



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS

PAULO RODOLFO TAGLIARI BARBISAN

**CROSS-LINKING CORNEANO: INDICAÇÃO PRECOCE E EFEITOS COLATERAIS NA
RETINA**

*CORNEAL CROSS-LINKING: EARLY INDICATIONS AND SIDE EFFECTS ON THE
RETINA*

CAMPINAS

2020

PAULO RODOLFO TAGLIARI BARBISAN

CROSS-LINKING CORNEANO: INDICAÇÃO PRECOCE E EFEITOS COLATERAIS NA
RETINA

*CORNEAL CROSS-LINKING: EARLY INDICATIONS AND SIDE EFFECTS ON THE
RETINA*

Tese apresentada à Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas como parte dos requisitos exigidos para a obtenção do título de Doutor em Ciências, Área de Concentração em Oftalmologia.

*Thesis presented to the School of Medical Science from
University of Campinas – Ophthalmology Department - as part
of the requirements for obtaining the title of Doctor in
Sciences in the concentration area of Ophthalmology*

ORIENTADOR: PROF. DR. CARLOS EDUARDO LEITE ARIETA

ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO
FINAL DA TESE DEFENDIDA PELO
ALUNO PAULO RODOLFO TAGLIARI BARBISAN, ORIENTADO PELO
PROF. DR. CARLOS EDUARDO LEITE ARIETA

CAMPINAS

2020

Agência de fomento e nº de processo: Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), nº#2015/23237-1.

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca da Faculdade de Ciências Médicas
Maristella Soares dos Santos - CRB 8/8402

B234c Barbisan, Paulo Rodolfo Tagliari, 1987-
Cross-linking corneano : indicação precoce e efeitos colaterais na retina / Paulo Rodolfo Tagliari Barbisan. – Campinas, SP : [s.n.], 2020.

Orientador: Carlos Eduardo Leite Arieta.
Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Ciências Médicas.

1. Cross-linking corneano. 2. Ceratocone. 3. Mácula lutea. 4. Retina. 5. Córnea. I. Arieta, Carlos Eduardo Leite. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Corneal cross-linking : early indications and side effects on the retina

Palavras-chave em inglês:

Cross-linking corneal

Keratoconus

Macula lutea

Retina

Cornea

Área de concentração: Oftalmologia

Titulação: Doutor em Ciências

Banca examinadora:

Carlos Eduardo Leite Arieta [Orientador]

Mônica de Cássia Alves de Paula

Milton Ruiz Alves

Maurício Abujamra Nascimento

Marcelo Jordão Lopes da Silva

Data de defesa: 20-05-2020

Programa de Pós-Graduação: Ciências Médicas

Identificação e informações acadêmicas do(a) aluno(a)

- ORCID do autor: <https://orcid.org/0000-0001-7680-5428>

- Currículo Lattes do autor: <http://lattes.cnpq.br/4638999080033044>

BANCA EXAMINADORA DA DEFESA DE DOUTORADO

PAULO RODOLFO TAGLIARI BARBISAN

ORIENTADOR: PROF. DR. CARLOS EDUARDO LEITE ARIETA

MEMBROS

1. PROF. DR. CARLOS EDUARDO LEITE ARIETA

2. DR. MAURÍCIO ABUJAMRA NASCIMENTO

3. DRA. MÔNICA DE CÁSSIA ALVES DE PAULA

4. DR. MARCELO JORDÃO LOPES DA SILVA

5. DR. MILTON RUIZ ALVES

Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas.

A ata de defesa com as respectivas assinaturas dos membros da banca examinadora encontra-se no SIGA/Sistema de Fluxo de Tese e na Secretaria do Programa da Unidade.

Data: 20/05/2020

DEDICATÓRIA

“Seja você quem for, seja qual for a posição social que você tenha na vida, a mais alta ou a mais baixa, tenha sempre como meta muita força, muita determinação e sempre faça tudo com muito amor e com muita fé em Deus, que um dia você chega lá. De alguma maneira, você chega lá.”

Ayrton Senna

Aos meus pais (Paulo Antonio Barbisan e Maria Christina Tagliari Barbisan), por todo apoio emocional e incentivo durante toda a minha formação até hoje; meus exemplos de vida.

À minha esposa (Paula Senna Lalli Barbisan) e filhos (Lucca e Vitto), por todo o apoio nas dificuldades que enfrentei e pela força durante todo o tempo. Vocês são a razão de tudo que busco em minha vida!

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Carlos Eduardo Leite Arieta por sempre me inspirar a ser um profissional melhor, seja no campo da Oftalmologia, da pesquisa científica, seja frente ao paciente. Um grande exemplo de liderança e sabedoria na Oftalmologia

À Profa. Rosane Silvestre de Castro pelos grandes ensinamentos em Oftalmologia durante a Residência, por toda orientação, paciência e acessoria nos ambulatórios de ceratocone e pela grande amizade que desenvolvemos dentro e fora do ambiente profissional.

Ao Prof. Maurício Nascimento pelos grandes ensinamentos em retina durante o fellowship e pelas orientações profissionais, além de grande amizade durante todo esse tempo.

Ao amigo e colega Dr. Roberto Pacheco Pinto pela ajuda, auxílio e dedicação durante todo esse projeto.

Aos pesquisadores e colaboradores Marina Gonçalves Monteiro Viturino, Fernanda Maria Silveira Souto, Bo Tian e Camillo Carneiro Gusmão.

Aos amigos da Residência, os quais admiro e respeito grandemente: Fauze Abdulmassih, Rodrigo Cardeal, Matheus Vieira, Fernando Amorin, Ruy Missaka, Amanda Jardim, Alexandre Cosimo, Manoela Gondim e Camila Queiroz.

Aos pacientes que participaram dos estudos desta tese, tornando este projeto possível.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001 e da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), Nº #2015/23237-1.

RESUMO

Objetivos: 1) Analisar possíveis efeitos colaterais, de curto prazo, do uso da luz ultravioleta (UV) durante o tratamento cross-linking corneano (CXL), em pacientes portadores de ceratocone, em outras estruturas oculares não antes estudadas, especificamente, na área macular retiniana, através do estudo das alterações vasculares, estruturais e/ou funcionais, antes e após 30 dias do tratamento com CXL. 2) Analisar o benefício da indicação e tratamento com CXL, em pacientes portadores de ceratocone, com idade abaixo de 17 anos, através do estudo comparativo das características e a progressão do ceratocone após o tratamento em pacientes com 16 anos ou menos, em relação a pacientes com 17 anos ou mais de idade.

Métodos: 1) No primeiro estudo, foram analisados 17 olhos de 17 pacientes (16 anos ou mais de idade), portadores de ceratocone em tratamento com CXL, submetidos à avaliação da melhor acuidade visual corrigida (MAVC), grade de Amsler, angiografia com fluoresceína (FA) e tomografia de coerência óptica (SD-OCT), teste realizado antes do CXL, 7 e 30 dias depois. A Eletrorretinografia Multifocal (mfERG) foi registrada antes e sete dias após o CXL. 2) No segundo estudo, retrospectivo, foram analisados 105 olhos, de 94 pacientes, com ceratocone, em tratamento com CXL, divididos em dois grupos, por idade: Grupo 1 (16 anos ou menos) e Grupo 2 (17 anos ou mais). Foram avaliadas a MAVC, a densidade celular endotelial da córnea (DCE), a espessura central da córnea (ECC), ceratometria (topografia) antes do CXL, e um, três, seis e doze meses depois.

