



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS

SEQUENCIAMENTO DE EXOMAS PARA IDENTIFICAÇÃO DE VARIANTES GENÉTICAS RELACIONADAS AO
DESENVOLVIMENTO DO CERATOCONE EM UMA FAMÍLIA BRASILEIRA

Lislie Vitória Rodrigues Guimarães

Araras - SP

2025

Lislie Vitória Rodrigues Guimarães

SEQUENCIAMENTO DE EXOMAS PARA IDENTIFICAÇÃO DE VARIANTES GENÉTICAS RELACIONADAS AO
DESENVOLVIMENTO DO CERATOCONE EM UMA FAMÍLIA BRASILEIRA

Trabalho de conclusão de curso apresentado
como requisito parcial para a obtenção do título
de Licenciada em Ciências Biológicas pela
Universidade Federal de São Carlos.

Orientador: Renato Nallin Montagnoli
Co-orientadora: Mônica Barbosa de Melo
Financiamento: CNPq

Araras - SP

2025

Guimarães, Lislíe Vitória Rodrigues

Sequenciamento de exomas para identificação de variantes genéticas relacionadas ao desenvolvimento do ceratocone em uma família brasileira / Lislíe Vitória Rodrigues Guimarães -- 2025.
30f.

TCC (Graduação) - Universidade Federal de São Carlos, campus Araras, Araras
Orientador (a): Renato Nallin Montagnolli
Banca Examinadora: Ane Hackbart de Medeiros, Thiago Adalton Rosa Rodrigues
Bibliografia

1. Ceratocone. 2. Sequenciamento de exomas. 3. Bioinformática. I. Guimarães, Lislíe Vitória Rodrigues. II. Título.

Ficha catalográfica desenvolvida pela Secretaria Geral de Informática (SIn)

DADOS FORNECIDOS PELO AUTOR

Bibliotecário responsável: Maria Helena Sachi do Amaral - CRB/8
7083

FOLHA DE APROVAÇÃO

Lislie Vitória Rodrigues Guimarães

SEQUENCIAMENTO DE EXOMAS PARA IDENTIFICAÇÃO DE VARIANTES GENÉTICAS RELACIONADAS AO
DESENVOLVIMENTO DO CERATOCONE EM UMA FAMÍLIA BRASILEIRA

Trabalho de conclusão de curso apresentado
como requisito parcial para a obtenção do título
de Licenciada em Ciências Biológicas pela
Universidade Federal de São Carlos.

Orientador

Dr. Renato Nallin Montagnoli

Universidade Federal de São Carlos

Examinadora

Dra. Ane Hackbart de Medeiros

Universidade Federal de São Carlos

Examinador

Me. Thiago Adalton Rosa Rodrigues

Universidade Estadual de Campinas

À ciência brasileira e ao ensino.

AGRADECIMENTO

Agradeço a todos os professores que estiveram comigo nessa jornada, durante 5 anos de curso, e que me incentivaram a seguir adiante.

Agradeço aos meus orientadores, professores Renato Nallin Montagnolli e Mônica Barbosa de Melo, que acreditaram no meu potencial e se disponibilizaram para me guiar nessa pesquisa.

Agradeço a todos os meus amigos e colegas de laboratório pelas risadas, pelo apoio, pela colaboração e companheirismo, deixando tudo mais divertido.

Agradeço à minha mãe, por estar sempre ao meu lado e me incentivando aos estudos.

Sou eternamente grata pela Universidade Federal de São Carlos e Universidade Estadual de Campinas por toda a estrutura que tornou possível a minha formação e desenvolvimento acadêmico. E também agradeço o Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela bolsa de Iniciação Científica concedida para a realização deste estudo.

“A mind needs books as a sword needs a
whetstone, if it is to keep its edge”
(MARTIN, 1996, p. 135).

RESUMO

O ceratocone é uma patologia oftalmológica degenerativa caracterizada por ectasia progressiva, de caráter inflamatório, bilateral e multifatorial, que afeta a curvatura corneana e gera um astigmatismo irregular. Ocorre entre homens e mulheres de todas as ancestralidades, apresentando uma incidência mundial de 1 portador a cada 2.000 nascidos por ano e de 1,4 a cada 2.000 no Brasil. Sua patogênese tem início na adolescência de forma assintomática, muitas vezes sendo confundido com casos de astigmatismo, e a única possibilidade de diagnóstico precoce provém de exames de imagem da córnea. Na ausência destes, o quadro clínico avança com prejuízo significativo à acuidade visual do portador. Fatores ambientais, sistêmicos e genéticos estão diretamente ligados à manifestação do ceratocone, sendo que até o momento poucos estudos retratam a investigação de famílias portadoras através do sequenciamento de exomas. Ademais, vale destacar que a heterogeneidade da coorte brasileira constitui um relevante modelo genotípico e fenotípico para estudos sobre o ceratocone. Logo, essa diversidade genética amplia o potencial para identificação de variantes no DNA relacionadas à doença, exigindo pesquisas para uma melhor compreensão de sua fisiopatologia e mecanismos. Neste sentido, o objetivo deste estudo é investigar as bases genéticas envolvidas na etiologia do ceratocone, por meio dos sequenciamento de exomas e análise de predição de risco em famílias brasileiras, visando a identificação e caracterização de genes candidatos envolvidos em vias biológicas relacionadas à patogênese e fisiopatologia desta condição ocular e desenvolver uma maior compreensão acerca das bases genéticas envolvidas em sua etiologia no Brasil.

Palavras-chave: Ceratocone, Sequenciamento de Exomas, Bioinformática.

ABSTRACT

Keratoconus is a degenerative ophthalmological disorder characterized by progressive ectasia of an inflammatory, bilateral, and multifactorial nature, affecting corneal curvature and leading to irregular astigmatism. It occurs in both men and women of all ethnicities, with a global incidence of 1 case per 2,000 births per year and 1.4 per 2,000 in Brazil. Its pathogenesis typically begins in adolescence in an asymptomatic manner, often being mistaken for simple astigmatism, and the only means of early diagnosis comes from corneal imaging exams. In their absence, the clinical condition progresses, resulting in a significant decline in the patient's visual acuity. Environmental, systemic, and genetic factors are directly associated with the manifestation of keratoconus, and so far, few studies have explored the investigation of affected families through exome sequencing. Moreover, it is important to highlight that the heterogeneity of the Brazilian cohort represents a relevant genotypic and phenotypic model for studies on keratoconus. Thus, this genetic diversity enhances the potential for identifying DNA variants related to the disease, emphasizing the need for further research to improve the understanding of its pathophysiology and mechanisms. In this context, the objective of this study is to investigate the genetic bases involved in the etiology of keratoconus through exome sequencing and risk prediction analysis in Brazilian families, aiming to identify and characterize candidate genes involved in biological pathways related to the pathogenesis and pathophysiology of this ocular condition, and to develop a deeper understanding of the genetic foundations underlying its etiology in Brazil.

Key words: Keratoconus, Exome Sequencing, Bioinformatic.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Progressão do Ceratocone.....	13
Figura 2 - Heredograma completo da família estudada. Para o sequenciamento de exoma, foram escolhidos os indivíduos II-2, II-4, II-5 e III-4.....	19
Figura 3 – Variantes em comum entre os pacientes II-4 (p2) e III-4 (p3).....	24
Figura 4 – Vias Biológicas identificadas por meio do enriquecimento funcional do <i>PIEZO1</i>	25
Figura 5 – Vias Biológicas identificadas por meio do enriquecimento funcional do <i>ZSCAN10</i>	26
Figura 6 – Gel de eletroforese para os indivíduos II-3, II-4, II-5, III-4.....	26

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Protocolos da reação em cadeia da polimerase para a amplificação dos genes <i>PIEZO1</i> e <i>ZSCAN10</i>	23
Tabela 2 – Sequências de primers para a amplificação das regiões de interesse correspondentes aos genes <i>PIEZO1</i> e <i>ZSCAN10</i>	23
Tabela 3 – Variantes que segregam com o fenótipo (presentes nos afetados e ausentes nos não afetados).....	24
Tabela 4 – Parâmetros dos genes selecionados.....	24

