conical and thin corneas upon ophthalmic

examination. One son had been subjected to corneal transplantation in the right eye and corneal collagen crosslinking (CXL) in the left. The oldest son had been subjected to CXL in the right eye and had an indication of ICRS in the left. The father had a normal corneal profile without thinning or topographic alteration.

Both families were considered to be of Caucasian European descent. There was no relationship between the two families. The tomography parameters are given in Table 1 and 2.

### **Exome sequencing**

DNA sequencing and candidate gene analyses were performed in three affected members of each family in a modified-trio setting (the mothers and their clearly affected offspring). To identify the underlying genetic cause, WES was performed using genomic DNA (saliva samples were extracted using Oragene® kit). Alignment data was performed using the Bowtie2 software (version 2.2.5), and the NCBI GRCh38 was used as a reference. The pipeline Variant Annotation Analysis and Search Tool (VAAST) was used for variant filtering. WES was performed by synthesis using the Illumina-HiSeq-3000 platform (UCLA Microarray core, US). Sanger sequencing of the *FLG* gene was performed to validate the exome and complement familial analysis using the following primers sequences: Forward strand 5' GTTTCTGGAAGCCGACTCAG 3' and reverse strand 5' AGACGGTCAGGACACCATTC 3'. Sanger sequencing of the *ZNF469* gene was performed with the use of primer pairs 5' GTGTGCAGGTGACAACTCTCC 3' and 5' GCGAGGTAAGTGGGTCTTCAC 3'.

### **Statistical and Genomic Analysis**

The affected families sequenced in this study appear to display autosomal dominant inheritance; therefore, we hypothesized that heterozygous coding variants might explain most of these cases. All genotyped single nucleotide variants (SNV) were in Hardy-Weinberg equilibrium. Filtering methods were applied to identify variants that

were clinically relevant and present in affected individuals at global minor allele frequencies of  $\leq 1\%$  ( $GMAF \leq 0.01$ ) in the 1000 Genomes Project single nucleotide polymorphism database and Exome Variant Server database. We also investigated variants in the Brazilian database ABraHOM ([abraom.ib.usp.br](http://abraom.ib.usp.br)). For each individual, the .vcf file was uploaded into the Variant Effect Predictor (VEP) and Variant Annotation, Analysis, and Search Tool (VAAST - version 2.0).<sup>14, 15</sup> Variant location predicted the effects on proteins across gene databases (RefSeq and Ensembl), and transcription gene lengths were also noted. A p-value  $\leq 0.05$  was considered statistically significant. Statistical analyses were performed using SPSS statistics software (SPSS version 11.0; SPSS, Chicago, IL). Possible causative and relevant KCN genes were provided by the OMIM and Medline database search. The last online search date was November 2017. We selected one tool (PolyPhen-2) to predict pathogenicity of the single nucleotide variant.<sup>16</sup> The probably damaging score for PolyPhen-2 was accepted as evidence for pathogenicity. Other analyses such as *SIFT* and *Mutation Taster* were included as Supplemental Digital Content (SDC).

### **Corneal Measurements**

Corneal images were acquired using Pentacam® HR Scheimpflug tomography (Oculus GmbH, Wetzlar, Germany). Tomographic parameters for each eye included maximum keratometry in diopters (D), thinnest pachymetry of the cornea, and Belin/Ambrosio Enhanced Ectasia display III (BADIII) “D” value. Classification of manifest KCN followed a BADIII value  $> 2.6$ .<sup>16</sup> Forme fruste KCN (subclinical) is considered an abortive form of KCN in which the progression process of the keratectasia was halted at a certain point, probably to a regain the cornea’s biomechanical strength.<sup>17</sup> The BADIII value for this type of corneal alteration was  $< 2.6$  and  $> 1.8$ .<sup>16</sup>

## **RESULTS**

We detected an average of 50,913 sequence variants per exome with an average coverage of 80-fold (Table 3). Identically reported sequence variants (referred to as overlapping variants) were selected in all affected individuals of each family.

The molecular diagnosis indicated a SNV in chromosome 1 (q21.3) within the filaggrin gene (*FLG* – OMIM 135940) in family 1. All family members shared a heterozygous missense variant (NM\_002016.1) in the c.4678C>T position (rs151103850). This SNV presented a global minor allele frequency of 0.013 in the 1000 genomes dataset (GMAF) and an estimated 0.021 frequency in Brazilian population (ABraOM database), all heterozygotic. PolyPhen-2 demonstrated an overall score of 0.898, predicting a possible damaging variant. Amino acid changes in the NP\_002007.1 p.1560R>C position induced an arginine to cysteine substitution. Sanger sequencing confirmed variants in the *FLG* gene. Next, we sought the same pathogenic variant in the twin brothers. Both had the same variant, one also heterozygotic (forme fruste – IIc.) and the other one homozygotic (II d). The *FLG* variant was not observed in the father of the twins (Ic.). The *Mutation Taster* prediction score indicated that this variant presented changes in amino acid, splicing, and protein sequence. SIFT score suggested that this SNV predicted damage. Further analyses with *SIFT* and *Mutation Taster* were included as SDC 3 and 4, respectively. The *SIFT* and *Mutation Taster* for this variant were included as SDC 1 and 2, respectively.

In family 2, the molecular diagnosis indicated a SNV in chromosome 16 (q24.2), within the zinc finger 469 encoding gene (*ZNF469* – OMIM 612078). Family members shared a heterozygous missense variant (NM\_001127464.2) in the c.1489G>A position that led to an amino acid change in the p.497G>R position (NP\_001120936.2), inducing a guanine to adenine substitution. This SNV (rs28723506) presented a GMAF of 0.08 and a 0.013 frequency in the Brazilian (ABraOM database). PolyPhen-2 demonstrated an overall score of 0.912, predicting

a possible damaging variant. Sanger sequencing confirmed variants in the *ZNF469* gene. This rare variant was not observed in the healthy father (Ia). The *Mutation Taster* prediction score indicated that this SNV presented changes in amino acid, splicing, and protein sequence. Prediction of *ZNF469* gene SIFT Score suggests that the variant might be tolerated. Further analyses with *SIFT* and *Mutation Taster* were included as SDC 3 and 4, respectively.

The exomes of the two families were also evaluated for variants in the genes of the exome that were shared among all affected individuals. Exome data were filtered for rare non-synonymous, coding indels, and splice acceptor and donor site variants with a GMAF  $\leq 1\%$  database. These filtering criteria did not identify any rare sequence variants in a single gene that segregates in both families.

## DISCUSSION

This is one of the few studies published to date that applies WES in well-characterized pedigrees affected by KCN. We observed heterozygous rare sequence variants in two previously described genes, *FLG* and *ZNF469*. In this study, we identified two missense variants (c.4678C>T and c.1489G>A, respectively) that might facilitate phenotype characterization in KCN. However, we found no common segregating rare variants among affected members of the two non-related families, indicating genetic heterogeneity in the pathogenesis of KCN.

Pathogenic variants in the *FLG* gene were described as a potential genetic cause of atopic dermatitis, allergic rhinitis, and asthma in European populations.<sup>19</sup> Subsequently, *FLG* variants were identified in Japanese, Chinese, Korean, and Taiwanese populations.<sup>20</sup> No genotype–phenotype correlation was observed in patients with *FLG* variants. *FLG* is a key protein epidermal differentiation and maintenance of skin barrier function. Eye-rubbing and atopic diseases have been

associated with KCN in various uncontrolled studies.<sup>21</sup> Serum IgE levels and eye complications, however did not correlate.<sup>22</sup> It was proposed that corneal thinning results from mechanical injury of the epithelium. *FLG* was identified in the central, peripheral, and limbal epithelium.<sup>22</sup> Interleukin-1 (IL-1) interactions with *FLG* in the corneal epithelial barrier have been suggested to promote keratocyte apoptosis.<sup>21</sup> Multiple proteases are necessary for epidermal homeostasis and cleavage of IL-1 cytokines at optimal acidic pH values. IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$  IL-18, and IL-1 receptor antagonist levels were recently shown to be increased in the uninvolved skin of patients with moderate-to-severe atopic dermatitis.<sup>23</sup> This study suggests that there might be a preexisting or enhanced proinflammatory status in the skin of patients with atopic dermatitis. The rs151103850 SNV has been previously associated with atopic dermatitis and ichthyosis.<sup>24</sup> KCN and *FLG* have been only studied concurrently with atopic dermatitis. Five patients (5.6%) with KCN and atopic dermatitis were found to be carriers of a null variant in the *FLG* gene (R501X and 2282del4).<sup>25</sup> In the same article, the authors indicated the need to look for other *FLG* pathogenic variants. In our study, only one offspring (IIa. in family 1) had a previous atopic dermatitis diagnosis. The other family members had no symptoms or signs of skin disease. The interaction between *FLG* and KCN might result from either a direct primary corneal epithelial barrier defect (as well as atopic dermatitis) or indirect mechanical eye rubbing due to itching and irritation. Prediction tools agreed to indicate a potential damaging variant. It is important to emphasize that *FLG* protein formation is not annulled by the existence of homozygosity. Sanger analysis of the twin brothers in family 1 found that they carry the same *FLG* variant; however, one was in homozygous (IIc.) and the other one was heterozygous (II d.). Conversely, the mild phenotype (forme fruste) was only expressed in one subject (IIc.). The fact that this variant was detected in a healthy brother and the absence of skin conditions in the family may indicate that variant in the *FLG* gene might not be responsible for KCN unless an incomplete penetrance is occurring.



*ZNF469* (OMIM 612078) is a single exon gene encoding a 413-kDa protein consisting of 3953 amino acid residues that contain five different C2H2 zinc finger domains in its C-terminal, suggesting its role in the transcription process.<sup>25</sup> Protein homology suggests that *ZNF469* might function as an extra-nuclear regulator factor for the synthesis and organization of collagen fibers, which constitute the major component of the human cornea.<sup>26</sup> This gene has a 30% homology to the helical parts of *COL1A1*, *COL1A2* and *COL4A1* all of which are highly expressed in the cornea.<sup>27</sup> *ZNF469* was identified as the gene responsible for Brittle cornea syndrome type 1 (BCS1, OMIM 229200), an autosomal recessive disorder characterized by an extreme thin and fragile cornea, which tends to rupture spontaneously.<sup>26,27</sup> Recent genome-wide association studies (GWAS) have shown that variants in *ZNF469* might also contribute to central corneal thickness (CCT). Based on an analysis of five cohorts from Australia and the United Kingdom, the authors reported an association between CCT and mapping of two SNPs (rs12447690 and rs9938149) in the intergenic region upstream to *ZNF469*.<sup>28</sup> Other authors reported a significant enrichment of potentially pathologic heterozygous *ZNF469* alleles in 12.5% of KCN individuals of European ethnicity, making it the most likely significant genetic factor for KCN.<sup>26</sup> A subsequent study conducted in a Polynesian population also revealed a rare missense variant in *ZNF469* in KCN patients with a frequency of 23.0%.<sup>26</sup> Not all studies have found that *ZNF469* variants segregate in families with KCN. Other authors reported that the presence of heterozygous loss-of-function alleles in *ZNF469* did not influence KCN development.<sup>29</sup> Therefore prediction methods disagree with one another, it is too early to define whether variants in *ZNF469* are causative for KCN. Our modified-trio analysis suggests a possible role for *ZNF469* in Brazilian individuals with KCN.