Resultados: 1- O primeiro estudo mostrou a MAVC média (SD) de 0,47 (\pm 0,12) pré-CXL, 0,55 (\pm 0,15) 7 dias após o CXL e 0,46 (\pm 0,10) 30 dias pós-CXL. A acuidade visual corrigida para pertomédia (Jaeger) (SD) foi de 2,42 (\pm 0,60) pré-CXL, 3,4 (\pm 0,63) 7 dias após o CXL e 2,58 (\pm 0,61) 30 dias pós-CXL. A espessura macular central média (SD) no SD-OCT (μ m) foi 253,62 (\pm 20,9) pré-CXL, 260,5 (\pm 18,7) 7 dias após a CXL, e 256,44 (\pm 21,6) 30 dias pós-CXL. Em 12 olhos, o mfERG mostrou um aumento, estatisticamente significativo, ($p = 0,0353$) na latência P1 (ms) do anel 4 entre pré-CXL ($39,45 \pm 2,05$) e 7 dias após o CXL ($41,04 \pm 1,28$). A análise de regressão mostrou que o aumento da latência de P1 foi correlacionada com o aumento da espessura macular central no SD-OCT ($p = 0,027$). Além disso, 9 pacientes apresentaram uma diminuição, estatisticamente significativa, nas amplitudes P1 dos anéis 1, 2, 3, 4 e 5 entre pré-CXL e 7 dias após o CXL. 2- O segundo estudo mostrou que no grupo 1, a MAVC média (SD) foi de 0,45 (\pm 0,25), pré-CXL e 0,56 (\pm 0,29) um ano após o CXL; e os parâmetros ceratométricos médios (SD) Kmax, Ksteep e Kflat

foram, respectivamente, 58,47 (\pm 7,16), 52,93 (\pm 5,42) e 47,22 (\pm 4,19) pré-CXL, e 58,21 (\pm 7,68), 52,25 (\pm 5,49) e 46,56 (\pm 4,65) um ano após o CXL. No grupo 2, a MAVC média (SD) foi de 0,50 (\pm 0,30) pré-CXL e de 0,56 (\pm 0,32) ao ano, pós-CXL; e os parâmetros ceratométricos médios (SD) Kmax, Ksteep e Kflat foram, respectivamente, 57,64 (\pm 7,10), 54,02 (\pm 6,22) e 48,60 (\pm 4,06) pré-CXL e 56,46 (\pm 8,01), 52,46 (\pm 5,79) e 47,85 (\pm 4,86) um ano após o CXL.

Conclusões: 1- O primeiro estudo mostrou que a maioria dos pacientes exibia pequenas alterações nos parâmetros mfERG, apesar de nenhuma alteração na MAVC, na acuidade visual para perto, na estrutura e vascularização da região macular retiniana nas imagens do SD-OCT e FA, sendo essas alterações precoces categorizadas como leve efeito subclínico do procedimento de CXL da córnea. 2- O segundo estudo não mostrou diferenças estatísticas entre os grupos de pacientes; sendo assim, os achados apóiam-se na indicação mais precoce do tratamento com CXL, em pacientes pediátricos, para estabilização precoce da doença e melhor prognóstico em MAVC e parâmetros ceratométricos.

Palavras-chave: ceratocone; cross-linking; córnea; mácula; retina; jovens; luz UV.

ABSTRACT

Objectives: 1) To analyze possible short-term side effects from the use of ultraviolet (UV) light during corneal cross-linking (CXL) treatment in patients with keratoconus on other ocular structures not previously studied, specifically in the retinal macular area, by studying vascular, structural and/or functional alterations before and after 30 days of treatment with CXL. 2) To analyze the benefit of CXL indication and treatment of patients with keratoconus under 17 years of age by comparing the characteristics and progression of keratoconus after the treatment in patients 16 years or younger compared to patients 17 years old or older.

Methods: 1) In the first study, 17 eyes of 17 patients (16 years of age and older) with keratoconus treated with CXL were analyzed and submitted to the evaluation of the best corrected visual acuity (BCVA), Amsler's grid, fluorescein angiography (FA) and optical coherence tomography (SD-OCT), test before CXL, 7 and 30 days later. Multifocal electroretinography (mfERG) was recorded before and seven days after CXL. 2) In the second study, retrospective, 105 eyes of 94 keratoconus patients undergoing treatment with CXL were analyzed, divided into two groups by age: Group 1 (16 years or younger) and Group 2 (17 years or older). The BCVA, endothelial corneal cell density (ECC), central corneal thickness (CCT), keratometry (topography) before CXL and one, three, six and twelve months later were evaluated.

Results: 1) The first study showed a mean BCVA (SD) of 0.47 (\pm 0.12) pre-CXL, 0.55 (\pm 0.15) 7 days after CXL and 0.46 (\pm 0.10) 30 days after CXL. The mean near-corrected visual acuity (Jaeger) (SD) was 2.42 (\pm 0.60) pre-CXL, 3.4 (\pm 0.63) 7 days after CXL and 2.58 (\pm 0.61) 30 days post-CXL. Mean central macular thickness (SD) on SD-OCT (μ m) was 253.62 (\pm 20.9) pre-CXL, 260.5 (\pm 18.7) 7 days after CXL and 256.44 (\pm 21) 30 days post-CXL. In 12 eyes, mfERG showed a statistically significant increase ($p = 0.0353$) in ring 4 P1 latency (ms) between pre-CXL (39.45 ± 2.05) and 7 days after CXL (41.04 ± 1.28). Regression analysis showed that the increased P1 latency was correlated with increased central macular thickness on SD-OCT ($p = 0.027$). In addition, 9 patients had a statistically significant decrease in P1 amplitudes of rings 1, 2, 3, 4, and 5 between pre-CXL and 7 days after CXL. 2) The second study showed that in group 1 the mean BCVA (SD) was 0.45 (\pm 0.25) pre-CXL and 0.56 (\pm 0.29) one year after CXL and the mean keratometric parameters (SD) Kmax, Ksteep and Kflat were, respectively, 58.47 (\pm 7.16), 52.93 (\pm 5.42) and 47.22 (\pm 4.19) pre-CXL, and 58.21 (\pm 7.68), 52.25 (\pm 5.49) and 46.56 (\pm 4.65) one year after CXL. In group 2, the mean BCVA (SD) was 0.50 (\pm 0.30) pre-CXL and 0.56 (\pm 0.32) the following year post-CXL and

the mean keratometric parameters (SD) Kmax, Ksteep and Kflat were, respectively, 57.64 (\pm 7.10), 54.02 (\pm 6.22) and 48.60 (\pm 4.06) pre-CXL and 56.46 (\pm 8.01), 52.46 (\pm 5.79) and 47.85 (\pm 4.86) one year after CXL.

Conclusions: 1) The first study showed that most patients exhibited minor changes in mfERG parameters, despite no change in BCVA, near visual acuity, retinal macular area anatomy and vascularization on SD-OCT and AF images, being these early changes categorized as mild subclinical effect of the CXL procedure. 2) The second study did not show statistical differences between groups and thus, the findings support the earlier indication of CXL treatment in pediatric patients for early disease stabilization and better prognosis in BCVA and keratometric parameters.

Keywords: keratoconus; cross-linking; cornea; macula; retina; young; UV-light.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AF: do inglês “autofluorescence”; em português “autofluorescência”.

CXL: do inglês “corneal cross-linking”; em português “cross-linking corneano”.

DCE: densidade celular endotelial da córnea.

ECC: espessura central da córnea.

FA: do inglês “fluorescein angiography”; em português “angiografia fluoresceínica”.

MAVC: melhor acuidade visual corrigida.

mfERG: do inglês “multifocal electroretinogram”; em português “eletrorretinograma multifocal”.

ms: milissegundos.

nm: nanômetros.