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

<i>ACMG</i>	Colégio Americano de Genética Médica e Genômica, do inglês <i>American College of Medical Genetics and Genomics</i>
CAAE	Certificado de Apresentação para Apreciação Ética
<i>COL4A3</i>	<i>Collagen type IV alpha 3 chain</i>
<i>COL4A4</i>	<i>Collagen type IV alpha 4 chain</i>
<i>COL5A1</i>	<i>Collagen type V alpha 1 chain</i>
<i>DNA</i>	Ácido Desoxirribonucleico, do inglês <i>Deoxyribonucleic Acid</i>
<i>DOCK9</i>	<i>Dedicator of cytokinesis 9</i>
EROs	Espécies reativas de oxigênio
FCM	Faculdade de Ciências Médicas
<i>FNDC3B</i>	<i>Fibronectin type III domain containing 3B</i>
<i>FOXO1</i>	<i>Forkhead box O1</i>
<i>GALNT14</i>	<i>Polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase 14</i>
<i>GWAS</i>	Estudos de associação genômica ampla, do inglês <i>Genome-Wide Association Studies</i>
HC	Hospital das Clínicas
<i>HGF</i>	<i>Hepatocyte growth factor</i>
<i>IL1A</i>	<i>Interleukin 1 alpha</i>
<i>IL1B</i>	<i>Interleukin 1 beta</i>
<i>IL1RN</i>	<i>Interleukin 1 receptor antagonist</i>
KC	Ceratocone, do inglês <i>Keratoconus</i>

LaCTAD	Laboratório Central de Tecnologias de Alto Desempenho em Ciências da Vida
<i>LOX</i>	<i>Lisil oxidase</i>
<i>MAP3K1</i>	<i>Mitogen-activated protein kinase kinase kinase 1</i>
<i>MIR184</i>	<i>microRNA 184</i>
<i>MPDZ-NF1B</i>	<i>Multiple PDZ domain protein-nuclear factor I B</i>
<i>NGS</i>	Sequenciamento de nova geração, do inglês <i>New Generation Sequencing</i>
PB	Pares de base
<i>PIEZO1</i>	<i>Piezo-type mechanosensitive ion channel component 1</i>
<i>RAB3GAP1</i>	<i>RAB3 GTPase activating protein catalytic subunit 1</i>
<i>SNPs</i>	Polimorfismos de nucleotídeo único, do inglês <i>Single Nucleotide Polymorphisms</i>
<i>SNVs</i>	Variantes de nucleotídeo único, do inglês <i>Single Nucleotide Variants</i>
<i>SOD1</i>	<i>Superóxido dismutase 1</i>
SUS	Sistema único de saúde
<i>TGFBI</i>	<i>Transforming growth factor beta induced</i>
<i>TIMP3</i>	<i>Tissue inhibitor of metalloproteinases 3</i>
TM	Temperatura de <i>Melting</i>
UFMG	Universidade Federal de Minas Gerais
UNIFACISA	Centro Universitário Facisa
<i>VSX1</i>	<i>Visual system homeobox 1</i>
<i>VUS</i>	Variante de significado incerto, do inglês <i>Variant of Uncertain Significance</i>
<i>ZNF469</i>	<i>Zinc finger protein 469</i>
<i>ZSCAN10</i>	<i>Zinc finger and SCAN domain containing 10</i>

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	13
1.1 POPULAÇÃO ESTUDADA.....	13
1.2 FATORES DE RISCO.....	14
1.3 SEQUENCIAMENTO DE EXOMA E O CERATOCONE.....	14
1.4 BIOINFORMÁTICA.....	15
1.5 ASPECTOS GENÉTICOS.....	15
1.6. ASPECTOS DO GENE <i>ZSCAN10</i>	16
1.7 ASPECTOS DO GENE <i>PIEZO1</i>	17
2 JUSTIFICATIVA.....	17
3 OBJETIVOS.....	18
3.1 GERAL.....	18
3.2 ESPECÍFICOS.....	18
4 CASUÍSTICA E MÉTODOS.....	19
4.1 CASUÍSTICA.....	19
4.1.2 CRITÉRIOS DE INCLUSÃO E EXCLUSÃO	19
4.1.3 ASPECTOS ÉTICOS.....	19
4.2 MÉTODOS.....	20
4.2.1 EXTRAÇÃO DE DNA E PREPARAÇÃO DAS BIBLIOTECAS PARA O ESTUDO DE EXOMAS.....	20
4.2.2 MÉTODO DE SEQUENCIAMENTO DE EXOMAS.....	20
4.2.3 ANÁLISE BIOINFORMÁTICA.....	20
4.2.4 ANÁLISE DOS RESULTADOS OBTIDOS NO SEQUENCIAMENTO DE EXOMAS.....	21
4.2.5 CLASSIFICAÇÃO DE VARIANTES USANDO <i>ACMG</i> e <i>Franklin</i>	21
4.2.6 VALIDAÇÃO DOS ACHADOS NO ESTUDO DE EXOMA.....	22
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	23
5.1 ENRIQUECIMENTO FUNCIONAL DO GENE <i>PIEZO1</i>	25
5.2 ENRIQUECIMENTO FUNCIONAL DO GENE <i>ZSCAN10</i>	26
5.3 PADRONIZAÇÃO DA PCR.....	26
5.4 DISCUSSÃO.....	27
6 CONCLUSÕES.....	27

REFERÊNCIAS.....	28
-------------------------	-----------

1. INTRODUÇÃO

O ceratocone (KC, do inglês *Keratoconus*) é uma patologia ectásica da córnea, de caráter bilateral, progressivo e inflamatório, oriunda do afinamento estromal e protrusão da córnea^{1,2,3} (**Figura 1**). Também, é marcado por alterações estruturais e funcionais que resultam na diminuição da acuidade visual do portador, por conta de um astigmatismo irregular^{4,5}. O surgimento da doença é assintomático, e envolve fatores genéticos, sistêmicos e ambientais. A menos que o portador seja submetido a exames da superfície corneanas, o paciente será diagnosticado apenas quando apresentar sintomas mais severos, como as estrias de *Vogt*, o sinal de *Munson*, além de cicatrizes na camada de *Bowman*⁶. Neste sentido, a afecção se inicia na adolescência e pode evoluir até a quarta década de vida do paciente^{1,2}.

O KC é categorizado mediante um prolapso coniforme na superfície anterior ou posterior da córnea. Porém, o segundo caso é considerado raro e de diminuta repercussão clínica, sendo o foco deste estudo o KC anterior⁶. Essa deformação cônica é influenciada por proteinases que contribuem para a perda da homeostase do organismo e desequilibram a ação oxidante e antioxidante no interior da córnea, promovendo estresse oxidativo e apoptose⁷.

Em relação à epidemiologia, o KC afeta todos os grupos étnicos, com prevalência similar entre homens e mulheres, e com uma prevalência mundial de 0,05% a 0,23%⁸. É importante ressaltar que no Brasil há a maior diversidade genética do mundo, resultado de intensos fluxos migratórios, conferindo uma composição singular ao país e um modelo populacional valioso para investigações genéticas e fenotípicas relacionadas ao KC⁹. Além disso, estudos genéticos realizados em diferentes populações têm potencial para gerar impactos positivos na saúde pública, favorecendo diagnósticos mais assertivos e a detecção precoce de doenças^{4,9}.

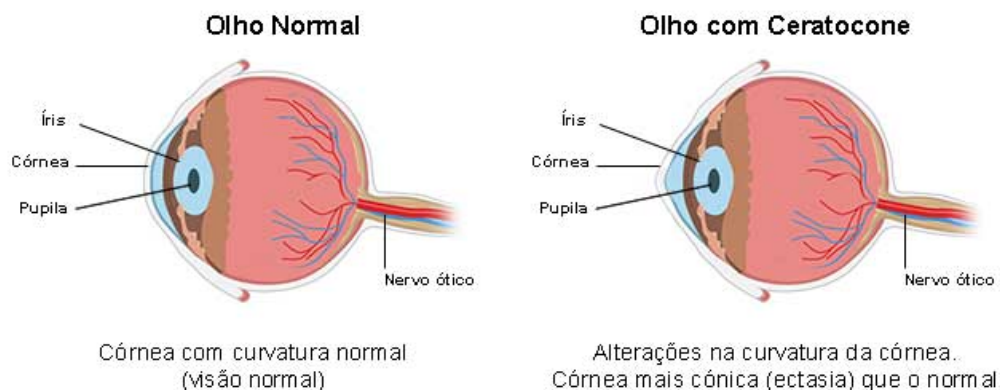


Figura 1 - Progressão do Ceratocone (Pereira, M.M.. Ceratocone. Saúde Bem Estar. Disponível em: <https://saudebemestar.pt/pt/clinica/ofthalmologia/ceratocone>)

1.1. População estudada

A população brasileira é reconhecida por sua notável heterogeneidade genética, resultante de um intenso processo de miscigenação entre ancestrais ameríndios, europeus e africanos, ao longo de diferentes períodos históricos. Essa diversidade reflete um complexo mosaico genético que influencia tanto a evolução populacional quanto a suscetibilidade a diferentes condições de saúde¹⁰. No entanto, apesar dessa singularidade, ainda há uma

escassez de estudos genéticos abrangentes no Brasil, especialmente aqueles que consideram a composição ancestral como variável determinante¹¹. Uma revisão sistemática sobre a ancestralidade genética da população brasileira reforça essa lacuna, apontando que a maioria das investigações disponíveis se concentra em amostras regionais ou de pequeno porte, o que limita a compreensão das variações genômicas em nível nacional. Essa sub-representação evidencia a necessidade de expandir estudos genéticos em populações miscigenadas, de modo a promover uma medicina de precisão mais inclusiva e representativa da diversidade brasileira⁹.