WES has emerged as a powerful tool for systemically exploring rare coding variations.<sup>30</sup> Since the majority of known genetic causes of diseases affect protein coding regions, the exome is a logical place to identify potentially causative variants

in disorders that exhibit Mendelian inheritance. Only variants within exonic regions were retained in this experiment. It is possible that non-coding variants, epigenetic changes, and epistatic interactions are important in KCN development and in other complex diseases, in which case alternate study designs should be utilized. Additionally, most variants found by WES have no clinical significance, and our incomplete understanding of genome biology will continue to impair our ability to interpret its results. Analytical validity is limited because bioinformatics algorithms for real data interpretation are still in progress.

Subclinical forms of KCN used to be a confounding factor and complicate the identification of a correct phenotype.<sup>5</sup> Recent advances in corneal tomography screening techniques for KCN, including forme fruste, enable higher accuracy in delineating study populations.<sup>7</sup> Using subclinical phenotypes can greatly aid genetic studies because there might be reduced penetrance or variability of phenotype expression, and the use of subclinical phenotypes might allow us to detect the abnormal genotype in the absence of clinical disease. As with other diseases of complex etiology, differentiation between association, cause, and effect is challenging and varies between individuals.

Therefore, we believe that WES-based segregation analyses might not be the best strategy for identifying pathogenic variants in isolated KCN families. Current understanding supports that the KCN is caused by multiple genes and in many instances may result from complex interactions between genes and environmental factors, such as eye rubbing and atopy of the eye.<sup>10</sup> Affected individuals might thus have KCN due to the presence of rare sequence variants of risk factors, not merely by direct anatomic defect. The best chances of identifying genes are in rare large single families or in rare populations with high concentrations of KCN because of a common founder.

Even though probably damaging variants were identified in the *ZNF469* and *FLG* genes, these candidate genes require further analyses in larger cohorts to

confirm their involvement in KCN development and in the phenotypic variability between the analyzed individuals. In addition, no evidence was found of rare sequence variants in a single gene that segregates with KCN in these two non-related Brazilian families, suggesting that the disease is genetically heterogeneous.

In summary, this study represents the difficulty in the evaluation of rare variants in complex disorders such as KCN. We provide evidence of genetic heterogeneity in KCN pathogenesis rather than a single major gene effect. Further screening in controls without KCN for both variants in the same population in addition to replication in a larger sample with multi-ethnic populations in familial and sporadic samples remain necessary.

#### **Financial support**

Financial support provided by the Brazilian National Council for Scientific and Technological Development. The funding organization had no role in the design or conduct of this research.

#### **Conflict of interest**

No conflicting relationship exists for any author.

### 3.2 TABLES

**Table 1.** Clinical and tomographic features (Family 1).

Proband	lb.	lc.	lla.	llb.	llc.	lld.
Age (years)	62	64	34	38	23	23
Sex	F	M	F	F	M	M
BADIII OD <sup>a</sup>	3.44	0.87	4.28	7.49	2.14	1.08
BADIII OS <sup>a</sup>	3.29	0.79	5.04	*	2.50	1.33
Kmax OD <sup>b</sup>	48.1	44.5	47.9	57.6	45.1	44.1
Kmax OS <sup>b</sup>	47.5	44.3	48.4	*	45.4	44.6
Tpach OD <sup>c</sup>	476	567	451	454	484	548
Tpach OS <sup>c</sup>	478	568	433	431	479	532

\*Data not available (submitted to Intracorneal Ring Segment). <sup>a</sup> BADIII: Belin/Ambrosio Enhanced Ectasia Display III. <sup>b</sup>Kmax: Maximum Keratometry. <sup>c</sup> Tpach: Thinnest pachymetry.

**Table 2.** Clinical and tomographic features (Family 2).

Proband	la.	lb.	lla.	llb.
Age (years)	50	42	22	16
Sex <sup>a</sup>	M	F	M	M
BADIII OD <sup>b</sup>	0.51	4.14	6.27	*
BADIII OS <sup>b</sup>	0.76	4.24	11.21	9.25
Kmax OD <sup>c</sup>	43.6	48.2	48.3	*
Kmax OS <sup>c</sup>	43.5	48.7	61.6	54.3
Tpach OD <sup>d</sup>	581	487	478	*
Tpach OS <sup>d</sup>	577	417	417	433

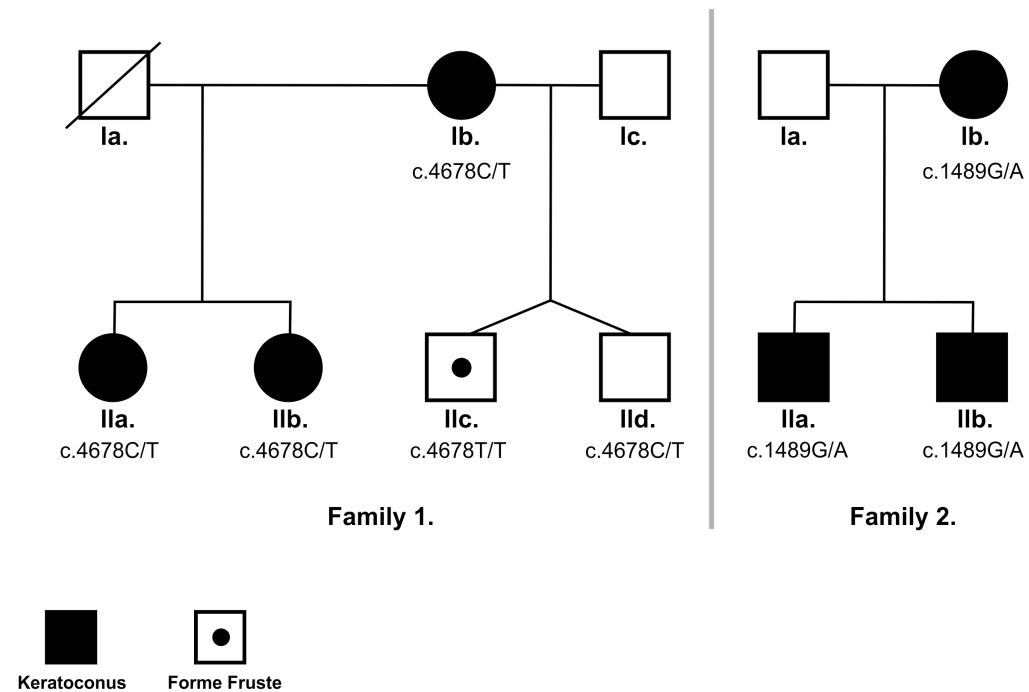
\*Data not available (submitted to corneal transplant). <sup>a</sup> M/F: Male/Female; <sup>b</sup> BADIII: Belin/Ambrosio Enhanced Ectasia Display III; <sup>c</sup> Kmax: Maximum Keratometry; <sup>d</sup> Tpach: Thinnest pachymetry.

**Table 3.** Single nucleotide variants found.

Family	Subject	Number of Variants	Depth of Coverage
1	Ib.	51,259	81X
1	IIa.	51,526	80X
1	IIb.	51,327	82X
2	Ib.	51,496	78X
2	IIa.	49,398	79X
2	IIb.	50,470	79X

### 3.3 FIGURES

FIGURE 1.



**Figure 1.** Family 1 pedigree. The mother and both daughters have keratoconus. The father is deceased. One of the twin brother have forme fruste keratoconus. The

father has normal cornea. Family 2 pedigree. The mother and both sons have keratoconus.

## **4. CAPÍTULO 2**

### **4.1 ARTIGO 2**

#### **COLLAGEN I DEFECT CORNEAL PROFILES IN OSTEOGENESIS IMPERFECTA**

Otavio A Magalhaes<sup>1</sup>, MD, MSc; Helena C Rohenkohl<sup>2</sup>, MD; Liliane Todeschini de Souza<sup>4</sup>, BBS, PhD, Lavinia Schuler-Faccini<sup>3</sup>, MD, PhD; Têmis M Félix<sup>4</sup>, MD, PhD.

**Financial support:** The Brazilian National Council for Scientific and Technological Development. The funding organization had no role in the design or conduct of this research.

**Conflict of interest:** No conflicting relationship exists for any author.

**Running head:** Corneal Profile in Osteogenesis Imperfecta.

**Address for reprints:** 333 Mostardeiro Street, Office 503. Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil. Email: otaviomaga@yahoo.com.br.

#### **Authors' affiliations:**

1 – Genetic and Molecular Biology Post-Graduation Program, PhD Candidate at Federal University of Rio Grande do Sul, Brazil. Porto Alegre Eyes Bank Hospital.

2 – Porto Alegre Eyes Bank Hospital, Brazil.

285 Engeneer Walter Boehl Street, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil.

3 – Genetic and Molecular Biology Post-Graduation Program, Federal University of Rio Grande do Sul, Brazil.

9500 Bento Gonçalves Avenue, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil.

4 – Medical Genetics Service, Clinical Hospital of Porto Alegre, Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil.

2350 Ramiro Barcelos Street, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil.

**Keywords:** *Osteogenesis Imperfecta, Cornea, Ectasia, COL1A1, COLA2*, corneal thickness spatial profile.

## **ABSTRACT**

**Purpose:** The goal of this study was to evaluate corneal profiles of individuals with osteogenesis imperfecta (OI) due to a collagen I gene mutation.

**Methods:** This was a cross-sectional comparative study. There were 84 eyes from 42 participants with OI Types-I, -III, and -IV who were recruited from the OI Clinic at the Clinical Hospital of Porto Alegre, Brazil. All cases presented either *COL1A1* or *A2* gene mutations. Controls were matched by sex, age, and refractive error. Corneal Scheimpflug tomography was used to determine curvature and thickness parameters in both groups.

**Results:** Quantitative collagen mutations were found only in OI Type-I. Qualitative mutations were responsible for all mutations observed in Type-III and -IV participants. Each OI type presented significantly lower pachymetric values at the thinnest point compared to controls (443.7–505.1 versus 541.9–548.5  $\mu\text{m}$ ;  $p < 0.001$ ). Also, significantly lower pachymetric values were observed in participants with OI compared to controls in all positions between the central and corneal periphery (581.4–657.0 versus 704.5–720.7  $\mu\text{m}$  at an 8.0 mm diameter circle;  $p < 0.001$ ). Differences in anterior and posterior radii of curvatures (ARC and PRC, respectively) between OI patients and controls were not statistically significant (7.64–7.80 versus 7.65–7.69 mm;  $p > 0.05$ ) except for a lower ARC in Type-III (7.33 versus 7.72 mm;  $p < 0.01$ ).

**Conclusion:** Although OI patients have homogeneously thinner corneas compared to controls, we observed that a collagen I chain mutation was not responsible for corneal curvature alterations in OI.