OR: do inglês “odds ratio”; em português “razão de probabilidade”.

ROS: do inglês “reactive oxygen species”; em português “espécies reativas de oxigênio”.

SD-OCT: do inglês “spectral domain-optical coherence tomography”; em português “tomografia de coerência óptica de domínio espectral”.

UV: ultravioleta.

µm: micrometros.(verificar no HOUAISS)

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	13
1.1 Ceratocone	13
1.2 Cross-Linking Corneano	30
2. JUSTIFICATIVAS	38
3. OBJETIVOS	39
4. METODOLOGIA	40
4.1 Metodologia do primeiro projeto	40
4.2 Metodologia do segundo projeto	43
5. RESULTADOS	45
Artigo 1	46
Artigo 2	62
6. DISCUSSÃO GERAL	76
7. CONCLUSÕES	83
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	84
9. ANEXOS	102

1. INTRODUÇÃO

1.1 CERATOCONE

Ceratocone é uma doença corneana classificada no grupo das ectasias de córnea. Ectasia caracteriza-se, por definição, como qualquer alteração na curvatura da córnea, sendo o afinamento de sua espessura uma das principais características.¹ Dentre as de origem primária, além do ceratocone, que é a mais comum, ainda existem a degeneração marginal pelúcida e o ceratoglobos.²

Ceratocone, um termo, que vem do grego *keras* (córnea) e *konos* (cone), foi descrito pela primeira vez na literatura, em 1854 (Nottingham). É um termo clínico usado para descrever uma condição em que a córnea assume a forma cônica, definida como uma doença corneana degenerativa, bilateral e assimétrica (não havendo diferença significativa na incidência entre os olhos direito e esquerdo), progressiva, levando às inúmeras alterações na superfície da córnea.

Caracteriza-se pelo afinamento central, protusão apical e astigmatismo irregular, com vários graus de cicatrização, o que ocasiona redução da acuidade visual. A córnea adquire forma cônica devido ao seu afinamento e protusão, não havendo infiltração celular ou vascularização. O ceratocone pode ser classificado em redondo ou oval, podendo localizar-se próximo ao eixo visual, superior ou inferior.¹

1.1.1 PREVALÊNCIA

A doença ocorre em todos os grupos raciais, afeta igualmente homens e mulheres; porém não está claro se a maior prevalência está em homens ou mulheres. A maioria dos estudos recentes indica uma preponderância de homens sobre mulheres;²⁻⁵ isso evidencia que diferenças hormonais podem estar envolvidas, visto que o ceratocone se desenvolve mais cedo e progride mais rapidamente em homens do que em mulheres.⁶

Os relatos de prevalência e incidência variam; mas, em um estudo recente, calculou-se uma incidência anual de 1:7500 (13,3 casos por 100.000), e uma prevalência estimada de 1:375 (265 casos por 100.000).⁷

Tipicamente, seu início é na puberdade e progride até a terceira ou quarta décadas de vida, período em que geralmente cessa sua progressão, sendo a idade média de 22,4 anos de idade;⁸ embora casos de ceratocone grave, tenham sido relatados em crianças a partir dos 4 anos de idade.⁹ No entanto, na maioria dos relatos, a idade do diagnóstico é obtida alguns anos após seu início, pois a doença inicial, geralmente, é assintomática. Relatos recentes demonstraram início da doença no final da primeira década de vida ou no início da adolescência.¹⁰⁻²⁰ Isso leva à noção de início mais precoce, ou que a comunidade médica está sendo diligente no diagnóstico inicial. A razão poderá estar nos métodos mais eficientes de diagnóstico da doença utilizados nos últimos anos, como o uso da videoceratografia ou, por haver, no momento, mais pessoas portadoras de alergia na população em geral.²¹

O diagnóstico de ceratocone antes da idade adulta é um fator prognóstico negativo para progressão e está associado a uma maior probabilidade de necessidade de transplante de córnea;²² além de que pacientes mais jovens correm maior risco de progressão rápida da doença.^{23,24} Nessa situação, uma relação inversa foi encontrada entre a idade do paciente e a gravidade da doença: em média, os casos pediátricos são mais graves e têm maior probabilidade de se tornarem progressivos.²⁵

Em crianças, a progressão do ceratocone pode ser rápida e devastadora; sendo assim, como resultado, pacientes mais jovens têm maior probabilidade de necessitar de cirurgia de transplante de córnea,^{22,25} cuja taxa de sobrevivência do enxerto é, consideravelmente, menor do que nos adultos.²⁵

1.1.2 ETIOLOGIA

Apesar de a etiologia permanecer indeterminada, existem várias associações, incluindo Doença Atópica, Retardo Mental, Síndrome de Down, Amaurose Congênita de Leber, Trauma Ocular por lente de contato e doenças sistêmicas do colágeno (Síndrome de Ehler-Danlos, Síndrome de Marfan, Osteogênese Imperfeita).

Diversas vias bioquímicas, físicas e genéticas diferentes foram implicadas, sendo a ceratocone uma via comum, final, de várias doenças que causam alterações estruturais na córnea levando ao afinamento e ao desenvolvimento de uma ectasia corneana. Além disso, parece que fatores ambientais podem ser essenciais para atuar como gatilho da condição, em indivíduos geneticamente predispostos, como esfregar os olhos, atopia e exposição a UV; embora a

contribuição relativa desses fatores ainda seja desconhecida.²⁷ Um excesso de qualquer um desses fatores ambientais causa danos oxidativos em córneas com ceratocone, devido à incapacidade dessas córneas em processar espécies reativas de oxigênio (ROS), secundário à falta de enzimas, como aldeído desidrogenase classe 3 (ALDH3), catalase e/ou superóxido dismutase, que removem ou neutralizam as ROS, levando a um processo de degradação que, por último, causa afinamento corneano e perda de visão.^{28,29}

A associação entre esfregar os olhos e ceratocone há muito tempo é descrita^{2,30-33} e aceita como fator de risco. Muitos autores relatam que cerca de metade dos pacientes com ceratocone esfregam os olhos, embora a porcentagem varie de acordo com o estudo.³⁴ Obviamente, existem algumas variações nessa associação, podendo o olho ser esfregado de maneira suave ou vigorosa^{35,36}, observando-se que a duração do esfregar, em pacientes com ceratocone, é muito mais longo (de 10 a 180 segundos) do que a duração em distúrbios oculares alérgicos ou infecciosos (inferior a 15 segundos),³⁷ assim como em pessoas sem problemas oculares (menos de 5 segundos).³⁰ Curiosamente, em casos de ceratocone assimétrico, o olho mais afetado foi o esfregado com mais vigor; como também uma série de casos confirma a expressão assimétrica da doença em pacientes que, habitualmente, esfregam os olhos.^{30,38,39}

Estudos de caso-controle, em que se realizaram uma análise de regressão logística, incluindo atopia e história familiar de ceratocone, constatou-se que apenas o esfregar dos olhos era, significativamente, associado à doença, com um odds ratio (OR) de 3,98.^{2,40,41} Pode ser que hábitos de fricção anormais comecem, à medida que o ceratocone se desenvolve; no entanto, existe um grande número de pacientes com história de esfregar, habitualmente, o olho, antes do desenvolvimento da doença;⁴²⁻⁴⁴ devendo-se assim, considerar o hábito de esfregar os olhos como um fator de risco, pelo menos em algumas formas de ceratocone, em pessoas geneticamente suscetíveis.⁴⁵

Ao esfregar a córnea, o microtrauma, causado ao epitélio, gera níveis elevados de metaloproteinases da matriz MMP-1 e MMP-13, que são secretadas por células epiteliais e estromais.^{46,47} A liberação desses fatores faz parte do processo que leva ao ceratocone e sua progressão, devido à apoptose de queratócitos e subsequente perda de volume estromal.⁴⁷