1.2. Fatores de risco

Fatores de risco são de extrema importância para estimar o grau de risco e progressão de uma afecção, baseando-se em características individuais de portadores que se replicam em uma população¹². Para o KC isto também é válido, sendo descritos na literatura parâmetros oculares, sistêmicos, familiares, genéticos, ambientais, bem como demográficos^{2,8}. Deste modo, um importante fator de risco ambiental é o prurido, guiando a ação mecânica de friccionar ou pressionar os olhos, além do uso de lentes de contato gelatinosa, que, por sua vez, viabilizam possíveis traumas na superfície corneana gerando alterações biomecânicas^{1,6,13}.

Em relação aos fatores sistêmicos, a literatura indica que indivíduos portadores de prolapso da válvula mitral, síndrome da pálpebra frouxa, alergias, atopias e apnéia do sono do tipo obstrutiva apresentam uma predisposição de maior escala para o desenvolvimento de KC¹³. Além disso, acredita-se que o Diabetes Mellitus promova proteção contra essa patologia¹³. Geneticamente, o KC é uma afecção de caráter poligênico, significando que variantes conjuntas em mais um gene ao mesmo tempo são responsáveis pela expressão do fenótipo patológico da doença¹⁴.

Com uma complexa relação entre a expressão das variantes de risco, modulação pelo ambiente e condições sistêmicas, torna-se difícil o diagnóstico dessa doença devido ao desenvolvimento assintomático e sua semelhança com um astigmatismo regular¹⁵. Devido a isto, foram realizados estudos de base genética com o intuito de melhor compreender esses fatores, porém a maioria compreende populações europeias e asiáticas¹⁶. Portanto, populações altamente miscigenadas, como a brasileira, ainda permanecem pouco exploradas, evidenciando a necessidade de aprofundar a elucidação dos fatores genéticos associados ao KC nesse contexto populacional.

1.3. Sequenciamento de Exoma e o Ceratocone

Estudos ômicos, como o sequenciamento de exomas, têm se consolidado como ferramentas essenciais para elucidar aspectos genéticos de doenças em distintas populações do mundo⁴. Dessa maneira, seus achados têm explorado biomarcadores que facilitam o manejo clínico e tratamento de pacientes com KC, contribuindo com uma medicina de precisão conforme os traços apresentados em cada portador⁴. Por sua vez, esta é uma técnica tradicionalmente utilizada para sequenciar, de forma abrangente, todo o exoma de um indivíduo, que é o conjunto de regiões codificadoras que permitem a tradução de proteínas^{17,18}. Nesse sentido, o sequenciamento de exoma tem como principal papel a identificação de aspectos genéticos moduladores de doença, que podem auxiliar no

diagnóstico precoce, assim como no aconselhamento genético^{18,19,20,21}. Além disso, esse método já foi aplicado em estudos envolvendo famílias com membros afetados por KC, bem como em casos esporádicos^{20,22}. Contudo, populações altamente miscigenadas, como a brasileira, permanecem sub-representadas nesse tipo de investigação, o que limita a generalização dos achados genéticos disponíveis, pois possuem um viés europeu¹⁶.

1.4. Bioinformática

Estudos utilizando sequenciamento de nova geração (NGS) promoveram, ao longo das últimas décadas, um notável avanço em diversas áreas da biologia, incluindo as ciências médicas⁴. Nesse sentido, a compreensão da relação entre variantes genéticas e complexos processos biológicos atuantes em doenças multifatoriais permitiu que diagnósticos fossem mais precisos e precoces e que os métodos de prevenção e tratamento fossem mais eficientes¹⁸. Por sua vez, o sequenciamento genético é massivo, tornando inviável sua interpretação sem o auxílio de ferramentas automatizadas. A percepção da necessidade de implementar uma tecnologia computacional que contorna tais obstáculos levou à união entre as grandes áreas de biologia e informática, criando uma nova área de atuação científica, a bioinformática²³.

A bioinformática tem permitido desenvolver ferramentas que comparam sequências de DNA, resultando em um avanço na identificação de genes e na determinação de suas funções. A sequência analisada, por sua vez, é comparada com um genoma de referência e as variantes são analisadas a partir de um banco de dados genéticos já conhecidos. Outra estratégia é, após o alinhamento das sequências com um genoma de referência e análise por meio de um controle de qualidade, buscar genes candidatos já conhecidos nos portadores e ausentes nos controles²⁴. E, em um cenário em que não são encontradas variantes previamente relatadas, investigam-se *SNVs* que segregam nos portadores e atuam em vias biológicas relacionadas à patogênese da doença. Sendo assim, com as ferramentas computacionais, a investigação genômica científica se baseia em observar os dados, compará-los e criar uma hipótese, as quais são confirmadas ou refutadas através de experimentos *in vitro* e algoritmos bioinformáticos²⁴.

Desta forma, ao trabalhar com essas ferramentas, torna-se mais rápido e eficaz o estudo genético do KC, principalmente em populações de densa miscigenação como a brasileira. Com todos esses fatos, conclui-se que os fatores de risco e proteção associados à doença ainda não foram totalmente estabelecidos pela ciência, sendo essencial promover estudos para preencher lacunas existentes no entendimento do KC.

1.5. Aspectos genéticos

Em relação a sua herdabilidade, a maioria dos casos desta patologia oftalmológica segue o padrão autossômico dominante^{13,16}. Foi reportado que parentes de primeiro grau possuem um risco maior de apresentarem KC em comparação com a população geral. Ademais, estudos com gêmeos monozigóticos indicam similaridade nos fenótipos do KC, evidenciando que os componentes genéticos possuem um papel de destaque nessa patologia^{16,25,26}.

O processo etiológico dessa patologia é resultado da ação de genes de maior efeito (herança monogênica), assim como da participação de genes de menor efeito (herança poligênica), como é o caso de múltiplas variantes de nucleotídeo único (*SNVs*) que

combinadas levam ao desenvolvimento do fenótipo. Em geral, sua base genética é investigada através da avaliação de famílias afetadas (estudos de ligação e sequenciamento de exoma) para analisar os genes de maior efeito ou de estudos de associação genômica ampla (do inglês *Genome-Wide Association Studies - GWAS*), o qual se baseia na análise de casos e controles em uma população para a identificação de *SNVs*^{16,27,28}.

Até o momento, todos os estudos realizados já mapearam mais de 17 *loci* gênicos associados à fisiopatologia do KC¹⁶. Em cenário brasileiro, o Centro Universitário Facisa (UNIFACISA) em conjunto com a Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG) analisou uma amostra da população brasileira de 26 pacientes com KC avançado, buscando identificar alterações nos genes candidatos *Lisil oxidase (LOX)* e *superóxido dismutase 1 (SOD1)*. Através do sequenciamento direto os autores constataram alterações no gene *LOX* em seis portadores e no gene *SOD1* em três portadores (em cada gene, uma alteração foi considerada associada à doença)²⁸. Somando-se a isso, a UNIFACISA realizou um estudo para identificar alterações no gene *visual system homeobox 1 (VSX1)* em uma amostra de 73 brasileiros portadores dessa doença. Este estudo, através do sequenciamento da região codificadora do gene, evidenciou 49 portadores de variantes, sendo 3 alterações consideradas provavelmente patogênicas²⁷. Desta forma, é essencial que investigações como essas sejam realizadas no Brasil para melhor entendimento dos genes envolvidos no KC em sua população.

1.6. Aspectos do gene *ZSCAN10*

O gene *Zinc finger and SCAN domain containing 10 (ZSCAN10)*, em humanos está localizado no cromossomo 16, na região 16p13.3, e codifica um fator de transcrição que contém domínios do tipo *zinc finger* e um domínio *SCAN*, o que sugere sua função na regulação da expressão gênica por meio da ligação ao DNA, atuando principalmente no núcleo celular²⁹.

Funcionalmente, o *ZSCAN10* atua como um fator de transcrição que pode ativar ou reprimir a expressão de genes-alvo dependendo do contexto celular, influenciando processos como manutenção da estabilidade genômica e resposta ao dano do *DNA* em células pluripotentes³⁰. Estudos em modelos de células-tronco mostraram que a expressão desse gene pode normalizar a homeostase de espécies reativas de oxigênio (EROs) e melhorar a resposta ao dano genético, indicando um papel na regulação de caminhos celulares fundamentais³⁰.