## INTRODUCTION

The hallmark of corneal ectasia is progressive thinning and protrusion that occurs either naturally or as a result of surgery.<sup>1-3</sup> Although its clinical characteristics are well-established, its etiology is still debatable.<sup>4</sup> Corneal ectasia is believed to be a multifactorial disease involving a complex interaction of genetic, biochemical, and environmental factors.<sup>4-6</sup> Genetic associations have been described between keratoconus (KCN) and connective tissue disorders in addition to abnormal collagen composition, including Ehlers-Danlos syndrome, congenital hip dysplasia, Marfan syndrome, and osteogenesis imperfecta (OI).<sup>4</sup> OI is a rare inherited disorder caused mainly by mutations in the *COL1A1* or *COL1A2* gene.<sup>7-10</sup> Collagen Type-I constitutes approximately 80% of the human corneal collagen and makes up the major part of scleral collagen.<sup>11</sup> In addition to corneal ectasia, other ocular signs have been reported in OI, including low ocular rigidity, a thin cornea, myopia, and low intraocular pressure.<sup>12,13</sup> These conditions were postulated to be directly attributed to an abnormal composition of collagen fibers.<sup>14,15</sup> There are two main types of collagen I mutations in OI: (1) those that lead to structurally normal but quantitatively changed Type-I procollagen and (2) those that cause a structurally abnormal protein, producing qualitative modifications. Quantitative defects are most often the result of a premature termination codon in *COL1A1*, which leads to haploinsufficiency of collagen Type-I and are usually seen in OI Type-I.<sup>16</sup> Qualitative defects are generally caused by mutations affecting the protein sequence of the triple helical domain. A qualitatively changed protein is associated with a more severe skeletal phenotype observed in OI Type-III and -IV.<sup>17</sup>



This study describes the corneal profile of different types of OI with collagen I mutation, using modern three-dimensional (3D) Scheimpflug tomography to compare it to normal individuals.<sup>18</sup>

## **METHODS**

This comparative cross-sectional study was approved by the Ethics Committee (#15-0559) of the Clinical Hospital of Porto Alegre, Brazil. Informed consent was obtained from each patient (or the parents) for data collection and analyses. Acquisition of data was performed in a manner compliant with the Health Insurance Portability and Accountability Act, so that the described research adhered to the tenets of the Declaration of Helsinki.

### **Subjects**

All participants were recruited from the OI Clinic at the same center between June and November 2017. A total of 46 Brazilians with OI and known mutations of *COL1A1* or *COL1A2* genes were eligible for assessment. All these patients were subclassified according to the Sillence clinical nomenclature.<sup>9</sup> Patients <6 years old were excluded because of difficulty in capturing images with corneal tomography. All subjects were evaluated by the same ophthalmologist, who was blinded as to gene mutation. Healthy subjects from a similar ethnic background, without a history of any systemic or ocular disease, were carefully matched for age, sex, and cycloplegic refraction. All control subjects had 20/20 (logMar 0) best spectacle-corrected visual acuity with a normal anterior segment and fundus findings (Supplemental Digital Content). Astigmatism was converted to the spherical equivalent. The control group was established from the General Ophthalmic Clinic of the Porto Alegre Eyes Bank Hospital, Brazil.

## **Mutation Analysis**

Next Generation and Sanger sequencing of peripheral blood DNA were used. Polymerase chain reaction (PCR) primers were designed to cover the coding exons and flanking introns of the *COL1A1* and *COL1A2* genes. PCR was performed on a GeneAmp PCR system using AmpliTaq® Gold kits (Waltham, MA, USA), while the sequencing reactions were used with an adjusted Big Dye sequencing protocol. Products were run with a 16-capillary ABI 3130xl Genetic Analyzer automated sequencer and analyzed with SeqScape® v2.5 (Waltham, MA, USA). All identified variants were reconfirmed by resequencing the target exon. Mutations were described as quantitative (haploinsufficiency) or qualitative defects (missense), according to Marini *et al.*<sup>19</sup>

## **Corneal Measurements**

Corneal imaging was acquired by Pentacam® HR Scheimpflug tomography (Oculus GmbH, Wetzlar, Germany). Tomographic parameters for each eye included mean and maximum keratometry (K) in D, anterior and posterior radius of curvature (ARC and PRC, respectively), which were taken from a 3.0 mm optical zone centered on the thinnest points of the cornea and corneal pachymetry.<sup>20</sup> We analyzed the corneal thickness spatial profile (CTSP) parameters derived from the Pentacam Comprehensive Eye Scanner to study corneal architecture in all patients. The CTSP diagram horizontal axis represents the location of the circles centered in the thinnest location with diameters of 2–10 mm in 2 mm increments. The vertical axis represents corneal thickness. The computer measures the average corneal thickness of all points distributed in each circle. To be included as controls, subjects were required to

have a Belin/Ambrosio Enhanced Ectasia display III (BADIII) “D” value <1.6 (from the Pentacam).

## **Statistics**

All statistical analyses were performed using the Statistical Package for the Social Sciences (SPSS for Windows, v. 24; IBM SPSS Inc., Chicago, IL, USA). We used the chi-square test for categorical variables to determine differences in frequencies of demographic characteristics. The independent t-test was used to evaluate continuous variables. The paired t-test was used to compare differences between two matched samples. Two-tailed *p*-values were computed using *p* <0.05 to calculate a significant deviation from the null hypothesis.

## **RESULTS**

Of a total of 46 eligible subjects with OI, 42 (84 eyes) were examined. Twenty were clinically classified as Type-I, six as Type-III, and 16 as Type-IV. Two patients declined our request to be included, and the other two were not available for ophthalmic examination (8.7%). Forty-two age-, sex- and refraction-matched healthy control individuals (84 eyes) were also enrolled. No statistically significant age- ( $21.7 \pm 2.5$  versus  $21.6 \pm 2.4$  years, *p* >0.05) or gender-related or spherical equivalent ( $-0.11 \pm 0.3$  versus  $-0.09 \pm 0.3$  D, *p* >0.05) differences were detected between OI patients and control subjects. Demographic characteristics are listed in Table 1.

Collagen I qualitative mutations were found in 24 participants (57.1%). Quantitative mutations caused OI in 18 patients (42.9%), which are seen only in OI Type-I. Qualitative mutations were responsible for all mutations observed in Type-III and -IV participants. Table 2 details each collagen gene and its association with its respective phenotype.

Table 3 shows corneal characteristics in OI patients and controls. Mean pachymetric measurements of OI Type-I, -III, and -IV at the thinnest point were statistically significant compared to their respective controls. Type-III ARC was the only one to demonstrate a statistically significant difference between study sample and control. The PRC measurements in OI Type-I, -III, and -IV presented no statistically significant difference over controls. Moreover, OI Type-III participants were the only ones to present statistically significant differences regarding mean and maximum K.

Statistically significant differences were found in CTSP positions in all types of OI and normal eyes. The OI participants had much lower pachymetric values. Figure 1 shows the mean, standard deviation, 95% confidence interval limits, and minimum and maximum CTSP values in OI patients and normal eyes. The 10 mm circle diameter values were excluded since this measurement was not always available due to the location of the thinnest point location.

## **DISCUSSION**

This is the first study to evaluate a fairly large group of patients with collagen I *COL1A1* and *COL1A2* mutations using corneal tomography. Previous studies used ultrasound pachymetry for OI central corneal thickness screening.<sup>14</sup> Recent surveys demonstrated that differences between an apical reading and the thinnest point can vary greatly with this method.<sup>21</sup> We analyzed the association between collagen I mutation and corneal profiles in study patients compared to normal individuals.

Overall, corneal pachymetry of OI patients was significantly thinner than control subjects in all corneal positions as matched by age, sex, and refraction, especially in Type-I individuals (Figure 2). A thin cornea in OI can result from defects in

composition or altered distribution of corneal collagen.<sup>8</sup> Histopathology and electron microscopy showed that collagen fibers in the cornea and sclera in OI patients were about 25% and 50% narrower than those of controls, respectively.<sup>12</sup> Also, a trace of what was presumed to be Bowman's layer was barely visible, indicating that this layer was missing or atrophic. Recently, *in vivo* laser confocal microscopy confirmed this finding.<sup>22</sup>

The correlation between ocular phenotype and molecular analysis was also described for the first time in the present study. We observed that mutations causing a quantitative collagen I defect are associated with thin corneas but no significant corneal steepening. This type of mutation was found almost exclusively in the *COL1A1* gene. In contrast, quantitatively changed collagen I often produces a milder phenotype in the skeletal system.<sup>16</sup> Qualitatively abnormal protein was observed in *COL1A1* and *COL1A2* genes mainly in Type-III and -IV individuals. The lower ARC in Type-III corneas was statistically significant as was the consequent steeper mean and maximum K value. On the contrary, mean corneal pachymetry in Type-III was thicker than Type-I and -IV. Clinically, increased K was not responsible for decreasing visual acuity in this group (Supplemental Digital Content). This phenotype can be attributed to the location of the majority of mutations in the *COL1A1* gene. Unfortunately, only 6 individuals with Type-III were analyzed. More detailed mutation localization is needed to evaluate and confirm specific phenotype relations.

We agree with other authors that corneal collagen fibers in OI could be more arranged and, perhaps, more closely packed.<sup>15,23</sup> These ultrastructural alterations produce uniform and homogenous corneal thinning without causing significant anterior or posterior protrusion. Thinning patterns in KCN are generally localized in the center (4–6 mm), which is within normal limits for peripheral pachymetry. Patients with KCN have thinner corneas and a more rapid and abrupt increase of CTSP than

in normal corneas.<sup>18</sup> This is not the profile observed in *COL1A1* and *COL1A2* mutated corneas. We showed that corneal thickness in OI eyes follows the same course of normal individuals without any abrupt deviation towards the periphery. No keratoconic pattern was observed in any OI participant's corneal tomography mapping.

When we compared all OI patients' Pentacam parameters to a study with 336 individuals that was performed to identify normal values for many recognized tomographic parameters used to screen patients for refractive surgery, no significant difference in ARC, PRC and mean and maximum K values were observed.<sup>20</sup> Again, corneal thickness was the only different parameter. It is important to mention that it is not correct to use BADIII to detect ectasia in patients with collagen I mutations. This tool is used to report a final overall reading that is based on a regression analysis to maximize the separation of normal corneas from those with KCN. Low pachymetry itself without any other changes in anterior and posterior parameters is enough reason for elevated D value. There is no "correction factor" for a collagen mutation.

Finally, we concluded that although qualitative and quantitative gene defects in *COL1A1* and *COL1A2* resulted in thinner corneas, a collagen I chain mutation was not responsible for significant alteration in anterior and posterior corneal curvature.

### **Digital Supplemental Content**

Clinical aspects of all OI patients are listed (gender, best spectacle-corrected visual acuity and scleral coloration).

## REFERENCES

- 1 – Duke-Elder S, Leigh AG. Ectatic conditions: keratoconus (conical cornea). *Syst. Ophthalmol.* 1965;8:964-976.
- 2 - Rabinowitz YS. Keratoconus. *Surv Ophthalmol.* 1998;42:297-319.
- 3 - Krachmer JH, Feder RS, Belin MW. Keratoconus and related noninflammatory corneal thinning disorders. *Surv Ophthalmol.* 1984;28:293-322.
- 4 - Sugar J, Macsai MS. What causes keratoconus? *Cornea.* 2012;31:716-719.
- 5 - Kenney MC, Nesburn AB, Burgeson RE, et al. Abnormalities of the extracellular matrix in keratoconus corneas. *Cornea.* 1997;16:345-351.
- 6 - Smith VA, Easty DL. Matrix metalloproteinase 2: involvement in keratoconus. *Eur J Ophthalmol.* 2000;10:215-226.
- 7 - Sykes B, Ogilvie D, Wordsworth P, et al. Osteogenesis imperfecta is linked to both type I collagen structural genes. *Lancet.* 1986;2:69-72.
- 8 - Brizola E, Félix TM, Shapiro JR. Pathophysiology and therapeutic options in osteogenesis imperfecta: an update. *Res Rep Endocr Disord.* 2016;6:17-30.
- 9 - Sillence DO, Senn A, Danks DM. Genetic heterogeneity in osteogenesis

imperfecta. *J Med Genet.* 1979;16:101-116.

10 - Smith R, Francis MJO, Sykes B. The eye and collagen in osteogenesis imperfecta. *Birth Defects.* 1976;12:563-566.

11 - Hyams SW, Dar H, Neumann E. Blue sclera and keratoglobus. *Br J Ophthalmol.* 1969;53:53-5813.

12 - Sillence DO, Barlow KK, Garber AP, et al. Osteogenesis imperfecta type II delineation of the phenotype with reference to genetic heterogeneity. *Am J Med Genet.* 1984;17:407-423.