Em relação à atopia (reação de hipersensibilidade, que compreende alergia, asma e eczema), há relatos controversos de sua associação com ceratocone. Uma ligação positiva foi observada

por muitos autores;^{34,48} embora outros, não encontrassem associação, estatisticamente, significativa quando comparada a um grupo- controle.^{2,30,50,51} Note-se que, nos achados não significativos, o grupo-controle veio da população em geral e não de um grupo com mesma idade e sexo. A discrepância pode não apenas resultar de diferentes gravidades da condição ou métodos de avaliação, baseada no auto-relato dos pacientes; mas também do fato de alguns autores não diferenciarem os efeitos da reação de hipersensibilidade;^{2,30,50,51} enquanto outros avaliaram apenas um sintoma de atopia, como alergia, mas não incluíram asma ou eczema. Esses autores sugeriram que a atopia só foi associada indiretamente, pois o prurido induzido por ela, levou a esfregar os olhos. Ainda assim, Kaya et al⁴⁹ mostraram que pessoas com ceratocone e atopia possuíam córneas mais finas e de maior curvatura, quando comparadas a pessoas de mesma idade e sexo com ceratocone, mas sem atopia.

Alergia, induzida por pólen, poeira, antibióticos ou animais é, frequentemente, associada ao ceratocone, em comparação com controles ou a população em geral; sendo encontrada em cerca de um terço dos pacientes.^{31,34,40,41} Embora a alergia possa causar fricção nos olhos, não é o único fator provocativo, já que existe uma porcentagem muito maior de pacientes que esfregaram os olhos, do que a porcentagem de pacientes portadores de alergia.

A luz ultravioleta (UV) é uma fonte de espécies reativas de oxigênio (ROS) e a exposição excessiva à luz solar leva a danos oxidativos nas córneas com ceratocone, as quais possuem uma quantidade reduzida de enzimas, incluindo ALDH3 e superóxido dismutase, necessárias para remover o ROS.^{28,29} Assim sendo, a maior prevalência de ceratocone em países quentes e ensolarados, em comparação com Europa e América do Norte, levaram à crença de que a alta exposição solar nesses países, seja responsável pela alta prevalência.

Evidências adicionais de experimentos com animais, em que camundongos expostos à luz UV demonstraram uma degeneração e afinamento do colágeno estromal, com perda acentuada de queratócitos, reforçaram essa evidência.⁵² Esse último estudo confirmou um relato anterior sobre a exposição aos raios UV de um coelho com a córnea anestesiada, o que resultou em apoptose das células em todas as camadas da córnea, bem como de queratócitos.⁵³

Porém, deve-se notar que as radiações UV podem fornecer um efeito benéfico ao induzir ao cross-linking das fibras de colágeno corneanas, mitigando o desenvolvimento ou a progressão da doença.⁵⁴ No entanto, é provável que o dano oxidativo causado por radiações UV,

combinado com um fator genético, inicie ou acelere o processo da doença. Sendo assim, é necessário pesquisa e evidência para elucidar o papel da exposição ao sol no ceratocone.

História familiar positiva da doença pode resultar de fatores ambientais ou genéticos. Nem sempre é claro determinar, qual dos dois é mais influente na patogênese da doença sem estabelecer um histórico da família. Em muitos estudos, os dados recentes sobre a forte associação de consanguinidade/endogamia dos pais, em pacientes com ceratocone, sugerem um forte componente genético para o desenvolvimento da doença.⁴⁰

Embora a maioria dos casos seja esporádico,³² muitos estudos relataram a presença de um grande número de ceratocone em membros de uma mesma família. A taxa varia de 5% para 27,9%.^{30,32,34} No estudo em que 27,9% de casos de ceratocone foram encontrados em pelo menos uma pessoa na família, observou-se que os portadores que possuíam parentes de primeiro grau afetados, representavam 20,5% do total.³⁴ Em outro estudo, em que parentes (primeiro grau e/ou outros) dos portadores de ceratocone foram avaliados, topograficamente, em 14% dos familiares se detectou a doença.⁵⁵

1.1.3 PATOGÊNESE

Como discutido acima, a genética desempenha um papel importante na patogênese do ceratocone. Parentes de pacientes portadores apresentam um risco elevado em comparação com aqueles com parentes não afetados.

A maior parte do ceratocone hereditário é de origem autossômica dominante, enquanto o padrão autossômico recessivo também é sugerido. Os estudos de herança genética identificaram, pelo menos, 19 loci genéticos candidatos que podem abrigar variações genéticas no ceratocone.⁵⁶ Isso indica claramente a heterogeneidade genética da patogênese do ceratocone. Embora a maioria desses loci genômicos não tenha sido replicada independentemente, a região chr5q21.2 foi replicada independentemente em três estudos separados.⁵⁷⁻⁵⁹

Além disso, tecnologias genéticas recentemente desenvolvidas, incluindo sequenciamento completo de exoma ou genoma, e tecnologias de associação em todo o genoma, contribuíram para melhorar nosso conhecimento sobre a influência genética na patogênese do ceratocone.

Uma das primeiras teorias para a patogênese do ceratocone foi a de haver uma anormalidade epitelial como insulto primário, resultando na liberação de enzimas proteolíticas que degradam o colágeno do estroma, levando ao afinamento e ao enfraquecimento da córnea.⁶⁰

O envolvimento de células epiteliais no processo da doença é apoiado pela observação de irregularidades estruturais no epitélio (bolhas e degeneração) que parecem progredir com a doença.⁶¹ No entanto, com o uso da luz microscópica, há evidência adicional de grandes mudanças estruturais em outras camadas da córnea, incluindo quebras na camada de Bowman e afinamento estromal.^{60,62} As pequenas alterações do pleomorfismo celular do endotélio corneano, provavelmente, são secundárias à hipóxia induzida por lentes de contato ou estresse mecânico.⁶³

Existem evidências conflitantes sobre as anormalidades bioquímicas no ceratocone, com relatos de aumento,⁶⁴ diminuição,⁶⁵ ou níveis normais⁶⁶ de proteoglicanos. O exame do proteoma do tecido de córneas com ceratocone confirmou que, em comparação com a córnea normal, há um aumento na regulação de decorin e keratocan.⁶⁷⁻⁶⁹ Sulfato de queratan proteoglicano parece estar estruturalmente alterado nessas córneas, talvez pela menor quantidade de cadeias de sulfato de queratan.⁷⁰ A maioria dos estudos concorda que, em córneas com ceratocone, há um menor conteúdo de colágeno estromal,^{64,65} mas que não há mudanças drásticas na distribuição dos vários tipos de colágeno,⁷¹⁻⁷³ no padrão⁷⁴ e arranjo molecular do colágeno dentro do estroma,^{64,75} exceto em regiões de cicatrizes, em que há alteração da distribuição do colágeno tipo III.⁷³

O exame das lágrimas ou tecidos da córnea, em pacientes portadores de ceratocone, identificou diferenças na expressão de proteínas em comparação com controles. Esses estudos fornecem pistas adicionais sobre a patologia da doença, bem como a identificação de possíveis alvos para tratamento. A expressão de uma gama de proteínas, incluindo citocinas e enzimas, é alterada no ceratocone quando comparada com controles normais, sugerindo o envolvimento de apoptose e cicatrizes no processo da doença. No entanto, não está claro se as vias são modificadas como um fenômeno primário ou secundário.