No entanto, dados sobre a expressão específica do *ZSCAN10* em tecidos oculares humanos permanecem limitados na literatura científica tradicional, e ele não é tipicamente listado entre genes com expressão alta no tecido ocular em bancos de dados amplamente usados, como o GTEx (<https://gtexportal.org/home/>). Apesar disso, evidências de expressão durante o desenvolvimento embrionário em modelos animais, incluindo expressão pontilhada detectada em tecidos do olho em embriões de camundongo, sugerem que o *ZSCAN10* pode estar ativo em fases de desenvolvimento ocular, possivelmente influenciando populações progenitoras de células sensoriais ou neurais relacionadas à retina³¹.

Dessa forma, estudos futuros direcionados à análise temporal e espacial da expressão do *ZSCAN10* em tecidos oculares humanos e modelos experimentais poderão contribuir para esclarecer sua possível participação no desenvolvimento e na manutenção da homeostase celular do sistema visual.

1.7. Aspectos do gene *PIEZO1*

O gene *Piezo-type mechanosensitive ion channel component 1 (PIEZO1)* codifica um canal iônico mecanossensível essencial para a conversão de estímulos mecânicos em sinais bioquímicos, processo conhecido como mecanotransdução³². Em humanos, este gene está localizado no cromossomo 16, na região citogenética 16p24.3, sendo transcrito a partir da fita positiva do DNA³³. Ademais, origina uma proteína de grande porte que forma um canal de cátions não seletivo, altamente permeável ao cálcio, cuja ativação ocorre em resposta a forças físicas como estiramento da membrana celular, pressão e deformações mecânicas³².

No contexto ocular, o *PIEZO1* apresenta ampla expressão em diferentes tecidos do olho, evidenciando a relevância da mecanossensibilidade para a fisiologia ocular. Estudos demonstram sua presença em estruturas submetidas a constantes forças mecânicas, como a córnea, a retina, o corpo ciliar e a malha trabecular, regiões diretamente envolvidas na regulação da pressão intraocular, na manutenção da forma do globo ocular e na adaptação do olho a estímulos mecânicos internos e externos³⁴. Além disso, a ativação do canal *PIEZO1* nesses tecidos permite a entrada de cálcio, desencadeando cascatas de sinalização intracelular que regulam processos como proliferação celular, remodelamento tecidual e respostas inflamatórias³⁴.

Análises comparativas da expressão dos canais mecanossensíveis *PIEZO1* e *PIEZO2* em tecidos oculares revelaram que o *PIEZO1* apresenta distribuição distinta e específica em diferentes regiões do olho, sugerindo funções especializadas relacionadas à detecção e adaptação a forças mecânicas³⁵. Esses achados reforçam a ideia de que esse gene exerce papel central na mecanotransdução ocular, especialmente em tecidos estruturais e funcionais sujeitos a estresse mecânico contínuo.

Em relação à superfície ocular, evidências indicam que canais mecanossensíveis, incluindo o *PIEZO1*, participam das respostas celulares ao estresse mecânico no epitélio ocular. Na córnea, esse mecanismo é particularmente relevante, uma vez que o tecido é constantemente exposto a forças externas, como o piscar, o contato com lentes de contato gelatinosas e estímulos ambientais. A ativação do *PIEZO1* em células epiteliais pode modular vias de sinalização associadas à inflamação e ao reparo tecidual, contribuindo para a manutenção da integridade da superfície ocular³⁴.

Em modelos experimentais de miopia, observou-se aumento da expressão de *PIEZO1* na retina em resposta ao alongamento axial do olho, indicando que esse canal atua como mediador da transmissão mecanobiológica relacionada ao estresse mecânico ocular. A modulação da atividade do *PIEZO1* influenciou a progressão da miopia e os níveis de estresse oxidativo na retina, sugerindo sua participação nos mecanismos moleculares envolvidos no desenvolvimento dessa condição³⁶.

Dessa forma, o gene *PIEZO1* destaca-se como um importante regulador da resposta mecânica no olho. Suas características estruturais e funcionais permitem a integração de estímulos físicos com respostas celulares, desempenhando papel fundamental tanto na homeostase ocular quanto no desenvolvimento de alterações patológicas que afetam a retina, a córnea e outras estruturas oculares.

2. JUSTIFICATIVA

Atualmente o KC corresponde à segunda maior causa de demanda por transplante de

órgãos, no caso de córnea, no Sistema Único de Saúde (SUS)²³. Devido ao seu início e evolução assintomáticos, inúmeros casos são diagnosticados tardiamente e com isso, o paciente se encontra com a acuidade visual severamente comprometida. Dessa forma, para reverter esta situação, é necessário realizar o transplante de córnea. Entretanto, por mais que na literatura a ceratoplastia tenha sido considerada eficaz, esse procedimento cirúrgico ainda não é indicado como primeira opção, sendo este tratamento indicado para um seletivo grupo de pacientes, pois há a chance de rejeição do órgão e exigência de retransplante³⁷. Assim, compreender as bases genéticas desta doença multifatorial, a qual apresenta padrão de herança complexo, é fundamental na compreensão de sua patogênese, possibilitando o desenvolvimento de estratégias mais eficazes para o diagnóstico precoce e a mitigação de danos, além de tornar a medicina de precisão mais eficiente. Vale destacar também que a coorte brasileira é descrita como a mais heterogênea, sendo resultado direto de diversos eventos migratórios com a predominância de três principais ancestralidades (ameríndia, europeia e africana), compondo majoritariamente o perfil genético brasileiro atual⁹. Tais características formam um relevante modelo genotípico e fenotípico para estudos sobre o KC. Ademais, o estudo genômico de uma população oferece melhor resultado na qualidade de vida, já que promove a detecção precoce de uma doença e diagnósticos precisos⁴. No cenário brasileiro, há desafios como a extensão significativa do país e o histórico de miscigenação. Porém, a diversidade genética da nossa população amplia o potencial para a identificação de variantes no DNA específicas de nossa população que possam ser relacionadas ao KC. Nesse contexto, a escassez de estudos que investiguem os mecanismos genéticos associados à essa patologia representa um desafio para a implementação de estratégias para a sua prevenção. Os achados obtidos por meio da realização deste estudo genômico em uma família do sudeste do Brasil podem representar uma expansão do conhecimento sobre o perfil genético desta doença na população brasileira.

3. OBJETIVOS

3.1. Geral

O presente estudo visa desenvolver uma maior compreensão acerca das bases genéticas envolvidas na etiologia do KC no Brasil por meio de investigação de exomas em membros de uma família selecionada, buscando possíveis genes candidatos.

3.2. Específicos

- Realizar a filtragem das bibliotecas de exoma e efetuar o alinhamento das leituras ao genoma de referência;
- Identificar variantes em genes previamente associados ao KC e avaliar sua segregação entre os indivíduos afetados da família;
- Na ausência de variantes relevantes em genes já descritos, investigar novos genes e variantes potenciais que possam estar envolvidos em mecanismos fisiopatológicos do

KC, avaliando sua segregação entre os indivíduos;

- Validar as variantes de interesse por meio do sequenciamento de Sanger.

4. CASUÍSTICA E MÉTODOS

4.1. Casuística

Foi avaliada uma família com diagnóstico de KC (**Figura 1**), que já se encontra em acompanhamento no Ambulatório de Ceratocone do Hospital de Clínicas da Unicamp. A família é composta por 4 indivíduos afetados e 11 não afetados.

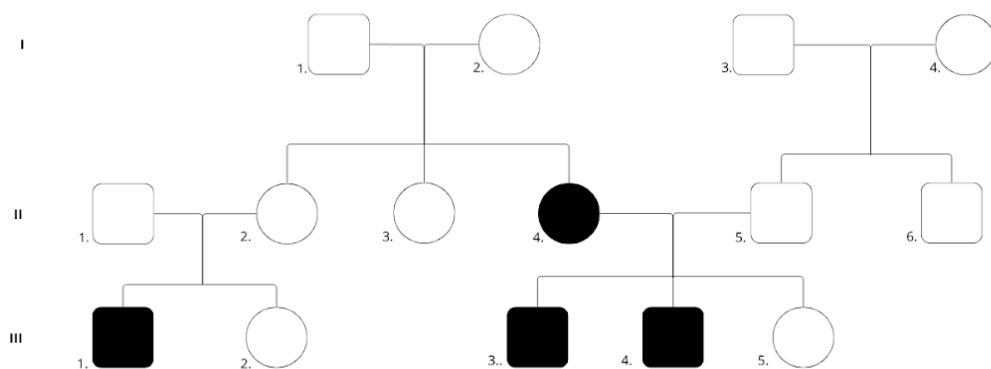


Figura 2 - Heredograma completo da família estudada. Para o sequenciamento de exoma, foram escolhidos os indivíduos II - 2, II - 4, II - 5 e III - 4.