13 - Chan CC, Green WR, de la Cruz ZC, et al. Ocular findings in osteogenesis imperfecta congenita. *Arch. Ophthalmol.* 1982;100:1458-1463.

14 - Evereklioglu C, Madenci E, Bayazit YA, et al. Central corneal thickness is lower in osteogenesis imperfecta and negatively correlates with the presence of blue sclera. *Ophthalmic Physiol Opt.* 2002;22:511-515.

15 - Kaiser-Kupfer MI, McCain L, Shapiro JR, et al. Low ocular rigidity in patients with osteogenesis imperfecta. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1981;20:807-809.

16 - Willing MC, Deschenes SP, Slayton RL, et al. Premature chain termination is a unifying mechanism for COL1A1 null alleles in osteogenesis imperfecta type I cell strains. *Am J Hum Genet.* 1996;59:799-809.

17 - Wenstrup RJ, Willing MC, Starman BJ, et al. Distinct biochemical phenotypes predict clinical severity in nonlethal variants of osteogenesis imperfecta. *Am J Hum*



*Genet.* 1990;46:975-982.

18 - Belin MW, Villavicencio OF, Ambrosio RJR. Tomographic Parameters for the Detection of Keratoconus: Suggestions for Screening and Treatment Parameters. *Eye contact lens.* 2014;40:326-330.

19 - Marini JC, Forlino A, Cabral WA, et al. Consortium for osteogenesis imperfecta mutations in the helical domain of type I collagen: regions rich in lethal mutations align with collagen binding sites for integrins and proteoglycans. *Hum Mutat.* 2007;28:209-21.

20 - Gilani F, Cortese M, Ambrósio RJR, et al. Comprehensive anterior segment normal values generated by rotating Scheimpflug tomography. *J Cataract Refract Surg.* 2013;39:1707-1712.

21 - Belin MW, Duncan JK. Keratoconus: The ABCD Grading System. *Klin Monbl Augenheilkd.* 2016;233:701-707.

22 - Kobayashi A, Higashide T, Yokogawa H, et al. *In vivo* laser confocal microscopy findings of a cornea with osteogenesis imperfecta. *Clin Ophthalmol.* 2014;8:429-433.

23 - Mietz H, Kasner L, Green WR. Histopathologic and electron-microscopic features of corneal and scleral collagen fibers in osteogenesis imperfecta type III. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol.* 1997;235:405-10.

## 4.2 TABLES

Table 1. Characteristics of participants with different types of OI and controls.

	Individuals	Eyes	Gender F/M <sup>a</sup>	Age (mean) <sup>b</sup>	BADIII <sup>c</sup>
<b>Type-I</b>	20	40	14/6	25.4	-
Controls	20	40	14/6	25.5	1.02
<b>Type-III</b>	6	12	4/2	17.2	-
Controls	6	12	4/2	17.5	0.83
<b>Type-IV</b>	16	32	11/5	18.9	-
Controls	16	32	11/5	18.3	0.94

<sup>a</sup>F (female) / M (male), <sup>b</sup>in years. <sup>c</sup>Belin-Ambrosio Enhanced Ectasia

Display III (mean D value).

Table 2. Collagen I mutation characteristics in Osteogenesis Imperfecta individuals.

	<i>COL1A1</i> mut <sup>a</sup>	<i>COL1A2</i> mut <sup>b</sup>	Qualitative	Quantitative
<b>Type-I</b>	19	1	2	18
<b>Type-III</b>	4	2	6	0
<b>Type-IV</b>	5	11	16	0
<b>All Types</b>	28	14	24	18

<sup>a</sup>*COL1A1* gene mutation. <sup>b</sup>*COL1A2* gene mutation.

Table 3. Corneal tomography values of individuals with different types of OI vs. controls.

	<b>Corneal pach<sup>a</sup></b>	<b>ARC<sup>b</sup></b>	<b>PRC<sup>c</sup></b>	<b>Mean K<sup>d</sup></b>	<b>Max<sup>e</sup></b>
<b>Type-I</b>	443.7	7.64	6.41	44.09	45.65
Controls	543.9	7.65	6.33	44.12	45.61
<i>P</i> value	< 0.001	0.95	0.23	0.93	0.91
<b>Type-III</b>	505.1	7.33	6.16	46.05	48.35
Controls	541.9	7.72	6.31	43.35	44.68
<i>P</i> value	< 0.001	< 0.01	0.08	< 0.01	< 0.01
<b>Type-IV</b>	496.3	7.80	6.38	43.14	44.69
Controls	548.6	7.69	6.27	43.72	45.02
<i>P</i> value	< 0.001	0.09	0.22	0.13	0.07

<sup>a</sup>Mean pachymetry at thinnest point ( $\mu\text{m}$ ); <sup>b</sup>Anterior Radius of Curvature (mm); <sup>c</sup>Posterior Radius of Curvature (mm);

<sup>d</sup>Keratometry (diopters); <sup>e</sup>Maximum Keratometry (diopters).

### 4.3 FIGURES

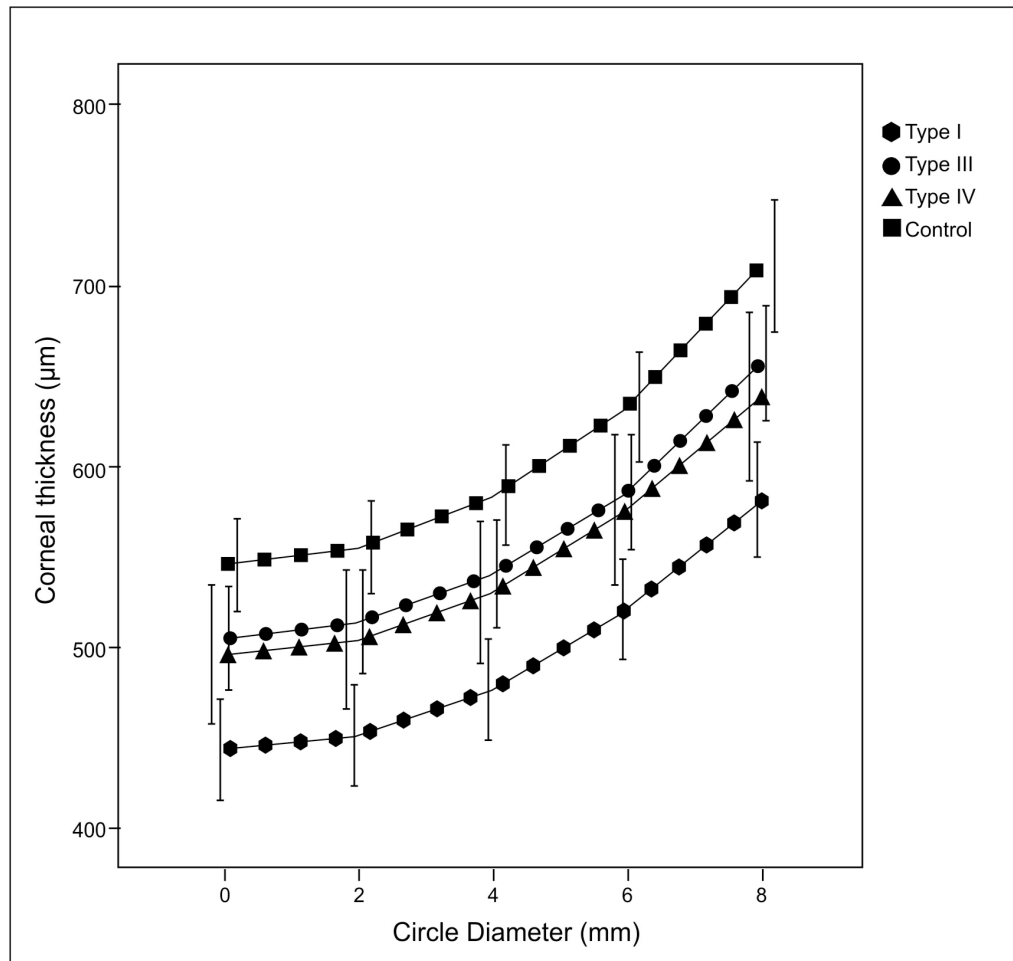


Figure 1. Spatial distribution of thickness values for normal corneas (square bar) and OI Type-I (hexagon bar), Type-III (circle bar), and Type-IV (triangle bar) individuals. The "X" axis represents the circle diameter centered on the thinnest point (0 in mm). The "Y" axis represents the mean corneal-thickness values ( $\mu\text{m}$ ) at each circle. Error bars represents 95% confidence interval (CI) values.

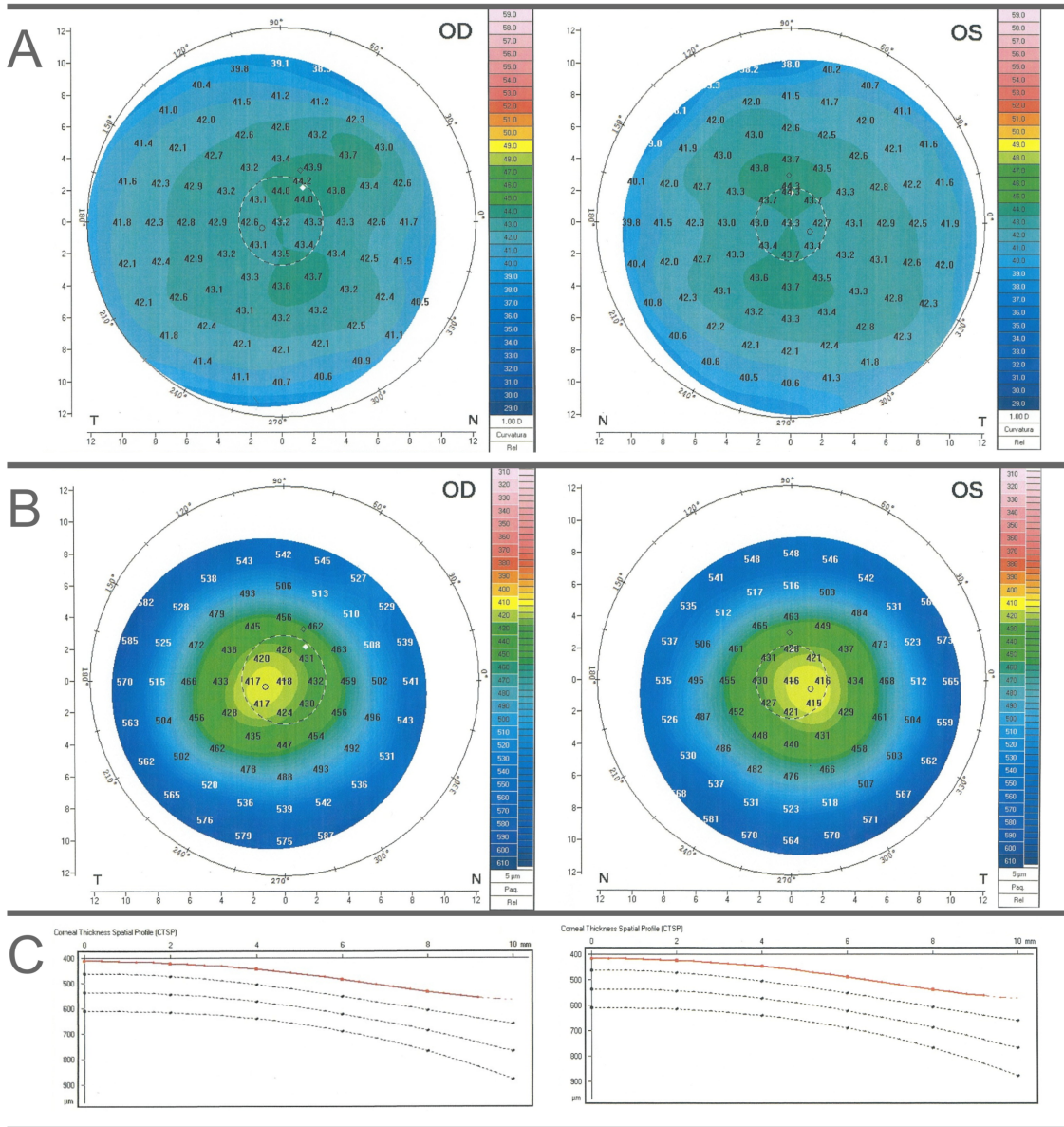


Figure 2. A typical homogenous thinning and normal anterior curvature in a patient with OI Type-I (A: corneal topography; B: pachymetry map; C: corneal thickness spatial profile).