O exame do líquido lacrimal indicou que existem 41500 proteínas nas lágrimas.⁷⁶ Estudos proteômicos das camadas epiteliais e estromais dessas córneas demonstraram que ocorrem remodelação estrutural e estresse metabólico em ambas as camadas e que nelas há menor

expressão de muitos proteoglicanos da matriz extracelular e proteínas envolvidas na proliferação, crescimento e migração.^{77,78}

1.1.4 BIOMECÂNICA CORNEANA E CERATOCONE

A córnea, como biomaterial, possui propriedades mecânicas viscoelásticas não lineares e heterogêneas.⁸⁰ Essas propriedades refletem sua histologia: o colágeno contribuindo para sua elasticidade/resistência, os proteoglicanos, queratócitos e fibroblastos responsáveis por sua viscosidade e a orientação e ramificação das fibrilas de colágeno (dependente da profundidade corneana) prevendo um perfil biomecânico espacialmente heterogêneo (sendo a córnea anterior mais rígida que a córnea posterior, devido à orientação das fibrilas de colágeno).⁸¹

O afinamento estromal, uma alteração característica do ceratocone, é causado por uma redução no número de lamelas na região afetada,⁸² mas o mecanismo pelo qual isso ocorre é incerto. Apesar de o afinamento estromal, no ceratocone, ter sido atribuído à degradação do colágeno por enzimas proteolíticas ou níveis reduzidos de inibidores de proteinase,⁸³ também foi proposto que o colágeno não é perdido, mas simplesmente redistribuído na córnea por deslizamento entre as lamelas.⁸⁴ Este último mecanismo é apoiado pela observação de redução da adesão inter-lamelar e um número reduzido de inserções lamelares na camada de Bowman.⁸⁵

Estudos de difração de raios-X fornecem algumas das evidências mais fortes para apoiar essa teoria. Dentro das camadas estromais mais profundas da córnea saudável, o colágeno é predominantemente alinhado nas direções ortogonais superior-inferior e nasal-temporal; contudo esse arranjo é, marcadamente, alterado na região apical no ceratocone avançado.^{86,87}

Com base nesses achados, Meek et al propuseram que a perda de integridade estrutural, na córnea portadora de ceratocone, seja causada pela presença de anormalidades dos queratócitos e proteínas da matriz,^{67,82} com regulação positiva de proteólise que desencadeia um desmembramento das lamelas ao longo de seu comprimento e de suas âncoras no limbo, com abertura das bifurcações lamelares. Essa teoria é apoiada por observações após o tratamento com cross-linking corneano, em que a reticulação do tecido estabelecido, aumenta tanto a resistência do estroma à digestão enzimática, quanto à coesão entre fibrilas de colágeno e a matriz não-colágena.⁸⁸

Baseado nessas observações, o estudo da biomecânica da córnea ganhou muito destaque nos últimos 15 anos por suas possíveis aplicações clínicas. A capacidade, *in vivo*, de detectar instabilidade biomecânica precoce na córnea é fundamental, não apenas para diagnóstico, mas também para determinar o melhor momento do tratamento com o CXL. Da mesma forma, determinar a eficácia de tal tratamento é igualmente importante para garantir um resultado preditivo.

Assim sendo, sistemas de detecção da histeresecorneana (capacidade viscoelástica de amortecimento da córnea) e fator de resistência da córnea (resistência viscoelástica da córnea à deformação) com o ORA (Ocular Response Analyzer), que será discutido em detalhes, foram desenvolvidos e auxiliam no estudo da biomecânica corneana em situações patológicas, possibilitando a avaliação e entendimento da resposta terapêutica nessas situações.

1.1.5 CLASSIFICAÇÃO

O ceratocone possui uma classificação individual. A forma frusta refere-se ao estágio inicial do ceratocone, e foi proposto inicialmente por Amsler,⁸⁹ em 1961 e depois adaptado por Klyce⁹⁰ como “o olho contra-lateral (de um olho com ceratocone clinicamente manifesto) que não possui achados clínicos de qualquer espécie, exceto por certas alterações topográficas”. Na literatura, existe um consenso claro que, para se classificar em ceratocone frusto, ele deve ser o olho mais saudável em um paciente com ceratocone; e esse olho mais saudável não deve possuir sinais clínicos de ceratocone, como as estrias de Vogt e/ou anel de Fleischer, ou quaisquer alterações topográficas significativas, que indiquem um ceratocone clinicamente manifesto.^{91,92}

Já o ceratocone suspeito, deve ser um termo reservado para córneas com alterações topográficas muito específicas e que não possuam ceratocone no olho contralateral. Em termos gerais, um ceratocone suspeito pode demonstrar, na topografia, uma área localizada, com aumento anormal da curvatura, que é frequentemente inferior; mas pode ser central ou, raramente, superior, podendo se apresentar como uma gravata borboleta assimétrica, truncada ou de eixo inclinado.⁹⁰ Rabinowitz et al definiram suspeita de ceratocone, em uma perspectiva progressiva, sendo sua definição independente do status do olho contralateral, não apresentando nenhum achado na lâmpada de fenda, ausência de “tesoura” na retinoscopia, e presença do padrão de gravata borboleta assimétrica, com eixo inclinado, na topografia.⁹³ Além disso, seu grupo desenvolveu um sistema de detecção para diferenciar a córnea normal

do ceratocone suspeito. Eles recomendam o uso do valor inferior-superior (I-S), que calcula o poder corneano nos 6 mm centrais. Um valor de I-S entre 1,4 e 1,9 dioptrias sugere um ceratocone suspeito, enquanto um valor maior sugere um ceratocone clínico, e um valor mais baixo sugere uma córnea normal.⁹²

O ceratocone subclínico é definido, por alguns autores, como um olho contralateral de um olho portador de ceratocone associado às seguintes características: 1) nenhum achado clínico (ceratométrico, retinoscópico ou biomicroscópico) de ceratocone; 2) assimetria I-S e/ou padrão de gravata borboleta assimétrico à topografia; e 3) nenhum histórico de uso de lentes de contato, cirurgia ocular ou trauma.⁹⁴⁻⁹⁶

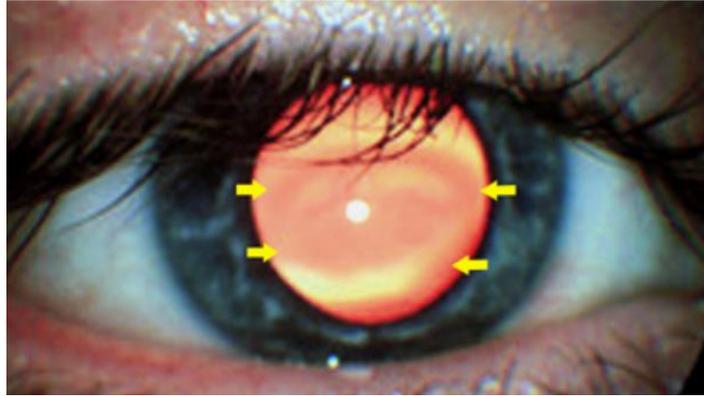
1.1.6 SINAIS E SINTOMAS

A sintomatologia relacionada ao ceratocone varia dependendo do estágio e da idade de acometimento. Os pacientes podem ser assintomáticos ou, de início, apresentarem maior sensibilidade à luz, visualização de halos em torno de objetos, fadiga ocular, irritação, alergia, dor, prurido e baixa acuidade visual.^{97,98}

Os sintomas variam de leve a grave, podendo apresentar miopia, astigmatismo irregular e, freqüentemente, cicatrizes na córnea.³³ Um paciente típico com ceratocone apresenta-se, na adolescência, com queixas de embaçamento ou distorção na visão, necessitando de troca frequente dos óculos devido a mudanças na refração. Tal fato é consequência direta da deformidade da superfície anterior da córnea. Os raios luminosos, que seriam refratados de modo harmônico, atingem uma área de curvatura muito elevada, e são refratados irregularmente, criando imagens retinianas desfocalizadas, que não são passíveis de focalização por um sistema óptico convencional, do tipo óculos. Há, portanto, a determinação de um astigmatismo irregular, com miopia geralmente associada.⁹⁹

A retinoscopia mostra astigmatismo miópico irregular e sinais como reflexo em tesoura e em “gota de óleo” (sinal de Charleux; Figura 1), altamente sugestivos de ceratocone.