4.1.2. Critérios de inclusão e exclusão

Foram incluídos no presente estudo os pacientes com diagnóstico de KC pertencentes a uma família em acompanhamento no Ambulatório de Ceratocone do HC/UNICAMP, bem como seus familiares por consanguinidade até segundo grau e os controles (indivíduos da mesma família não portadores de KC). Foram excluídos do presente estudo aqueles indivíduos que estiveram em uso de medicações anti-inflamatórias, imunossupressoras ou imunomoduladoras, tópicas ou sistêmicas, bem como aqueles com quadro ocular inflamatório ou infeccioso em atividade no momento da coleta de dados.

4.1.3. Aspectos Éticos

Todos os procedimentos deste projeto seguiram as orientações da Declaração de Helsinque, a resolução 466/12 do Conselho Nacional de Saúde (196/96 revogada), assim

como as determinações do Comitê de Ética em Pesquisa da FCM – UNICAMP. Este projeto foi aprovado sob número CAAE 49120615.4.0000.5404.

4.2. Métodos

4.2.1. Extração de DNA e preparação das bibliotecas para o estudo de exomas

Foram coletados 8 mililitros de sangue periférico em frasco estéril *VACUETTE*®, o qual contém *EDTA* 10% como anticoagulante. Para a extração de *DNA* foi utilizado o *QIAamp DNA Blood kit* (Qiagen, Hamburgo, Alemanha), seguindo as instruções do fabricante. Para o preparo das bibliotecas foi empregado o kit *Nextera*® *Rapid Enrichment* (*Illumina, Inc., San Diego, CA, USA*), seguindo as instruções do fabricante. Por fim, a corrida tipo *paired-end* foi realizada no aparelho *Illumina Hi-Seq 2500* (*Illumina, Inc., San Diego, CA, USA*) no Laboratório Central de Tecnologias de Alto Desempenho em Ciências da Vida, LaCTAD.

4.2.2. Método de sequenciamento de exomas

Foi realizado o sequenciamento de exomas em dois indivíduos afetados (II - 2 e II - 5) e dois indivíduos não afetados (II - 4 e III - 4) da família. Esta técnica se desenvolve em duas etapas. Na primeira prepara-se o *DNA* genômico e a hibridização para a captura de *arrays* e na segunda sequenciam-se os fragmentos eluídos. Suas principais vantagens são o baixo custo, quando em comparação com o sequenciamento completo do genoma e a capacidade de se realizar o sequenciamento de múltiplos genes de maneira simultânea. Além dos benefícios previamente destacados, o sequenciamento de exomas possibilita o mapeamento preciso de um amplo conjunto de pacientes, sendo um aspecto fundamental na identificação de variantes em pesquisas de genética humana.

4.2.3. Análise Bioinformática

Após o recebimento dos arquivos *fastq*, foi utilizada a ferramenta *Babraham* para a realização do controle de qualidade (<https://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>). Para alinhar as reads foi utilizado o *BWA-MEM* (<http://bio-bwa.sourceforge.net/>, v.0.7.12) e, como genoma de referência, a montagem *hg38*. Para o processamento pós-alinhamento, foram utilizadas as ferramentas *GATK* (<https://software.broadinstitute.org/gatk/>) e *Picard* (<https://broadinstitute.github.io/picard/>). Posteriormente, a ferramenta *GATK* foi utilizada para detectar os *SNPs/indels* e, com a ferramenta *wANNOVAR* (<http://wannovar.wglab.org/>), foi

conduzida a anotação funcional. E para a visualização das sequências, foi utilizada a ferramenta *IGV* (<http://software.broadinstitute.org/software/igv/>).

4.2.4. Análise dos resultados obtidos no sequenciamento de exomas

Posteriormente, a filtragem das variantes de interesse foi realizada por meio do software *Rstudio* (v.4.1.2), seguindo a descrição abaixo:

- o Seleção de variantes que segregam somente nos indivíduos afetados;
- o Inclusão de variantes com cobertura de *reads* ($DP \geq 20$); seguindo as recomendações do GATK (<https://sl1nk.com/HNcsx>);
- o Exclusão de variantes sinônimas (controle de qualidade), mudança de sentido, sítios aceitadores e doadores de *splice*, inserção e deleção;
- o Inclusão de variantes com frequência alélica e frequência alélica máxima $\leq 0,05$, na base de dados ExAC;
- o Exclusão de variantes consideradas toleradas ou benignas pelos preditores SIFT e/ou PolyPhen-2;
- o Exclusão de variantes com valores de PhyloP < 1 ;
- o Exclusão de variantes com Phred-score < 40 ;
- o Inclusão de variantes presentes somente nos afetados;
- o Exclusão de variantes homozigotas.
- o Filtragem para genes candidatos*.

*Os genes candidatos, utilizados para a filtragem de variantes, foram: *MIR184*, *LOX*, *DOCK9*, *GALNT14*, *VSY1*, *SOD1*, *FOX01*, *FNDC3B*, *COL5A1*, *TGFBI*, *ZNF469*, *TIMP3*, *HGF*, *COL4A4*, *IL1B*, *IL1A*, *IL1RN*, *COL4A3*, *MPDZ-NF1B*, *RAB3GAPI*^{13,14,15}. Esses genes foram selecionados baseando-se em estudos anteriores com KC, realizados por meio de GWAS e análise de exoma.

4.2.5. Classificação de variantes usando *ACMG* e *Franklin* e posterior enriquecimento funcional

Após a execução do *pipeline*, foi realizada a classificação das variantes filtradas através do *Franklin* (<https://franklin.genoox.com/clinical-db/home>), uma plataforma de consulta e interpretação de variantes, seguindo os critérios estabelecidos pelo Colégio Americano de Genética Médica e Genômica (*ACMG*, do inglês *American College of Medical Genetics*)³⁸. Esses critérios consideram características relevantes como dados populacionais (frequência alélica), análises preditivas *in silico*, testes funcionais, segregação e informação alélica (em trans e em cis). Com base nessa avaliação, as variantes poderiam ser categorizadas como benigna, provavelmente benigna, variante de significado incerto (*VUS*, do inglês

Variant of Uncertain Significance), provavelmente patogênica e patogênica. Para a análise de enriquecimento funcional, utilizou-se a plataforma *EnrichR* (<https://maayanlab.cloud/Enrichr/>), uma ferramenta amplamente empregada para a interpretação de dados genômicos. Por sua vez, esta integra diversas bases públicas e aplica métodos estatísticos para avaliar o enriquecimento de processos biológicos, vias de sinalização e funções moleculares associadas ao conjunto de genes analisados.

4.2.6 Validação dos achados no estudo de exoma

Utilizando-se a Reação em Cadeia da Polimerase (*PCR*) convencional, foram amplificadas as regiões genômicas de interesse. As reações foram preparadas com a utilização de 50 ng de *DNA*, 10 pmol de cada dideoxinucleotídeo (dNTP), 20 pmol de cada *primer*, $MgCl_2$ 50 mM, tampão da enzima 1x (Tampão 10X: Tris-HCL 200 mM, pH 8.4, KCL 50 mM) e 0.5 U de Taq *DNA* polimerase (*Invitrogen™ Life Technologies, Carlsbad, CA, USA*) (**Tabela 1**). Para completar o volume final de 25 μ l, foi utilizada H_2O MiliQ.

As condições de amplificação foram uniformes para todas as regiões, exceto pela temperatura de anelamento, conforme descrito a seguir: inicialmente, uma etapa de desnaturação a 95°C por 5 minutos, seguida por 35 ciclos de desnaturação a 94°C por 1 minuto, com temperatura de anelamento de 57°C por 1 minuto, e extensão a 72°C por 40 segundos. O processo foi finalizado com uma extensão final a 72°C por 7 minutos. Todos os primers (**Tabela 2**) foram desenhados com a utilização da ferramenta online *Primer3* (<https://www.bioinformatics.nl/cgi-bin/primer3plus/primer3plus.cgi>), com base nos transcritos *ENST00000575108* e *ENST00000301015* e as sequências correspondentes verificadas no *Ensembl*. Os fragmentos amplificados foram submetidos ao sequenciamento direto seguindo a metodologia de Sanger et al. (1977), utilizando o *BigDye Terminator Cycle Sequencing Kit v3.1®* (*Applied Biosystems Inc., Foster City, CA, EUA*), seguido de eletroforese capilar em aparelho *ABI 3130XL* (*Applied Biosystems, Foster City, CA*). A presença ou ausência de variantes foi confirmada através do software *FinchTV* (*Geospiza, Seattle, WA*).