## 5. DISCUSSÃO GERAL

As formas subclínicas do ceratocone (também conhecidas como forma frusta) costumavam confundir e dificultar a caracterização fenotípica correta.<sup>97</sup> Recentes avanços nas técnicas de triagem de tomografia corneana permitiram maior precisão na identificação e delineamento das populações com ceratocone.<sup>33</sup> Estudos anteriores ao ano 2000 não detinham a tecnologia necessária para estabelecer critérios apropriados. A utilização de fenótipos subclínicos permite avaliar a penetrância ou variabilidade da expressão fenotípica.

Avanços também ocorreram nesse período em relação à avaliação genética: o WES surgiu como um método poderoso para explorar variantes raras.<sup>98</sup> Contudo, a maioria das variantes encontradas pelo WES não tem significado clínico, e a falta de compreensão da biologia do genoma prejudica nossa capacidade de interpretar seus resultados. Além disso, sua validade analítica é limitada porque os algoritmos de bioinformática para interpretação de seus dados ainda estão em andamento e aperfeiçoamento. Existe inclusive a possibilidade de doenças como o ceratocone apresentarem variantes não-codificantes, mudanças epigenéticas e interações epistáticas importantes, situações essas não identificadas pelo WES.

Foram identificadas duas variantes heterozigotas *missense* em dois genes previamente descritos que podem auxiliar na caracterização fenotípica do ceratocone - *FLG* e *ZNF469*. Variantes patogênicas no gene *FLG* foram descritas como uma potencial causa genética da dermatite atópica, rinite alérgica e asma em populações europeias e asiáticas.<sup>99</sup> O *FLG* é uma proteína chave na facilitação da diferenciação epidérmica e na manutenção da função de barreira da pele. A fricção dos olhos e as doenças atópicas têm sido associadas ao ceratocone em diversos estudos observacionais.<sup>100</sup> Foi proposto que o afinamento da córnea resulta de lesão mecânica do epitélio. Esse gene foi identificado no epitélio central, periférico e limbal da córnea.<sup>101</sup> Além disso, a interação entre interleucina-1 (IL1) com o *FLG* na

barreira epitelial da córnea também tem sido sugerida como promotora de apoptose de queratócitos.<sup>102</sup> Ceratocone e *FLG* foram estudados apenas em concomitância em pacientes com dermatite atópica. Em nosso estudo, apenas um dos indivíduos apresentava um diagnóstico prévio de dermatite atópica. Outros membros dessa família não apresentavam sintomas ou sinais de doença na pele.

A homologia de proteína sugere que o gene *ZNF469* possa funcionar como um fator regulador extra-nuclear para a síntese e organização das fibras de colágeno, que é o principal componente da córnea humana.<sup>103</sup> Esse gene foi identificado como o gene responsável pela síndrome da córnea quebradiça tipo 1 (Brittle Cornea Syndrome), uma desordem autossômica recessiva caracterizada por uma córnea extremamente fina e frágil que tende a romper espontaneamente.<sup>103</sup> Estudos recentes de associação genômica ampla (GWAS) mostraram que variantes no *ZNF469* também podem contribuir para a espessura corneana central.<sup>71</sup> Outros autores relataram um enriquecimento significativo de *ZNF469* heterozigoto potencialmente patológico alelos em 12,5% de indivíduos com ceratocone de etnia europeia, sugerindo que este é o fator genético mais significativo para ceratocone até hoje identificado.<sup>103</sup> Contudo, nem todos os estudos encontraram as variantes de *ZNF469* segregando em famílias com ceratocone.<sup>71</sup>

Embora seja muito cedo para definir se as variantes em *FLG* e *ZNF469* são realmente causadoras de ceratocone, nossa análise de trio-modificada sugere um possível papel desses genes na sua patogênese em indivíduos brasileiros. Esses genes candidatos requerem análises adicionais em coortes maiores para confirmar seu envolvimento no desenvolvimento do ceratocone e na variabilidade fenotípica entre os indivíduos analisados.

Avaliamos também que a segregação baseada em WES pode não ser a melhor estratégia para identificar variantes patogênicas em famílias isoladas com ceratocone. O entendimento atual sustenta que essa doença é poligênica e, em muitos casos, pode resultar de interações complexas entre genes e fatores

ambientais.<sup>13</sup> Os indivíduos afetados podem, assim, desenvolver o ceratocone devido à presença de variantes envolvidas com fatores de risco, e não meramente por defeito anatômico direto. As melhores chances de identificar genes são em famílias grandes ou em populações raras com altas concentrações de ectasia corneana devido a um fundador comum.

Nosso segundo estudo avaliou um grupo razoavelmente grande de pacientes com mutações do colágeno tipo I nos genes *COL1A1* e *COL1A2* usando tomografia corneana. Analisamos e comparamos as características corneanas de indivíduos com OI e mutação do colágeno tipo I com indivíduos normais. Em geral, a paquimetria dos pacientes com OI foram significativamente mais fina que os controles em todas as posições corneanas pareadas por idade, o sexo e a refração, especialmente nos indivíduos com OI Tipo-I. A espessura reduzida na OI pode resultar de defeitos na composição ou na distribuição alterada do colágeno corneano.<sup>104</sup> Outro estudo mostrou que a histopatologia e a microscopia eletrônica das fibras colágenas na córnea e na esclera em pacientes com OI compreendem cerca de 25% e 50% mais estreitas que as dos controles, respectivamente.<sup>105</sup> Observamos nos indivíduos que apresentam mutações que causam defeito quantitativo do colágeno tipo I associação com córneas mais finas, mas não um aumento significativo da curvatura da córnea. Este tipo de mutação foi encontrada quase exclusivamente no gene *COL1A1*. Essas alterações ultra-estruturais produzem um afinamento uniforme e homogêneo da córnea, sem causar protrusão anterior ou posterior significativa. Nós demonstramos que o perfil espacial da espessura corneana em olhos de pacientes com OI seguem o mesmo curso de indivíduos normais, sem qualquer desvio abrupto para a periferia. Por outro lado, os padrões de afinamento no ceratocone são geralmente localizados no centro da córnea (4-6 mm), e estão dentro dos limites normais na paquimetria periférica.<sup>6</sup> Nenhum padrão ceratocônico foi observado em qualquer imagem de tomografia corneana dos participantes com OI.



## **6. CONCLUSÃO**

A identificação do gene responsável pelo ceratocone é um procedimento complexo. Existem centenas de genes conhecidos ou prováveis nas numerosas regiões do exoma identificadas. Nosso estudo identificou mutações em um gene candidato em cada família em cromossomos diferentes. Os resultados indicam heterogeneidade genética e provável envolvimento de mais de um gene na etiologia do ceratocone, sugerindo um traço complexo que interage com os fatores ambientais.

Nossos resultados também sugerem que mudanças na composição do colágeno tipo I, como observado nos pacientes com OI não são diretamente responsáveis por alteração na curvatura corneana e por isso, não parecem estar envolvidas na patogênese do ceratocone.

## 7. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Além de nosso estudo, há informação suficiente na literatura indicando um importante componente genético na patogênese do ceratocone. Vários *loci* de susceptibilidade genética foram implicados ao ceratocone e acredita-se em uma heterogeneidade genética ao vez de um único efeito genético responsável pelo seu desenvolvimento e progressão. Por sua vez, a interação entre fatores ambientais e um número suficiente de fatores de risco genéticos de menor efeito podem levar ao desenvolvimento da doença, tornando sua característica complexa. Existe ainda a possibilidade das causas genéticas do ceratocone estarem localizadas em regiões pouco estudadas, como as regiões não-codificantes do genoma humano. A compreensão dos fatores genéticos pode significar a identificação precoce e precisa de pacientes vulneráveis ao desenvolvimento do ceratocone.

## 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1 - Rabinowitz YS. 1998. Major review: keratoconus. *Surv Ophthalmol.* 42: 297-319.
- 2 - Flores VG, Dias HL, Castro RS (2007) Penetrating keratoplasty indications in "Hospital das Clínicas-UNICAMP". *Arq Bras Oftalmol* 70:505-508.
- 3 - Kennedy RH, Bourne WM, Dyer JA (1986) A 48-year clinical and epidemiologic study of keratoconus. *Am J Ophthalmol* 101:267–273.
- 4 - Pramanik S, Musch DC, Sutphin JE, Farjo AA (2006) Extended long-term outcomes of penetrating keratoplasty for keratoconus. *Ophthalmology* 113:1633-1688.
- 5 - Magalhaes OA, Marafon SB, Ferreira RC. Gender differences in keratoconus keratoplasty: a 25-year study in Southern Brazil and global perspective. *Int Ophthalmol* 2018; 38: 1627-1633.
- 6 - Belin, MW, Villavicencio, OF; Ambrosio, RJR Tomographic Parameters for the Detection of Keratoconus: Suggestions for Screening and Treatment Parameters. *Eye contact lens.* 2014;40:326-30
- 7 - Hwang S, Lim DH, Chung TY. Prevalence and Incidence of Keratoconus in South Korea: A Nationwide Population-based Study. *Am J Ophthalmol.* 2018;192:56-64.
- 8 - Gorskova EN, Sevost'ianov EN. [Epidemiology of keratoconus in the Urals]. *Vestn Oftalmol* 1998;114:38-40.