Figura 1. Sinal de Chauleux

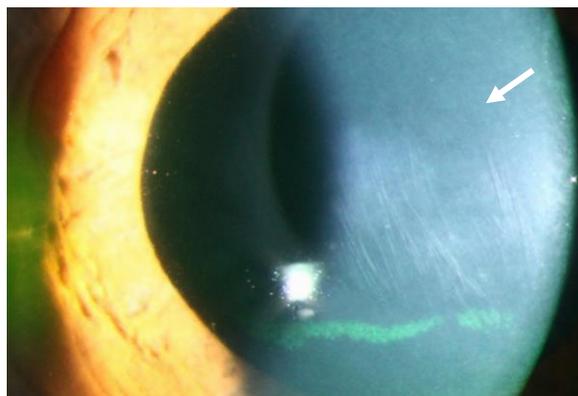


Fonte: Dr. Carlo Benedetti¹

¹Disponível em: <<https://www.carlobenedetti.it/en/occhio-cheratocono>>[acessado 26 de Fevereiro, 2020].

Ao exame biomicroscópico, com lâmpada de fenda, nota-se a presença de nervos corneanos proeminentes, cicatrizes subepiteliais e/ou estromais anteriores, secundárias a quebras na membrana de Bowman, finas linhas paralelas vistas no estroma posterior que desaparecem na aplicação de pressão no globo, chamadas de estrias de Vogt (Figura 2) e o anel de Fleischer (Figura 3) formado devido à deposição de hemossiderina, encontrada ao redor da base do cone e melhor apreciada através de um filtro com luz azul cobalto.

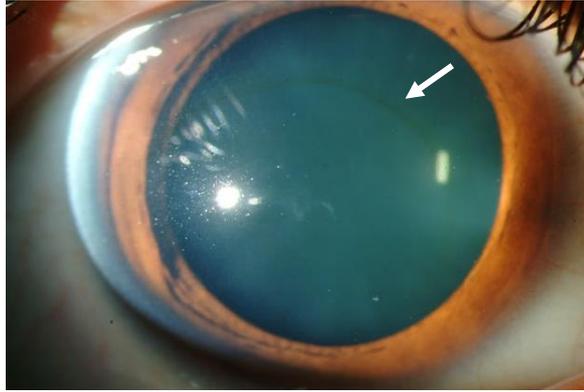
Figura 2. Estrias de Vogt



Fonte: Atlas de Imagens Oftalmológicas. Universidade de Iowa.²

²Disponível em: <<https://webeye.ophth.uiowa.edu/eyeforum/atlas/pages/vogts-striae.htm>>[acessado 26 de Fevereiro, 2020].

Figura 3. Anel de Fleischer

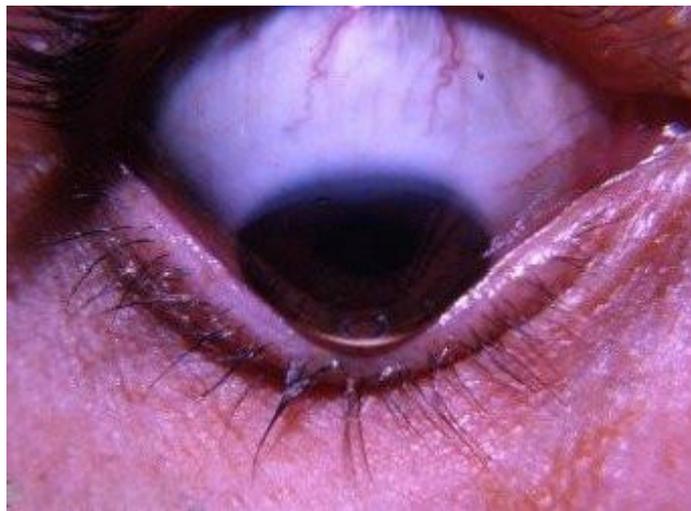


Fonte: Atlas de Imagens Oftalmológicas. Universidade de Iowa.³

³Disponível em: <<https://webeye.ophth.uiowa.edu/eyeforum/cases/98-Keratoconus-Surgical-Options.htm>>[acessado 26 de Fevereiro, 2020].

Sinais clínicos brutos, no ceratocone avançado, incluem distorção da pálpebra inferior, em forma de V, no olhar para baixo, devido a uma córnea cônica excessivamente protuberante, conhecida como sinal de Munson (Figura 4) e um feixe de luz bem focado perto do limbo nasal, produzido pela iluminação lateral da córnea (sinal de Rizzutti; Figura 5).

Figura 4. Sinal de Munson



Fonte: Atlas de Imagens Oftalmológicas. Universidade de Iowa.⁴

⁴Disponível em: <<http://webeye.ophth.uiowa.edu/eyeforum/atlas/pages/keratoconus-with-Munsons-sign.html>>[acessado 26 de Fevereiro, 2020].

Figura 5. Sinal de Rizzutti



Fonte: 2015 American Academy of Ophthalmology, www.aao.org

Hidropsia aguda (Figura 6) é uma apresentação específica do ceratocone causada por rupturas repentinas no corpo da membrana Descemet, levando a uma diminuição súbita na visão, acompanhada por turvação da córnea, edema corneano, com ou sem fissuras e/ou bolhas intraestromais vistas sobrejacente à quebra.^{79,100,101}

Figura 6. Hidrópsia Aguda



Fonte: Atlas de Imagens Oftalmológicas. Universidade de Iowa.⁵

⁵Disponível em: <<https://webeye.ophth.uiowa.edu/eyeforum/cases/241-Acute-Corneal-Hydrops.htm>> [acessado 26 de Fevereiro, 2020].

No ceratocone avançado, o astigmatismo corneano pode assumir várias formas, mas duas predominam;⁹⁴ sendo a mais comum a redonda ou em forma de mamilo, que é limitada em diâmetro, mas pode atingir grandes graus de conicidade, e o centro do seu cone, geralmente,

ficando no quadrante nasal inferior. Já a outra forma é o cone oval ou flácido, em que muitas vezes é maior e se localiza no quadrante temporal inferior, próximo à periferia, associado a mais episódios de hidropsia corneana, cicatrizes e dificuldade na adaptação de lentes de contato. Perry et al encontraram uma diferença histopatológica distinta entre as duas formas de cone. A oval apresentou mais quebras na camada de Bowman, e essas eram mais longas e estavam associadas a um aumento da atividade queratocítica. Não houve diferença significativa na espessura do estroma entre os cones redondo e oval, mas houve uma sugestão de mais alterações na membrana de Descemet no grupo oval.¹⁰²