A validação por Sanger foi realizada nos membros da família estudada e, confirmadas as variantes de interesse, os genes em questão serão sequenciados em uma coorte de casos e controles subsequentemente a essa pesquisa.

Tabela 1 – Protocolos da reação em cadeia da polimerase para a amplificação dos genes PIEZO1 e ZSCAN10.

Reagente	1 amostra (µL)
H ₂ O	16,95
Tampão (10x)	2,5
MgCl ₂	1,2
PRIMER F	0,7
PRIMER R	0,7
dNTP	1,75
TAQ POL	0,2
DNA	1

Legenda: µL = microlitro; Tampão = solução tampão 10x; MgCl₂ = cloreto de magnésio; DNTPs = desoxirribonucleotídeos trifosfatados; Taq Pol = DNA polimerase termoestável. Ambas as reações foram realizadas em 35 ciclos e com temperatura de anelamento de 57°C. Concentração final do *primer* = 20 pM.

Tabela 2 – Sequências de primers para a amplificação das regiões de interesse correspondentes aos genes PIEZO1 e ZSCAN10.

Gene/ id da variante	Sequências (5'-3')	Amplicon (pb)	Região alvo	TM (°C)	%GC
<i>PIEZO1</i> - rs201226914	F - AATGTCCTTGCCTCACCTCC R - TTCCCCAACAGCACCAACTT	411	Exon	F- 59.7 R - 60.5	F - 55% R - 50 %
<i>ZSCAN10</i> - rs185364182	F - AGGGGCCATTTTGGAGAAGG R - TCCGCAATAGCTCCAACCTG	541	Exon	F- 60 R - 60.1	F - 55% R - 55%

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Como o ceratocone apresenta, na maioria das famílias estudadas, um padrão de herança autossômica dominante, espera-se que indivíduos afetados carreguem a variante patogênica em heterozigose^{1,2}. Dessa maneira, esta análise excluiu variantes homozigóticas, identificando aquelas que segregam entre os indivíduos afetados e estão ausentes entre os não afetados. Como resultado, foram encontradas 574 variantes (**Figura 3**) em comum nos pacientes portadores dessa afecção, mas apenas 22 (**Tabela 3**) não estão presentes entre os não portadores. Entre as oito variantes *missense* encontradas, a *rs201226914* (*PIEZO1*) e a *rs185364182* (*ZSCAN10*) foram selecionadas (**Tabela 4**), considerando inicialmente os aspectos biológicos do KC, seguidos de predições *in silico*, além das diretrizes de classificação da ACMG, sendo ao fim realizado um enriquecimento funcional destes genes. Dentre os bancos de dados disponíveis na plataforma *EnrichR*, foram utilizados o *Reactome*

Pathways 2024, *ARCHS4 Kinases Coexp*, *Kinase Perturbations from GEOdown* e o *The Kinase Library 2024*, que reúnem informações consolidadas sobre vias biológicas e permitem a identificação de mecanismos celulares potencialmente envolvidos no contexto estudado. Essa abordagem possibilitou uma exploração mais abrangente das funções e interações relevantes para o fenótipo investigado.

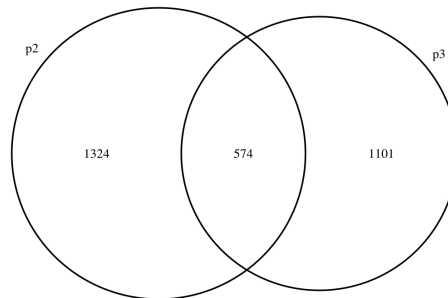


Figura 3 - Variantes em comum entre os pacientes II - 4 (p2) e III - 4 (p3).

SYMBOL	EXISTING VARIATION	CONSEQUENCE
PRAMEF18	rs1314428920	missense
HEATR5B	rs181354728	synonymous
CCDC127	rs73730755&COSV57256194	synonymous
EYS	rs776743787	synonymous
TRBV3-1	rs368999058	synonymous
IGHV3-21	rs782550187	synonymous
ZSCAN10	rs185364182	missense
NATD1	rs12449311	missense
CD300C	rs147686810	missense
FCGBP	rs746639255&COSV55426427	synonymous
LILRB1	rs1366459464	synonymous
NBPF1	rs61773582&COSV67426305	missense
ETAA1	rs114064178	synonymous
C6orf136	rs146616682&COSV53315984	synonymous
SNX13	rs199658532&COSV68068692	synonymous
TRBV3-1	rs748166721	synonymous
GOLGA6L1	rs2640328	missense
PIEZO1	rs201226914&CM159450&COSV56341312	missense
ANKRD40	rs3815378&COSV53322417&COSV53328577	synonymous
DAPK3	rs56251209&COSV56663945	synonymous
SIGLEC5	rs140633267	synonymous
PLA2G6	rs11570679&COSV59268180	synonymous

Tabela 3 - Variantes que segregam com o fenótipo (presentes nos afetados e ausentes nos não afetados)

Gene	<i>ZSCAN10</i>	<i>PIEZO1</i>
Transcrito	ENST00000575108	ENST00000301015
HGVSc	ENST00000575108.5:c.1063G>T	ENST00000301015.14:c.2815C>A
HGVSp	ENSP00000459520.1:p.Ala355Ser	ENSP00000301015.9:p.Leu939Met

Zigosidade	Heterozigose	Heterozigose
DP/AD	13/7,6	13/6,7
gnomADe_AMR_AF	0.004702	0.00077
CADD	17.97	20.7
SIFT	Deletéria	Deletéria, com baixa confiança
PolyPhen	Provavelmente prejudicial	Provavelmente prejudicial
ClinVar	–	Significância incerta
ACMG	Benigna	Benigna

Tabela 4 - Parâmetros dos genes selecionados

5.1. Enriquecimento funcional do gene *PIEZO1*

A partir desta investigação, 37 vias biológicas foram mapeadas, mas apenas 8 são relevantes para este estudo. O banco de dados *Reactome Pathways 2024* relacionou o *PIEZO1* com respostas celulares a estímulos em geral, principalmente mecânicos; e respostas endoteliais ao estresse de cisalhamento, ativando a sinalização de integrinas, moléculas previamente descritas na literatura como participantes da patogênese do KC. O *ARCHS4 Kinases Coexp* relacionou-o com o funcionamento de 10 quinases humanas, um grupo de enzimas responsáveis pela fosforilação, a qual ativa ou inativa moléculas-alvo, regulando diversos processos celulares. O *Kinase Perturbations from GEOdown* associou o *PIEZO1* com o *knockout* do gene *mitogen-activated protein kinase kinase kinase 1 (MAP3K1)*, fenômeno que afeta o desenvolvimento ocular e pode resultar no fenótipo de “olhos abertos ao nascer”. Por último, o *The Kinase Library 2024* relacionou-o com as espécies reativas de oxigênio (EROs), as quais, quando em desequilíbrio com as defesas antioxidantes, geram estresse oxidativo, já relacionado na literatura como significativo para o desenvolvimento do KC (Figura 4).

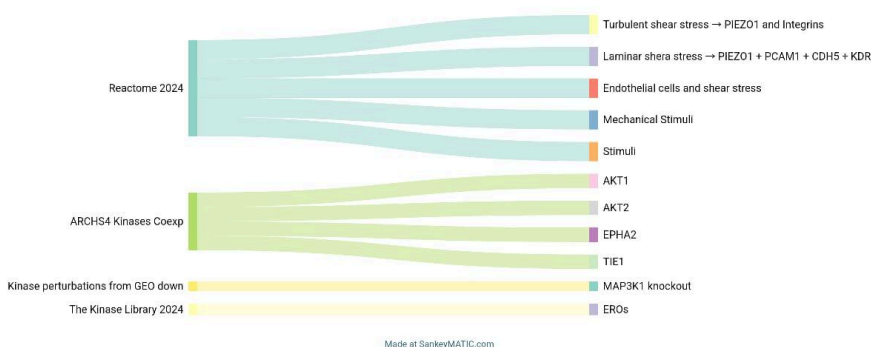


Figura 4 - Vias Biológicas identificadas por meio do enriquecimento funcional do gene *PIEZO1*.