- 9 - Hashemi H, Khabazkhoob M, Yazdani N, Ostadimoghaddam H, et al. The prevalence of keratoconus in a young population in Mashhad, Iran. *Ophthalmic Physiol Opt.* 2014;34(5):519–27. 11.
- 10 - Gordon-Shaag A, Millodot M, Essa M, Garth J, et al. Is consanguinity a risk factor for keratoconus?. *Optom Vis Sci.* 2013;90(5):448–54.
- 11 - Olivares Jiménez JL, Guerrero Jurado JC, Bermudez Rodriguez FJ, Serrano Laborda D. Keratoconus: age of onset and natural history. *Optom Vis Sci.* 1997;74:147-51.
- 12 - Zadnik K, Barr J, Edrington T, et al. Baseline findings in the Collaborative Longitudinal Evaluation of Keratoconus (CLEK) study. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1998;39:2537–46.
- 13 - Ihalainen A. Clinical and epidemiological features of keratoconus genetic and external factors in the pathogenesis of the disease. *Acta Ophthalmol Suppl.* 1986;178:1-64.
- 14 - Krachmer JH, Feder RS, Belin MW. Keratoconus and related non-inflammatory corneal disorders. *Surv Ophthalmol.* 1984;28:293-322
- 15 - Stone DL, Kenyon KR, Stark WJ: Ultrastructure of keratoconus with healed hydrops. *Am J Ophthalmol* 82:450–458, 1976
- 16 - Romero-Jiménez M, Santo domingo-Rubido J, Wolffsohn JS. Keratoconus: a review. *Cont Lens Anterior Eye* 2010; 33:157-66

- 17 - Kaldawy RM, Wagner J, Ching S, Seigel GM. Evidence of apoptotic cell death in keratoconus. *Cornea* 2002;21:206–9.
- 18 - Kenney MC, Nesburn AB, Burgeson RE, Butkowski RJ, Ljubimov AV. Abnormalities of the extracellular matrix in keratoconus corneas. *Cornea* 1997;16:345–51.
- 19 - Wilson SE, Klyce SD. Screening for corneal topographic abnormalities before refractive surgery. *Ophthalmology*. 1994;101:147–152
- 20 – Gasset AR, Hinson WA, Frias JL. Keratoconus and atopic diseases. *Ann Ophthalmol*. 1978;10:991–94.
- 21 - McMonnies CW. The evidentiary significance of case reports: eye rubbing and keratoconus. *Optom Vis Sci*. 2008;85:262–69.
- 22 – Gullen J, Butler HG. Mongolism (Down syndrome) and keratoconus. *Br J Ophthalmol*. 1963;47:321–330.
- 23 – Robertson I. Keratoconus and the Ehlers-Danlos syndrome: a new aspect of keratoconus. *Med J Aust*. 1975;1:571-3.
- 24 - Beckh U, Schönherr U, Naumann GO. Autosomal dominant keratoconus as the chief ocular symptom in Lobstein osteogenesis imperfecta tarda. *Klin Monbl Augenheilkd*. 1995;206:268-72.
- 25 - Elder M. Leber congenital amaurosis and its association with keratoconus and keratoglobus. *J Pediatr Ophthalmol Strabismus*. 1994;31:38–40.

26 - Sykes B, Ogilvie D, Wordsworth P, et al. Osteogenesis imperfecta is linked to both type I collagen structural genes. *Lancet*. 1986;2:69-72.

27 - Swierkowska J, Gajecka M Genetic factors influencing the reduction of central corneal thickness in disorders affecting the eye. *Ophthalmic Genet*. 2017 Dec;38(6):501-510.

28 - Bechara SJ, Waring GO 3rd, Insler MS. Keratoconus in two pairs of identical twins. *Cornea*. 1996;15(1):90-3.

29 - Tuft SJ, Hassan H, George S, Frazer DG, Willoughby CE. Keratoconus in 18 pairs of twins. *Acta Ophthalmol*. 2012;90(6):482-6.

30 - Weed KH, MacEwen CJ, McGhee CN. The variable expression of keratoconus within monozygotic twins: dundee University Scottish Keratoconus Study (DUSKS). *Cont Lens Anterior Eye*. 2006;29(3):123-6.

31 - Sevel D. Keratoconus - a family demonstrating the condition and a discussion of the treatment. *S Afr Med J*. 1962;36:231-2.

32 - Hammerstein W. Keratoconus concurrent in identical twins. *Ophthalmologica*. 1972;165(5):449-52.

33 - Kaya V, Utine CA, Altunsoy M, Oral D, Yilmaz OF. Evaluation of corneal topography with Orbscan II in first-degree relatives of patients with keratoconus. *Cornea*. 2008;27(5):531-4.

- 34 - Wang Y, Rabinowitz YS, Rotter JI, Yang H. Genetic epidemiological study of keratoconus: evidence for major gene determination. *Am J Med Genet.* 2000;93(5):403-9.
- 35 - Rabinowitz YS, Garbus J, McDonnell PJ. Computer-assisted corneal topography in family members of patients with keratoconus. *Arch Ophthalmol.* 1990;108(3):365-71.
- 36 - Brancati F, Valente EM, Sarkozy A, Fehèr J, Castori M, Del Duca P, Mingarelli R, Pizzuti A, Dallapiccola A locus for autosomal dominant keratoconus maps to human chromosome 3p14-q13. *B. J Med Genet.* 2004;41(3):188-92
- 37 - Steele TM, Fabinyi DC, Couper TA, Loughnan MS. Prevalence of Orbscan II corneal abnormalities in relatives of patients with keratoconus. *Clin Exp Ophthalmol.* 2008;36(9):824–30.
- 38 - Kriszt A, Losonczy G, Berta A, Vereb G, et al. Segregation analysis suggests that keratoconus is a complex non-mendelian disease. *Acta Ophthalmol.* 2014;92:562–8.
- 39 - M. Piccione, G. Serra, C. Sanfilippo, E. Andreucci, I. Sani, G. Corsello. A new mutation in EDA gene in X-linked hypohidrotic ectodermal dysplasia associated with keratoconus. *Minerva Pediatrica.* 2012;64:59–64.
- 40 - Whitelock RB, Li Y, Zhou LL, Sugar J, Yue BY. Expression of transcription factors in keratoconus, a cornea-thinning disease. *Biochem Biophys Res Commun.* 1997;235(1):253-8.

41 - Tynismaa H, Sistonen P, Tuupanen S, et al. A locus for autosomal dominant keratoconus: linkage to 16q22.3-q23.1 in Finnish families. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2002;43:3160 –3164.

42 - Hughes AE, Dash DP, Jackson AJ, et al. Familial keratoconus with cataract: linkage to the long arm of chromosome 15 and exclusion of candidate genes. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2003;44:5063– 5066.

43 - Heaven CJ, Lalloo F, McHale E. Keratoconus associated with chromosome 13 ring abnormality. *Br J Ophthalmol.* 2000;84:1079.

44 - Brancati F, Valente EM, Sarkozy A, et al. A locus for autosomal dominant keratoconus maps to human chromosome 3p14 – q13. *J Med Genet.* 2004;41:188 – 92.

45 - Heon E, Greenberg A, Kopp KK, et al. VSX1: a gene for posterior polymorphous dystrophy and keratoconus. *Hum Mol Genet.* 2002;11:1029-36.

46 - Bisceglia L, Ciaschetti M, De Bonis P, et al. VSX1 mutational analysis in a series of Italian patients affected by keratoconus: detection of a novel mutation. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2005;46:39-45.

47 - Tang YG, Rabinowitz YS, Taylor KD, et al. Genomewide linkage scan in a multigeneration Caucasian pedigree identifies a novel locus for keratoconus on chromosome 5q14.3-q21.1. *Genet Med.* 2005;7:397– 405.



48 – Fullerton J, Paprocki P, Foote S, et al. Identify-by-descent approach to gene localisation in eight individuals affected by keratoconus from north-west Tasmania, Australia. *Hum Genet.* 2002;110:462-70.

49 – Hamed A, Khaliq S, Ismail M, et al. A novel locus for Leber congenital amaurosis (LCA4) with anterior keratoconus mapping to chromosome 17p13. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2000;41:629.

50 - Bisceglia L, De Bonis P, Pizzicoli C, et al. Linkage analysis in keratoconus: replication of locus 5q21.2 and identification of other suggestive Loci. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2009;50(3):1081-6.

51 - Li X, Bykhovskaya Y, Haritunians T, Siscovick D, et al. - A genome-wide association study identifies a potential novel gene locus for keratoconus, one of the commonest causes for corneal transplantation in developed countries. *Hum Mol Genet.* 2012;15:421-9.

52 - Liskova P, Hysi PG, Waseem N, Ebenezer ND, Bhattacharya SS, Tuft SJ. Evidence for keratoconus susceptibility locus on chromosome 14: a genome-wide linkage screen using single-nucleotide polymorphism markers. *Arch Ophthalmol.* 2010;128:1191-5

53 - Stabuc-Silih M, Strazisar M, Hawlina M, Glavac D. Absence of pathogenic mutations in VSX1 and SOD1 genes in patients with keratoconus. *Cornea.* 2010;29:172-6.

54 - Aldave AJ, Yellore VS, Salem AK, Yoo GL, Rayner SA, Yang H, Tang GY, Piconell Y, Rabinowitz YS. No VSX1 gene mutations associated with keratoconus.

*Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2006;47:2820-2.

55 – Tang YG, Picornell Y, Su X, Li X, Yang H, Rabinowitz YS. Three VSX1 gene mutations, L159M, R166W, and H244R, are not associated with keratoconus. *Cornea.* 2008;27(2):189-92.

56 - Mok JW, Baek SJ, Joo CK. VSX1 gene variants are associated with keratoconus in unrelated Korean patients. *J Hum Genet.* 2008;53(9):842-9.

57 - Abu-Amero KK, Hellani AM, Al Mansouri SM, Kalantan H, Al-Muammar AM. High-resolution analysis of DNA copy number alterations in patients with isolated sporadic keratoconus. *Mol Vis.* 2011;17:822-26.

58 - Verma A, Das M, Srinivasan M, Prajna NV, Sundaresan P. Investigation of VSX1 sequence variants in South Indian patients with sporadic cases of keratoconus. *BMC Res Notes.* 2013;18(6):103.

59 - Udar N, Atilano SR, Brown DJ, et al. SOD1: a candidate gene for keratoconus. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2006;47:3345–51.

60 - Brown DJ, Lin B, Chwa M, et al. Elements of the nitric oxide pathway can degrade TIMP-1 and increase gelatinase activity. *Mol Vis.* 2004;10:281–88.

61 – Darchen, F. and Goud, B. (2000) Multiple aspects of Rab protein action in the secretory pathway: focus on Rab3 and Rab6. *Biochimie.* 82;375–84.

62 - Schluter, O.M., Khvotchev, M., Jahn, R. and Sudhof, T.C. Localization versus function of Rab3 proteins. Evidence for a common regulatory role in controlling

fusion. *J. Biol. Chem.* 2002;277:40919–29.

63 – Aligianis, I.A., Johnson, C.A., Gissen, P., Chen, D., Hampshire, D., Hoffmann, K., Maina, E.N., Morgan, N.V., Tee, L., Morton, J. et al. Mutations of the catalytic subunit of RAB3GAP cause Warburg Micro syndrome. *Nat. Genet.* 2005;37:221–23.

64 - Morris-Rosendahl, D.J., Segel, R., Born, A.P., Conrad, C., Loeys, B., Brooks, S.S., Muller, L., Zeschnigk, C., Botti, C., Rabinowitz, R. et al. New RAB3GAP1 mutations in patients with Warburg Micro Syndrome from different ethnic backgrounds and a possible founder effect in the Danish. *Eur. J. Hum. Genet.* 2010;18:1100–06.

65 - Hamalainen ER, Jones TA, Sheer D, et al. Molecular cloning of human lysyl oxidase and assignment of the gene to chromosome 5q23.3-31.2. *Genomics.* 1991;11:508–16.

66 - Bykhovskaya Y1, Li X, Epifantseva I, Haritunians T, Siscovick D, Aldave A, Szczotka-Flynn L, Iyengar SK, Taylor KD, Rotter JI, Rabinowitz YS Variation in the lysyl oxidase (LOX) gene is associated with keratoconus in family-based and case-control studies. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2012 Jun 28;53(7):4152-7.

67 - Lu Y, Vitart V, Burdon KP et al. Genome-wide association analyses identify multiple loci associated with central corneal thickness and keratoconus. *Nat Genet.* 2013;45(2):155-63.

68 - Li X, et al. A genome-wide association study identifies a potential novel gene locus for keratoconus, one of the commonest causes for corneal transplantation in developed countries. *Hum Mol Genet.* 2012; 21:421–429.

69 - Li X, Bykhovskaya Y, Canedo AL, et al. Genetic association of COL5A1 variants in keratoconus patients suggests a complex connection between corneal thinning and keratoconus. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2013; 54:2696 – 704.