1.1.7 DIAGNÓSTICO

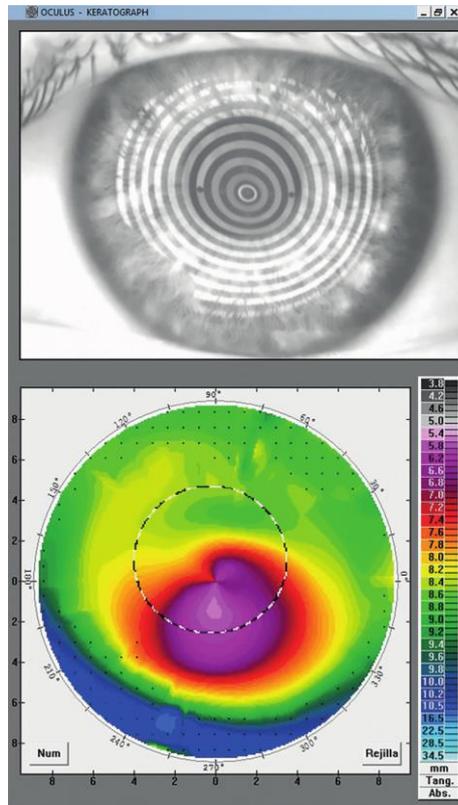
O diagnóstico do ceratocone, baseado nos sintomas em estágios iniciais, apresenta certa dificuldade, pois os primeiros sintomas são semelhantes aos de outras condições.¹⁰³

A maneira clássica de avaliar a doença envolve exame externo dos olhos utilizando o exame de retinoscopia e biomicroscopia para detectar a presença dos sinais descritos anteriormente. Com os avanços dos exames de imagem da córnea, o diagnóstico se tornou mais fácil e preciso.¹⁰⁴ Métodos eletrônicos e moleculares, disponíveis nos últimos tempos, se tornaram ferramentas essenciais para diagnóstico diferencial e categorização do ceratocone.¹⁰⁴

A ceratometria, utilizando o ceratômetro manual (tipo Javal-Schiotz ou Bausch&Lomb), um dispositivo de imagem simples e barato, pode mostrar uma córnea com aumento de curvatura, alto astigmatismo, e/ou distorções nos parâmetros avaliados.

Já a videoceratografia computadorizada foi introduzida pela primeira vez na década de 1980,¹⁰⁵ sendo que os sistemas iniciais se baseavam na análise de imagens de disco de Plácido para calcular a curvatura anterior da córnea. A presença de uma zona de maior poder da córnea, cercada por zonas de menor poder, associada à assimetria inferior-superior na potência da córnea e à inclinação dos eixos radiais mais curvos acima e abaixo do meridiano horizontal, foi estabelecida como característica do ceratocone nos mapas de videoceratografia (Figura 7).

Figura 7. Topografia baseada em discos de Plácido em paciente portador de ceratocone.



Fonte: Keratoconus Screening in Primary Eye Care – A General Overview - Scientific Figure on ResearchGate.⁶

⁶Disponível: <https://www.researchgate.net/figure/Placido-based-topography-in-a-keratoconus-patient_fig1_313014637>[acessado 26 de Fevereiro, 2020].

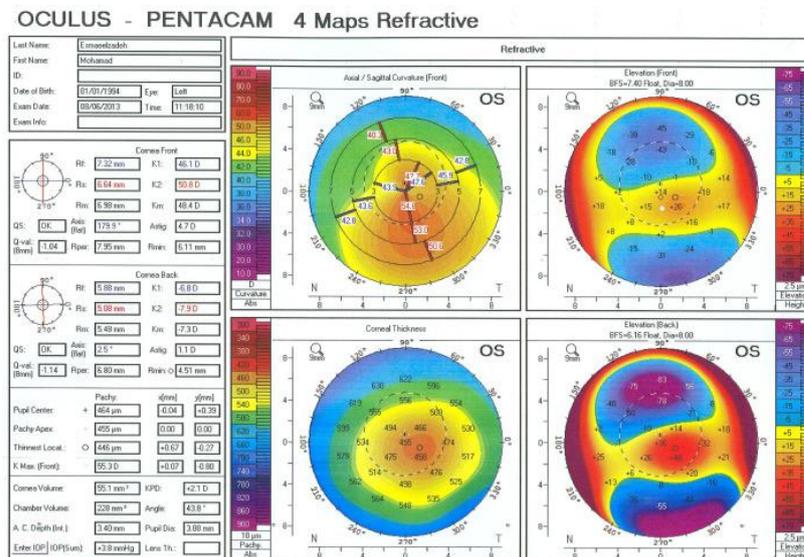
Uma variedade de índices foi desenvolvida para diferenciar o ceratocone dos olhos normais e de outras condições. Alguns dos mais utilizados incluíam o índice de previsão de ceratocone do grupo Klyce-Maeda e o índice KISA do grupo Rabinowitz.¹⁰⁶⁻¹¹⁰ Esses índices foram utilizados para detectar anomalias sutis e acompanhar a progressão da doença em olhos aparentemente normais de familiares dos portadores, bem como em olhos de pacientes com ceratocone aparentemente unilateral.¹¹⁰

Com o advento da cirurgia refrativa, na década de 90, e o risco coincidente de ectasia iatrogênica, houve o estímulo ao desenvolvimento de novos dispositivos de diagnóstico voltados à detecção precoce do ceratocone subclínico. O Orbscan (Bausch&Lomb, Rochester, NY, EUA) utilizou a tecnologia de escaneamento por fenda para fornecer paquimetria de campo amplo e elevação anterior e posterior, bem como mapas de ceratometria. Em uma atualização posterior, o Orbscan II, combinou o escaneamento por fenda com a análise de

topografia baseada em discos de Plácido, o que demonstrou ser mais sensível do que os dispositivos anteriores. A avaliação da elevação posterior máxima, comparada com a “best fit sphere” (BFS), da irregularidade nas zonas centrais de 3 mm e 5 mm e da paquimetria, foi parâmetro útil para discriminar ceratocones suspeitos em indivíduos normais.¹¹²

O princípio de Scheimpflug foi explorado em tomógrafos de córnea, como o Pentacam (Oculus, Wetzlar, Alemanha), para fornecer o mapeamento tridimensional da córnea, incluindo medição direta da superfície anterior e posterior da córnea, paquimetria e determinação do ângulo da câmara anterior (Figura 8).

Figura 8. Imagem dos 4 mapas refrativos do Pentacam em paciente portador de ceratocone.



Fonte: Outcome of intrastromal corneal ring segment relative to depth of insertion evaluated with scheimpflug image - Scientific Figure on ResearchGate.⁷

⁷ Disponível: <https://www.researchgate.net/figure/Preoperative-Pentacam-4-map-refractive-of-a-patient-with-keratoconus-who-planned-for-2_fig3_283975156> [acessado 26 de Fevereiro, 2020].

Uma característica muito elogiada do Pentacam é o gráfico Belin/Ambrosio, que exclui uma zona de 4 mm, centralizada na parte mais fina da córnea, do cálculo de referência; e, assim, o "BFS aprimorado" resultante, torna elevações sutis mais pronunciadas, e possivelmente ajuda na detecção do ceratocone precoce ou subclínico. Vários índices em olhos normais, suspeitos de ceratocone, bem como o ceratocone estabelecido, foram medidos, porém a superioridade definitiva em relação a dispositivos anteriores ainda não foi comprovada.¹¹³⁻¹¹⁸

Recentemente, há o interesse na caracterização de perfis de aberrometria e no entendimento da biomecânica da córnea portadora de ceratocone, utilizando instrumentos como o Ocular Response Analyzer (Reichert Inc, Depew, NY, EUA). Comparado com os controles, verificou-se que os olhos doentes apresentaram excessivas aberrações de alta ordem, e valores mais baixos de histerese corneana e fator de resistência da córnea.¹¹⁹⁻¹²³

1.1.8 TRATAMENTO

O tratamento do ceratocone varia de acordo com o grau de acometimento visual e alterações corneanas. Nos estágios iniciais, o erro de refração pode ser gerenciado pelo uso de óculos.