5.2. Enriquecimento funcional do gene *ZSCAN10*

Como resultado, 27 vias biológicas foram mapeadas, apresentando alta relevância e participação das proteínas quinases e células-tronco. Os bancos de dados *ARCHS4 Kinases Coexp* e *The Kinase Library 2024* relacionou-o com o funcionamento de 13 quinases humanas, um grupo de enzimas responsáveis pela fosforilação, a qual ativa ou inativa moléculas-alvo, regulando diversos processos celulares. Por último, o *Kinase Perturbations from GEOdown* também associou o *ZSCAN10* com o *knockout* do gene *MAP3K1*. Ademais, o *knockdown* da quinase *AKT1* está associado ao aumento da apoptose e má resposta ao estresse oxidativo, redução da proliferação celular, prejuízo na diferenciação e angiogênese, além de alterações na resposta a estímulos mecânicos (**Figura 5**).

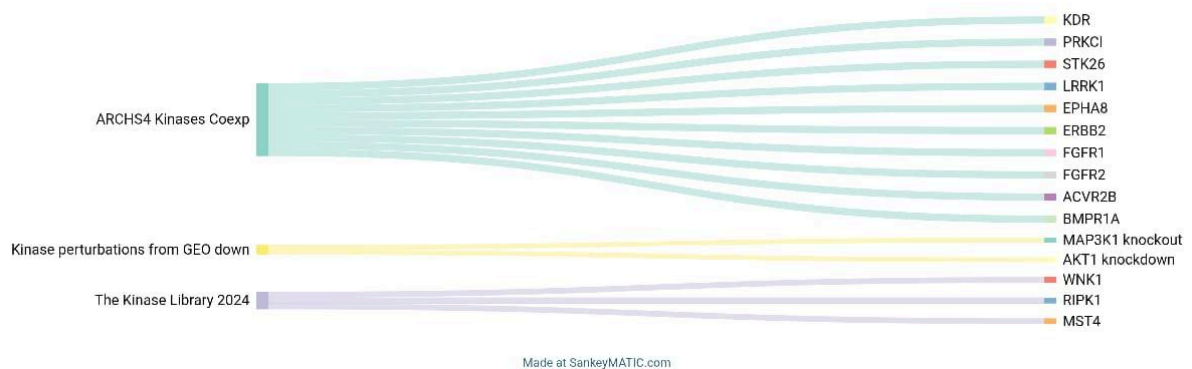


Figura 5 - Vias Biológicas identificadas por meio do enriquecimento funcional do ZSCAN10.

5.3. Padronização da PCR

Após essa análise, iniciou-se a etapa de padronização da *PCR*, a qual se estendeu além do previsto devido a problemas com os primers durante as reações de amplificação. Ao final, foi possível realizar a reação em cadeia da polimerase e obter o gel de eletroforese (**Figura 6**). O gene *ZSCAN10* apresentou uma banda inespecífica, motivo pelo qual o experimento será repetido. Já o *PIEZO1* apresentou resultados satisfatórios e será submetido ao sequenciamento de Sanger.

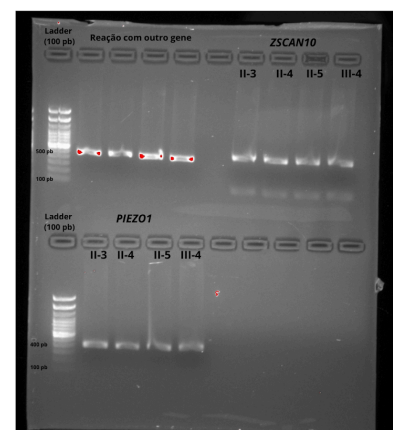


Figura 6 - Gel de eletroforese para os indivíduos II-3, II-4, II-5, III-4.

5.4. Discussão

Os resultados deste estudo sugerem que *PIEZO1* e *ZSCAN10* podem representar importantes fatores de risco para o desenvolvimento do KC, possivelmente contribuindo para vias biológicas já reconhecidas na fisiopatologia da doença, como mecanotransdução, estresse oxidativo, remodelamento da matriz extracelular e regulação do desenvolvimento do tecido corneano^{1,2}. No caso do *PIEZO1*, diversas evidências funcionais reforçam sua possível participação no KC. O gene é conhecido por codificar um canal mecanossensível, essencial para a detecção de forças físicas e para a resposta celular a estímulos mecânicos. Fenotipicamente, variantes em *PIEZO1* já foram associadas a hipermetropia e fissuras palpebrais inclinadas para cima, características frequentemente acompanhadas de anestesia corneana, sugerindo comprometimento da integridade sensorial e mecânica da córnea^{34,35,36}. Esses achados são relevantes, considerando que o KC envolve alterações na biomecânica corneana e possível perda da sensibilidade local. As análises de enriquecimento deste trabalho reforçam ainda mais essa relação. Por outro lado, o gene *ZSCAN10* também emerge como um potencial contribuinte para o risco de KC. Além de sua função como fator de transcrição envolvido na manutenção da pluripotência e no controle da expressão gênica em células-tronco, *ZSCAN10* já foi relacionado em doenças relacionadas à fragilidade tecidual, incluindo a osteogênese imperfeita, popularmente conhecida como ossos de vidro, que, por sua vez, já foi associada à córneas finas, fragilidade ocular, KC, glaucoma, ectopia lentis, descolamento de retina, estrias angioides e doença da superfície ocular³⁹. Essa relação sugere que alterações na regulação de proteínas estruturais, especialmente colágenos, podem predispor ao afinamento e à deformação corneana, características centrais do KC.

Em conjunto, as evidências sugerem que *PIEZO1* e *ZSCAN10* podem influenciar a fisiopatologia do KC por meio de mecanismos complementares: enquanto *PIEZO1* se associa principalmente à mecanotransdução e ao estresse oxidativo, *ZSCAN10* parece impactar processos de regulação gênica, manutenção celular e integridade tecidual. Ambos convergem para vias biológicas críticas para a estabilidade da córnea, e, portanto, podem representar fatores de risco relevantes e biologicamente plausíveis para o KC.

6. CONCLUSÕES

Ao interpretar a predição de risco em um contexto biológico e funcional, entende-se que esses genes apresentam funções compatíveis com mecanismos já descritos na literatura, o que reforça a plausibilidade biológica dos achados, ainda que não permita estabelecer relações

causais. Análises complementares, incluindo a validação das variantes por sequenciamento de Sanger, estão em andamento para verificar sua evidência. No entanto, algumas limitações devem ser consideradas, como o número reduzido de indivíduos avaliados, cobertura genômica heterogênea, possível penetrância incompleta ou variável e ausência de replicação em outras coortes, fatores que restringem interpretações mais conclusivas. Além disso, não se pode descartar a contribuição de outros fatores genéticos e ambientais para o fenótipo observado. Dessa forma, embora os resultados apresentados ofereçam indícios promissores, estudos adicionais com amostras maiores, replicação independente e testes funcionais serão necessários para esclarecer a contribuição efetiva de *PIEZO1* e *ZSCAN10* para o risco de desenvolvimento do KC.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Dua, H.S., Ting, D.S.J., Al-Aqaba, M., G Said, D.G. **Chapter 5 - Pathophysiology of Keratoconus**, Elsevier; Pages 51-64, 2023, ISBN 9780323759786.
2. RABINOWITZ, Yaron S. **Keratoconus**. Survey of Ophthalmology, Volume 42, Issue 4, p. 297-319, 1998, ISSN 0039-6257.
3. Schor, P. **Ceratocone**. *ARQ. BRAS. OFTAL.* 6 1 (2), ABRIL/ 1 998, P235-237.
4. Durán-Cristiano S.C, Bustamante-Arias A, Fernandez GJ, Martin-Gil A, Carracedo G. **Omics in Keratoconus: From Molecular to Clinical Practice**. *J Clin Med*. 2025;14(7):2459. Published 2025 Apr 3.
5. Mohammadpour M, Heidari Z, Hashemi H. **Updates on Managements for Keratoconus**. *J Curr Ophthalmol*. 2017 Dec 6;30(2):110-124.
6. Mas Tur, V., MacGregor, C., Jayaswal, R., O’Brart, D., Maycock, N. (2017). **A review of keratoconus: Diagnosis, pathophysiology, and genetics**. *Survey of Ophthalmology*, volume 62, issue 6, P770-783.
7. Passaro ML, Rinaldi M, Morgera V, et al. **The oxidative-stress-senescence axis in keratoconus: new insights into corneal degeneration**. *Front Mol Biosci*. 2025;12:1539542. Published 2025 Apr 24.
8. Souza, T. R. de, Gomes, G. C., Pereira Neto, J. P., Paula, G. de S., Rabelo, N. N. de F., & Reis, G. da C. (2023). **Uma Revisão Narrativa De Literatura Acerca do Ceratocone: Epidemiologia e Fatores de Risco**. *Revista Ibero-Americana De Humanidades, Ciências E Educação*, 9(7), 1412–1417.
9. Nunes K, Araújo Castro E Silva M, Rodrigues MR, et al. **Admixture's impact on Brazilian population evolution and health**. *Science*. 2025;388(6748):eadl3564.
10. Souza AM, Resende SS, Sousa TN, Brito CFA. **A systematic scoping review of the genetic ancestry of the Brazilian population**. *Genet Mol Biol*. 2019 Jul-Sep;42(3):495-508.
11. da Cruz PRS, Ananina G, Secolin R, et al. **Demographic history differences between Hispanics and Brazilians imprint haplotype features**. *G3 (Bethesda)*. 2022;12(7):jkac111.
12. Almusawi LA, Hamied FM. **Risk Factors for Development of Keratoconus: A Matched Pair Case-Control Study**. *Clin Ophthalmol*. 2021 Aug 16;15:3473-3479.
13. Gomes, J.A.P., Rodrigues, P.F., Lamazales, L.L. **Keratoconus epidemiology: A review**. *Saudi J Ophthalmol*. 2022 Jul 11;36(1):3-6.