70 - Sahebjada S, Schache M, Richardson AJ, et al. Evaluating the association between keratoconus and the corneal thickness genes in an independent Australian population. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2013;54:8224–28

71 - Vincent AL, Jordan CA, Cadzow MJ, Merriman TR, McGhee CN. Mutations in the zinc finger protein gene, ZNF469, contribute to the pathogenesis of keratoconus. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2014;55(9):5629-35

72 - Gao X, Gauderman WJ, Liu Y, Marjoram P, et al. A genome-wide association study of central corneal thickness in Latinos. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2013;54(4):2435-43.

73 - Abu-Amero KK, Azad TA, Kalantan H, Sultan T, Al-Muammar AM. Mitochondrial sequence changes in keratoconus patients. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2014;55(3):1706-10.

74 - Abu-Amero KK, Kondkar AA, Azad TA, Sultan T, Kalantan H, Al-Muammar AM. Keratoconus is associated with increased copy number of mitochondrial DNA. *Mol Vis*. 2014;20:1203-8

75 - Lee H, Deignan JL, Dorrani N, et al. Clinical exome sequencing for genetic identification of rare Mendelian disorders. *JAMA*. 2014;312:1880-7.

76 - 1000 Genomes Project Consortium, Auton A, Brooks LD, Durbin RM, et al. A global reference for human genetic variation. *Nature*. 2015;526:68–74.

77 - Zimmermann DR, Fischer RW, Winterhalter KH, Witmer R, Vaughan L. Comparative studies of collagens in normal and keratoconus corneas. *Exp Eye Res*. 1988;46:431-42.

78 - Scott JE, Haigh M. Proteoglycan-type I collagen fibril interactions in bone and non-calcifying connective tissues. *Biosci Rep*. 1985;5:71-81.

79 – Karolak JA, Kulinska K, Nowak DM, et al. Sequence variants in COL4A1 and COL4A2 genes in Ecuadorian families with keratoconus. *Mol Vis* 2011;17:827–843.

80 - Aldave AJ, Bourla N, Yellore VS, et al. Keratoconus is not associated with mutations in COL8A1 and COL8A2. *Cornea* 2007;26(8):963–965

81 - Sugar J, Macsai MS. What causes keratoconus? *Cornea* 2012;31:716-9.

82 - Atilano SR, Coskun P, Chwa M, et al. Accumulation of mitochondrial DNA damage in keratoconus corneas. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2005;46:1256-63.

83 - Arnal E, Peris-Martinez C, Menezo JL, et al. Oxidative stress in keratoconus? *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2011;52:8592-7.

84 - Balasubramanian SA, Pye DC, Willcox MD. Are proteinases the reason for keratoconus? *Curr Eye Res* 2010;35:185-91.

85 - Chwa M, Atilano SR, Hertzog D, et al. Hypersensitive response to oxidative

stress in keratoconus corneal fibroblasts. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2008;49:4361-9.

86 - Kenney MC, Chwa M, Atilano SR, et al. Increased levels of catalase and cathepsin V/L2 but decreased TIMP-1 in keratoconus corneas: evidence that oxidative stress plays a role in this disorder. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2005;46:823-32.

87 - Smith VA, Easty DL. Matrix metalloproteinase 2: involvement in keratoconus. *Eur J Ophthalmol* 2000;10:215–26.

88 - Chaerkady R, Shao H, Scott SG, Pandey A, Jun AS, Chakravarti S. The keratoconus corneal proteome: loss of epithelial integrity and stromal degeneration. *J Proteomics*. 2013 Jul 11;87:122-31.

89 - Smith VA, Matthews FJ, Majid MA, Cook SD. Keratoconus: matrix metalloproteinase-2 activation and TIMP modulation. *Biochim Biophys Acta* 2006;1762:431-9.

90 - Ahn CS, McMahon T, Sugar J, Zhou L, Yue BY. Levels of alpha1-proteinase inhibitor and alpha2-macroglobulin in the tear film of patients with keratoconus. *Cornea* 1999;18:194–8.

91 - Ha NT, Nakayasu K, Murakami A, Ishidoh K, Kanai A. Microarray analysis identified differentially expressed genes in keratocytes from keratoconus patients. *Curr Eye Res*. 2004;28:373-9.

92 - Garfias Y, Navas A, P´erez-Cano HJ, Quevedo J, L. Villalvazo, Zenteno JC, Comparative expression analysis of aquaporin-5 (AQP5) in keratoconic and healthy

corneas. *Molecular Vision*. 2008;14:756–761.

93 - Nielsen K, Birkenkamp-Demtröder K, Ehlers N, Orntoft TF. Identification of differentially expressed genes in keratoconus epithelium analyzed on microarrays. 2003;44:2466–2476.

94 - Nguyen TH, Nakayasu K, Murakami A, Ishidoh K, Kanai A. Microarray analysis identified differentially expressed genes in keratocytes from keratoconus patients. *Current Eye Research*. 2004;28:373–379.

95 - Lee JE, Oum BS, Choi HY, Lee SU, Lee JS. Evaluation of differentially expressed genes identified in keratoconus. *Molecular Vision*. 2009;15: 2480–2487.

96 - Wilson SE, He YG, Weng J, Li Q, McDowall AW, Vital M, Chwang EL. Epithelial injury induces keratocyte apoptosis: hypothesized role for the interleukin-1 system in the modulation of corneal tissue organization and wound healing. *Exp Eye Res*. 1996;62:325-7.

97 - Edwards M, McGhee CN, Dean S. The genetics of keratoconus. *Clin Exp Ophthalmol* 2001;29:345-51.

98 – Tennessen JA, Bigham AW, O'Connor TD et al. Evolution and functional impact of rare coding variation from deep sequencing of human exomes. *Science*. 2012;337:64–9.

99 - Cookson WOCM, Moffatt MF. The genetics of atopic dermatitis. *Curr Opin Allergy Clin Immunol*. 2002;2:383-87.

100 - Akiyama M. *FLG* mutations in ichthyosis vulgaris and atopic eczema: spectrum of mutations and population genetics. *Br J Dermatol.* 2010;162:472–77.

101 – Droitcourt C, Touboul D, Ged C et al. A prospective study of filaggrin null mutations in keratoconus patients with or without atopic disorders. *Dermatol.* 2011;222:336-41.

102 - Bawazeer AM, Hodge WG, Lorimer B. Atopy and keratoconus: a multivariate analysis. *Br J Ophthalmol.* 2000;84:834-36.

103 - Lechner J, Porter LF, Rice A et al. Enrichment of pathogenic alleles in the brittle cornea gene, *ZNF469*, in keratoconus. *Hum Mol Genet.* 2014;23:5527-35.

104 - Brizola E, Félix TM, Shapiro JR. Pathophysiology and therapeutic options in osteogenesis imperfecta: an update. *Res Rep Endocr Disord.* 2016;6:17-30.

105 - Sillence DO, Barlow KK, Garber AP, et al. Osteogenesis imperfecta type II delineation of the phenotype with reference to genetic heterogeneity. *Am J Med Genet.* 1984;17:407-423.



## 9. ANEXOS

### 9.1 ANEXO 1. APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA MÉDICA

HOSPITAL DE CLÍNICAS DE  
PORTO ALEGRE - HCPA /  
UFRGS



#### PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

##### DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

**Título da Pesquisa:** Análise genética de pacientes com ceratocone

**Pesquisador:** LAVINIA SCHULER FACCINI

**Área Temática:** Genética Humana:

(Trata-se de pesquisa envolvendo Genética Humana que não necessita de análise ética por parte da CONEP.);

**Versão:** 2

**CAAE:** 49171315.0.1001.5327

**Instituição Proponente:** Hospital de Clínicas de Porto Alegre

**Patrocinador Principal:** MINISTERIO DA CIENCIA, TECNOLOGIA E INOVACAO

##### DADOS DO PARECER

**Número do Parecer:** 1.356.806

##### Apresentação do Projeto:

O projeto "Análise Genética de pacientes com Ceratocone" é um estudo multicêntrico, transversal com amostra de conveniência estimada em 200 pacientes-índice e aproximadamente 600 familiares, totalizando 800 indivíduos, que objetiva investigar as bases genéticas do ceratocone em pacientes brasileiros, através de história familiar detalha, análise por tomografia de córnea, e análise molecular de mutações em genes candidatos já descritos na literatura. Os pacientes serão provenientes do ambulatório de córnea e doenças externas do Hospital de Clínicas de Porto Alegre e do Hospital Banco de Olhos de Porto Alegre.

##### Objetivo da Pesquisa:

**Objetivo principal:**

Investigar as bases genéticas do ceratocone em pacientes brasileiros, através de história familiar detalha, análise por tomografia de córnea, e análise molecular de mutações em genes candidatos já descritos na literatura.

**Objetivos secundários:**

1. Investigar a prevalência de ceratocone nos familiares em primeiro grau através de análise por tomografia da córnea e por historia familiar coletada por questionário (heredograma estruturado).

**Endereço:** Rua Ramiro Barcelos 2.350 sala 2227 F

**Bairro:** Bom Fim

**CEP:** 90.035-903

**UF:** RS

**Município:** PORTO ALEGRE

**Telefone:** (51)3359-7640

**Fax:** (51)3359-7640

**E-mail:** cephcpa@hcpa.edu.br

Continuação do Parecer: 1.356.806

estimando assim a prevalência de casos esporádicos e isolados.

2. Estabelecer correlação genótipo-fenótipo, ou seja, a comparação entre as mutações encontradas e o tipo de ceratocone, sua expressão clínica entre e dentro de famílias.

3. Comparar os casos com recorrência familiar com o tipo de mutação encontrada, gravidade e idade de aparecimento da manifestação clínica.

**Avaliação dos Riscos e Benefícios:**

**Riscos:** A tomografia de córnea é um exame não invasivo, assim como a coleta de aproximadamente 3ml de saliva em tubo esterilizado. Os responsáveis garantem que o risco de quebra de confidencialidade será evitado neste estudo.

**Benefícios:** A identificação de mutações poderá auxiliar o diagnóstico precoce de ceratocone e permitir a realização de procedimento para impedir o processo evolutivo da doença, possibilitando redução no número de transplantes de córnea. O estudo do papel de cada um dos genes envolvidos poderá auxiliar na compreensão dos mecanismos patogênicos causadores dessa doença e permitirá aconselhamento genético em famílias acometidas.

**Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:**

O ceratocone (OMIM148300) é uma degeneração progressiva não-inflamatória da córnea. É a principal causa de transplante de córnea em todo o mundo. Sua manifestação clínica geralmente inicia-se na puberdade e avança até a quarta década de vida, provocando afinamento e protrusão da região central. Essa distorção provoca erros refrativos e conseqüente baixa de acuidade visual, chegando a provocar cegueira. Pode ser visto em todas as etnias sem prevalência por gênero, apresentando sintomas variados conforme o estágio da doença. A heterogeneidade genética e a diversidade fenotípica do ceratocone tornam a sua análise complexa. Múltiplos loci relacionados à suscetibilidade a diversas doenças foram identificados considerando o ceratocone um traço complexo. Identificar pessoas geneticamente predispostas pode diminuir drasticamente o impacto da doença na visão. Além disso, a terapia gênica pode ser uma realidade em um futuro próximo.

**Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:**

O projeto inclui referencial teórico, objetivos, breve descrição da amostra, da metodologia e do número amostral, critérios de inclusão e exclusão, análise estatística, descrição dos riscos e benefícios e referências bibliográficas. No Formulário da Plataforma Brasil consta a hipótese, o cronograma de atividades e o orçamento simplificado do projeto. Os autores também incluíram o

Endereço: Rua Ramiro Barcelos 2.350 sala 2227 F  
Bairro: Bom Fim CEP: 90.035-903  
UF: RS Município: PORTO ALEGRE  
Telefone: (51)3359-7640 Fax: (51)3359-7640 E-mail: cephcpa@hcpa.edu.br

HOSPITAL DE CLÍNICAS DE  
PORTO ALEGRE - HCPA /  
UFRGS



Continuação do Parecer: 1.356.806

Formulário de Delegação de Funções e o TCLE.

**Recomendações:**

Nada a recomendar.

**Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:**

As pendências emitidas para o projeto no parecer 1.294.286 foram adequadamente respondidas pelos pesquisadores, conforme carta de respostas adicionada em 20/11/2015, exceto as pendências referente a inclusão da UFRGS como coparticipante e o TCLE o qual apesar de ter sido modificado ainda precisa de alterações. Convidamos os pesquisadores a comparecerem na UARP/GPPG para auxílio na elaboração da nova versão do TCLE.

**Considerações Finais a critério do CEP:**

A análise foi realizada com base em todos os documentos apresentados, incluindo o projeto em sua íntegra. O projeto deverá estar cadastrado também no sistema WebGPPG, em função dos aspectos logísticos e financeiros. Os pesquisadores deverão responder a todos os questionamentos indicados na lista de pendências deste parecer, através de uma carta ao CEP (word), que deverá ser adicionada à Plataforma Brasil. Quando a resposta alterar os documentos anteriormente submetidos, como, por exemplo, o projeto ou o TCLE, adicionar na carta de respostas claramente a identificação do item que foi modificado e nova versão dos documentos.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BASICAS_DO_PROJETO_555201.pdf	20/11/2015 13:50:19		Aceito
Outros	CARTARESPOSTA.docx	20/11/2015 13:49:15	Otávio de Azevedo Magalhães	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	gencone20nov.docx	20/11/2015 13:37:59	Otávio de Azevedo Magalhães	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLEatualizado.docx	20/11/2015 13:37:29	Otávio de Azevedo Magalhães	Aceito
Declaração de Pesquisadores	CeratoconeFormularioDelegacaoFuncoes.pdf	14/09/2015 09:35:16	LAVINIA SCHULER FACCINI	Aceito
Folha de Rosto	FolhadeRostoCeratoconeHCPA.pdf	14/09/2015 09:34:51	LAVINIA SCHULER FACCINI	Aceito
TCLE / Termos de	TCLEGenCone09set.docx	08/09/2015	Otávio de Azevedo	Aceito

Endereço: Rua Ramiro Barcelos 2.350 sala 2227 F  
Bairro: Bom Fim CEP: 90.035-903  
UF: RS Município: PORTO ALEGRE  
Telefone: (51)3359-7640 Fax: (51)3359-7640 E-mail: cephcpa@hcpa.edu.br

HOSPITAL DE CLÍNICAS DE  
PORTO ALEGRE - HCPA /  
UFRGS



Continuação do Parecer: 1.356.806

Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLEGenCone09set.docx	21:40:07	Magalhães	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	gencone08set.docx	08/09/2015 21:34:33	Otávio de Azevedo Magalhães	Aceito

**Situação do Parecer:**

Aprovado

**Necessita Apreciação da CONEP:**

Não

PORTO ALEGRE, 08 de Dezembro de 2015

---

**Assinado por:**  
**José Roberto Goldim**  
**(Coordenador)**

**Endereço:** Rua Ramiro Barcelos 2.350 sala 2227 F  
**Bairro:** Bom Fim **CEP:** 90.035-903  
**UF:** RS **Município:** PORTO ALEGRE  
**Telefone:** (51)3359-7640 **Fax:** (51)3359-7640 **E-mail:** cephcpa@hcpa.edu.br

## 9.2 ANEXO 2. TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Projeto: ANÁLISE GENÉTICA DE PACIENTES COM CERATOCONE

Estamos estudando as características genéticas dos pacientes portadores de CERATOCONE. Para isso, vamos analisar a história de famílias com ceratocone, em que são importantes informações tanto dos afetados, como dos seus familiares sem esta alteração. Precisaremos realizar uma entrevista com perguntas sobre a história da sua família, fazer um exame clínico e exame de imagem (tomografia da córnea). Esse exame clínico e imagem será realizado por uma de por um médico oftalmologista: Dr. Otávio Magalhães. O exame de imagem será realizado no Hospital Banco de Olhos de Porto Alegre. A coleta de saliva poderá ser realizada tanto no Hospital Banco de Olhos de Porto Alegre como no Hospital de Clínicas de Porto Alegre.

Gostaríamos de pedir a sua autorização para realizar estes procedimentos. O material coletado será utilizado única e exclusivamente para fins do projeto de pesquisa, isto é, para pesquisa de fatores genéticos que causam o ceratocone, sendo garantido o sigilo das informações obtidas. As análises laboratorial será feita no Departamento de Genética na Universidade Federal do Rio Grande do Sul .

Riscos envolvidos: O exame de tomografia de córnea é um exame não-invasivo que não apresenta emissão de radiação. A coleta de saliva é um procedimento indolor e será realizada por pessoal devidamente treinado utilizando um recipiente descartável e individual. Você irá cuspir uma pequena quantidade (2 a 3 ml) em um tubo limpo. O contato da boca é com a parte esterilizada do recipiente, portanto o risco de contaminação e desconforto com a coleta é mínimo. O coordenador do estudo garante que os riscos de quebra de confidencialidade e privacidade serão evitados.

Benefícios : O conhecimento sobre as alterações genéticas que causam o ceratocone irão permitir o melhor entendimento de suas manifestações clínicas, auxiliar a seu diagnóstico rápido e eficaz e proporcionar o aconselhamento genético das famílias. Identificar os pacientes em estágio inicial poderá reduzir drasticamente a necessidade de transplante de córnea por essa doença.

Os pesquisadores responsáveis pelo projeto são a médica geneticista, profa. Lavinia Schüller-Faccini, da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (51-3308-9826) e o médico oftalmologista Dr. Otávio Magalhães (51-30222733), que poderão ser contatadas em caso de dúvidas, assim como o Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (51 3308-3629). Outra forma de contato é através do email: [pesquisaceratocone@gmail.com](mailto:pesquisaceratocone@gmail.com)

Ao participar deste projeto você tem o direito de receber resposta à qualquer pergunta ou esclarecimento a qualquer dúvida a cerca da pesquisa. Também tem liberdade de não participar do estudo ou de mudar de idéia mesmo depois de ter concordado.

**A. Consentimentos dados pelo participante com idade adulta legal**

**Coleta de dados familiares e de saúde (entrevista)**

Concordo em fornecer informações sobre mim e minha família, relacionadas ao acometimento de ceratocone e outros dados de saúde.

Não concordo em fornecer informações sobre mim e minha família, relacionadas ao acometimento de ceratocone e outros dados de saúde.

**Exame**

Concordo em ser examinado por médico oftalmologista e geneticista.

Não concordo em ser examinado por médico oftalmologista e geneticista.

**Coleta de material biológico (saliva)**

Concordo em fornecer amostra de saliva para extração de DNA para análise de fatores genéticos que causam ceratocone.

Não concordo em fornecer amostra de saliva para extração de DNA para análise de fatores genéticos que causam ceratocone.

Declaro que li ou me foi lido este termo e que minhas dúvidas foram esclarecidas antes da concordância na participação. Declaro ainda que uma copia deste termo me foi fornecida.

Nome \_\_\_\_\_ do  
participante: \_\_\_\_\_

Assinatura \_\_\_\_\_ ou impressão digital: \_\_\_\_\_  
Data: \_\_\_\_\_

Testemunha no caso de participante não alfabetizado: \_\_\_\_\_

Nome do pesquisador: Lavinia Schuler Faccini (51) 3308-9826

Assinatura: \_\_\_\_\_ Data: \_\_\_\_\_

Nome do pesquisador: Otávio de Azevedo Magalhães (51) 3022-2733

### 9.3 – ANEXO 3. ACEITE EM REVISTA INDEXADA

**Decision Letter (ABO-2018-0203.R2)**

**From:** emrocha@fmrp.usp.br

**To:** otaviomaga@yahoo.com.br

**CC:** otaviomaga@yahoo.com.br, thaynewk@gmail.com, gewachholz@gmail.com, lavinia.faccini@ufrgs.br

**Subject:** ABO - Arquivos Brasileiros de Oftalmologia - Decision on Manuscript ID ABO-2018-0203.R2

**Body:** 01-Jan-2019

Dear Dr. Magalhaes:

It is a pleasure to accept your manuscript entitled "Whole-Exome Sequencing in Familial Keratoconus: The Challenges of a Genetically Complex Disorder." in its current form for publication in the ABO - Arquivos Brasileiros de Oftalmologia. The comments of the reviewer(s) who reviewed your manuscript are included at the foot of this letter.

Thank you for your fine contribution. On behalf of the Editors of the ABO - Arquivos Brasileiros de Oftalmologia, we look forward to your continued contributions to the Journal.

Sincerely,  
Dr. Eduardo Rocha  
Editor-in-Chief, ABO - Arquivos Brasileiros de Oftalmologia  
emrocha@fmrp.usp.br

**Date Sent:** 01-Jan-2019



## 9.4 – ANEXO 4. PUBLICAÇÃO EM REVISTA INDEXADA

### Collagen I Defect Corneal Profiles in Osteogenesis Imperfecta

Magalhaes, Otavio A., MD, MSc<sup>\*†</sup>; Rohenkohl, Helena C., MD<sup>†</sup>; de Souza, Liliâne Todeschini, BBS, PhD<sup>‡</sup>; Schuler-Faccini, Lavinia, MD, PhD<sup>‡</sup>; Félix, Têmis M., MD, PhD<sup>‡</sup>

Cornea: December 2018 - Volume 37 - Issue 12 - p 1561–1565  
doi: 10.1097/ICO.0000000000001764  
Clinical Science

BUY SDC

Abstract

Author Information

Article Metrics

**Purpose:** The goal of this study was to evaluate corneal profiles of patients with osteogenesis imperfecta (OI) due to a collagen I gene mutation.

**Methods:** This was a cross-sectional comparative study. There were 84 eyes from 42 patients with OI types I, III, and IV who were recruited from the OI Clinic at the Clinical Hospital of Porto Alegre, Brazil. All cases presented either *COL1A1* or *A2* gene mutations. Controls were matched by sex, age, and refractive error. Corneal Scheimpflug tomography was used to determine curvature and thickness parameters in both groups.

**Results:** Quantitative collagen mutations were found only in OI type I. Qualitative mutations were responsible for all mutations observed in type III and IV patients. Each OI type presented significantly lower pachymetric values at the thinnest point compared with controls (443.7–505.1 vs. 541.9–548.5  $\mu\text{m}$ ;  $P < 0.001$ ). In addition, significantly lower pachymetric values were observed in patients with OI compared with controls in all positions between the central and corneal periphery (581.4–657.0 vs. 704.5–720.7  $\mu\text{m}$  at an 8.0-mm-diameter circle;  $P < 0.001$ ). Differences in anterior and posterior radii of curvatures, respectively, between patients with OI and controls were not statistically significant (7.64–7.80 vs. 7.65–7.69 mm;  $P > 0.05$ ) except for a lower anterior radii of curvatures in type III (7.33 vs. 7.72 mm;  $P < 0.01$ ).

**Conclusions:** Although patients with OI have homogenously thinner corneas compared with controls, we observed that a collagen I chain mutation was not responsible for corneal curvature alterations in OI.