14. Lee, S.S, et. al. **Polygenic Prediction of Keratoconus and its Measures: Cross-Sectional and Longitudinal Analyses in Community-Based Young Adults.** American Journal of Ophthalmology, Volume 265, 2024, Pages 248-256, ISSN 0002-9394.
15. Sinjab MM. **Keratoconus: A historical and prospective review.** Oman J Ophthalmol. 2023;16(3):401-414. Published 2023 Oct 18. doi:10.4103/ojo.ojo_70_23.
16. Abu-Amero, K.K., Al-Muammar, A.M., Kondkar, A.A. **Genetics of keratoconus: where do we stand?** J Ophthalmol. 2014;2014:641708.
17. Warr A, Robert C, Hume D, Archibaldd A, Deeb N, Watson M. **Exome Sequencing: Current and Future Perspectives.** G3 (Bethesda). 2015 Jul 2;5(8):1543-50
18. Bamshad, M.J., Ng, S.B., Bigham, A.W, Tabor, H.K., Emond, M.J., Nickerson, D.A.,Shendure, J. **Exome sequencing as a tool for Mendelian disease gene discovery.** Nat Rev Genet. 2011 Sep 27;12(11):745-55.
19. Gadelha, D.N.B., Feitosa, A.F.B., da Silva, R.G., Antunes, L.T., Muniz, M.C., de Oliveira, M.A., Andrade, D.O., da Paz Silva, N.M., Cronemberger, S., Schamber-Reis. B.L.F. **Screening for Novel LOX and SOD1 Variants in Keratoconus Patients from Brazil.** J Ophthalmic Vis Res. 2020 Apr 6;15(2):138-148.
20. Froukh, T., Hawwari, A. & Al Zubi, K. **Whole exome sequencing highlights variants in association with Keratoconus in Jordanian families.** BMC Med Genet, 2020 Sep 4, 21(1):177.
21. Magalhães, O.A., Kowalski, T. W., Wachholz, G. E., & Schuler-Faccini, L. **Whole-exome sequencing in familial keratoconus: the challenges of a genetically complex disorder.** Arquivos Brasileiros De Oftalmologia, 2019 Nov, 82(6), 453–459.
22. Ren S, Yang K, Fan Q, et al. **Bioinformatics analysis of key candidate genes and pathways in Chinese patients with keratoconus.** Exp Eye Res. 2023;231:109488. doi:10.1016/j.exer.2023.109488.
23. Bao, R., Huang, L., Andrade, J., et al. **Review of Current Methods, Applications, and Data Management for the Bioinformatics Analysis of Whole Exome Sequencing.** Cancer Informatics. 2014;13s2.
24. Dolled-Filhart MP, Lee M Jr, Ou-Yang CW, Haraksingh RR, Lin JC. **Computational and bioinformatics frameworks for next-generation whole exome and genome sequencing.** ScientificWorldJournal. 2013;2013:730210.
25. Santodomingo-Rubido, J., Carracedo, G., Suzaki, A., Villa-Collar, C., Vincent, S.J., Wolffsohn, J.S. **Keratoconus: An updated review.** Contact Lens and Anterior Eye, V.45, ISSUE 3, 101559, JUNE 2022.
26. Rabinowitz, Y.S., Galvis, V., Tello, A., Rueda, D., García, J.D. **Genetics vs chronic corneal mechanical trauma in the etiology of keratoconus.** Experimental Eye Research, Volume 202, 2021, 108328, ISSN 0014-4835.
27. da Silva, D.C., Gadelha, B.N.B., Feitosa, A.F.B., da Silva, R.G., Albuquerque, T.L.P.E., Santos, D.C.P.F., Gadelha, D.N.B., Schamber-Reis, B.L.F. **Analysis of VSX1 Variations in Brazilian Subjects with Keratoconus.** J Ophthalmic Vis Res. 2018 Jul-Sep;13(3):266-273.
28. Gadelha, D.N.B., Feitosa, A.F.B., da Silva, R.G., Antunes, L.T., Muniz, M.C., de Oliveira, M.A., Andrade, D.O., da Paz Silva, N.M., Cronemberger, S., Schamber-Reis. B.L.F. **Screening for Novel LOX and SOD1 Variants in Keratoconus Patients from Brazil.** J Ophthalmic Vis Res. 2020 Apr 6;15(2):138-148.
29. NCBI Gene. **ZSCAN10 zinc finger and SCAN domain containing 10 [Homo sapiens (human)].** National Center for Biotechnology Information, 2025.
30. Skamagki M, Correia C, Yeung P, Baslan T, Beck S, Zhang C, Ross CA, Dang L, Liu Z, Giunta S, Chang TP, Wang J, Ananthanarayanan A, Bohndorf M, Bosbach B,

- Adjaye J, Funabiki H, Kim J, Lowe S, Collins JJ, Lu CW, Li H, Zhao R, Kim K. **ZSCAN10 expression corrects the genomic instability of iPSCs from aged donors.** Nat Cell Biol. 2017 Sep;19(9):1037-1048.
31. Kraus P, V S, Yu HB, Xing X, Lim SL, Adler T, Pimentel JA, Becker L, Bohla A, Garrett L, Hans W, Hölter SM, Janas E, Moreth K, Prehn C, Puk O, Rathkolb B, Rozman J, Adamski J, Bekeredjian R, Busch DH, Graw J, Klingenspor M, Klopstock T, Neff F, Ollert M, Stoeger T, Yildirim AÖ, Eickelberg O, Wolf E, Wurst W, Fuchs H, Gailus-Durner V, de Angelis MH, Lufkin T, Stanton LW. **Pleiotropic functions for transcription factor ZSCAN10.** PLoS One. 2014 Aug 11;9(8):e104568.
 32. Ridone P, Vassalli M, Martinac B. **Piezo1 mechanosensitive channels: what are they and why are they important.** Biophys Rev. 2019 Oct;11(5):795-805.
 33. NCBI Gene. **PIEZO1 piezo type mechanosensitive ion channel component 1 [Homo sapiens (human)].** National Center for Biotechnology Information, 2024.
 34. Zhu L, Ren S, He S, Liu M, Hou F. **Piezo in the eye: expression, distribution and roles in ocular diseases.** Front Physiol. 2025;16:1651258. Published 2025 Aug 12.
 35. Zhu Y, Garcia-Sanchez J, Dalal R, et al. **Differential expression of PIEZO1 and PIEZO2 mechanosensitive channels in ocular tissues implicates diverse functional roles.** Exp Eye Res. 2023;236:109675.
 36. Zhong W, Lan C, Gu Z, Tan Q, Xiang X, Zhou H, Liao X. **The Mechanosensitive Piezo1 Channel Mediates Mechanochemical Transmission in Myopic Eyes.** Invest Ophthalmol Vis Sci. 2023 Jun 1;64(7):1
 37. Mascaro VLDM, Scarpi MJ, Hofling-Lima AL, Sousa LB de. **Transplante de córnea em ceratocone: avaliação dos resultados e complicações obtidos por cirurgias experientes e em treinamento.** Arq Bras Oftalmol [Internet]. 2007 May;70(3):395–405.
 38. Richards S, Aziz N, Bale S, Bick D, Das S, Gastier-Foster J, Grody WW, Hegde M, Lyon E, Spector E, Voelkerding K, Rehm HL; ACMG Laboratory Quality Assurance Committee. **Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: a joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology.** Genet Med. 2015 May;17(5):405-24.
 39. Moshirfar M, Barke MR, Huynh R, et al. **Controversy and Consideration of Refractive Surgery in Patients with Heritable Disorders of Connective Tissue.** J Clin Med. 2021;10(17):3769. Published 2021 Aug 24.