À medida que a doença avança, as alterações na forma da córnea e o consequente astigmatismo irregular resultam em qualidade visual subótima com óculos, necessitando do uso de lentes de contato. No início, lentes de contato, gelatinosas ou tóricas-gelatinosas, feitas de materiais como hidrogel ou silicone-hidrogel, podem proporcionar uma visão clara, possibilitando, com vantagens, bom conforto e menor custo.

Porém, na maioria dos casos, é necessário lentes rígidas gás-permeáveis, sendo esse o tipo de lente de contato mais comumente usado. Em dois grandes estudos prospectivos e observacionais, realizados nos EUA e na Escócia, a prevalência do uso de lentes de contato rígidas gás-permeáveis foram de 65% e 91%, respectivamente.^{35,124} Vários desenhos de lentes (Super Cone, Rose K, piggyback e lentes híbridas) e opções de ajuste estão disponíveis, alcançando resultados satisfatórios. As lentes rígidas gás-permeáveis mascaram a anormalidade subjacente do formato da córnea e proporcionam uma boa troca de lágrimas, mas podem apresentar desconforto durante o uso.

O ceratocone moderado pode exigir o uso de lentes rígidas gás-permeáveis intralimbais ou lentes mini-esclerais, e casos muito avançados, com cones grandes e descentralizados, olho seco ou desconforto com lentes convencionais, podem ser corrigidos com o uso de lentes esclerais.^{105,125}

Em pacientes com ceratocone progressivo, córnea transparente e com a espessura mais fina >400 microns, o uso do cross-linking corneano (CXL) pode reduzir o risco de progressão. Vários estudos, de longo prazo, relataram melhoria na acuidade visual, bem como nos parâmetros topográficos.^{54,126,127} Esse procedimento será descrito com maiores detalhes em um tópico específico abaixo.

Nos últimos anos, em pacientes intolerantes ao uso de lentes de contato, e com progressão da doença, têm-se aplicado o uso do Ceratectomia Fotorefrativa Guiada por Topografia (T-PRK) com cross-linking adjuvante, em vez de apenas CXL. O CXL interrompe a progressão, mas não aborda o problema da intolerância às lentes de contato. Com o T-PRK, há regularização da córnea, permitindo que o paciente tenha melhor qualidade de visão com a utilização da correção (óculos ou lente de contato).^{128,129} Pacientes com ceratocone precoce a moderado e uma paquimetria pré-operatória de 450 μm (após debridamento epitelial), ou uma paquimetria pós-operatória prevista de, pelo menos 400 μm , podem ser considerados para o uso do T-PRK.¹²⁸ O ideal é que o CXL seja feito na mesma sessão, imediatamente após o T-PRK, pois causa menor haze pós-operatório.¹³⁰

Embora o T-PRK, associado ao CXL, tenha sido utilizado para correção refrativa em pacientes com ceratocone frusto; em pacientes com diagnóstico estabelecido, seu objetivo principal é a regularização da superfície corneana, pois o CXL associado leva ao aumento da força biomecânica da córnea, medida pela histerese corneana e fator de resistência da córnea.¹³¹

Em pacientes com doença moderada-avançada, a implantação de anel intraestromal corneano segmentar (ICRS) é uma opção viável de tratamento, se possuem espessura corneana de >450 microns nos 6 mm centrais na tomografia.¹³³ O ICRS pode reduzir a curvatura da córnea e diminuir astigmatismo irregular melhorando a acuidade visual.¹³⁴⁻¹³⁶ Os anéis são implantados em um canal confeccionado manualmente, ou utilizando-se um laser de femtossegundo, inserindo-se o anel no eixo mais curvo evidenciado na topografia.¹³⁷ Estudos mostram melhora do erro refrativo esférico e cilíndrico com redução da média dos valores ceratométricos.^{138,139}

Em relação ao transplante de córnea (ceratoplastia) no ceratocone, indicações geralmente aceitas são baixa acuidade visual com lentes de contato, intolerância ou incapacidade de adaptação às lentes de contato e hidropsia corneana não-resolvida. A porcentagem de pacientes com ceratocone eventualmente necessitando de transplante, varia amplamente em diferentes relatos.¹⁴⁰⁻¹⁴² Um grande estudo, multicêntrico prospectivo longitudinal de avaliação de ceratocone, relatou uma taxa de 12% de transplante durante um período de acompanhamento de 8 anos. Idade menor, ceratometria mais curva, pior acuidade visual, cicatrizes na córnea, desconforto com uso das lentes de contato e pior qualidade de vida relacionada à visão foram identificados com maior probabilidade de ceratoplastia.¹⁴²

Por algumas décadas, a ceratoplastia penetrante tem sido usada, com sucesso, na reabilitação visual no ceratocone. Resultados visuais e refrativos razoavelmente bons, com baixas taxas de complicações, têm sido consistentemente relatados.¹⁴³⁻¹⁴⁶ O ceratocone está entre as melhores indicações para a realização de uma ceratoplastia penetrante, com taxas de sobrevida do enxerto a longo prazo, superando as de qualquer outra indicação.¹⁴⁶⁻¹⁴⁸

Já ceratoplastia lamelar, com uso de microcerátomo, foi tentada com graus variados de sucesso. Essa técnica demonstra resultados ópticos e refrativos comparáveis à ceratoplastia penetrante, sem o risco de rejeição endotelial.¹⁴⁹ Nos últimos anos, a ceratoplastia lamelar anterior profunda (DALK) emergiu como uma alternativa atraente à ceratoplastia penetrante. Ao contrário da ceratoplastia penetrante, o DALK não é um procedimento de substituição corneana de espessura total. O epitélio e estroma da córnea hospedeira são removidos, preservando assim o endotélio nativo, evitando o risco de rejeição do enxerto endotelial e melhorando sua sobrevivência.¹⁵⁰ Embora, atualmente, não esteja disponível um estudo de acompanhamento a longo prazo para o DALK, as comparações indicam que os resultados são semelhantes à ceratoplastia penetrante em termos de acuidade visual e astigmatismo, com cerca de 80% dos pacientes atingindo uma acuidade visual melhor, corrigida de 20/40 ou mais, na maioria das séries.¹⁵¹⁻¹⁵⁷

1.2 CROSS-LINKING CORNEANO

O potencial da luz ultravioleta-A (UVA), em ligar/aderir tecidos, na presença do agente fotossensibilizante não tóxico riboflavina, já era conhecido há algum tempo, mas não era utilizado até 1998, quando um grupo de Dresden o sugeriu como potencial tratamento terapêutico para fortalecer o estroma corneano. O conceito foi baseado na observação de que a natural ligação cruzada de proteínas (cross-linking), que se acelera com a idade, fortalece e endurece a córnea. Com essa observação, sugeriu-se que o cross-linking artificial poderia possuir um efeito semelhante, particularmente em condições como o ceratocone, em que o colágeno, presente na córnea doente, está propenso à degradação enzimática e à alteração de suas fibras.¹⁵⁸

Existem evidências experimentais, demonstrando a formação da ligação cruzada (cross-linking) das fibras de colágeno corneanas, após o CXL: aumento de rigidez,¹⁵⁹ aumento da resistência a enzimas proteolíticas como colagenase,¹⁶⁰ redução da permeabilidade da

córnea¹⁶¹ e a formação de grandes agregados moleculares de colágeno quando examinados por eletroforese.¹⁶²

Acredita-se que o processo físico-químico do CXL, inicia-se com a excitação da riboflavina, em seus estados singlete (espécie eletronicamente excitada da molécula) e triplete (estado fundamental da molécula). Dois mecanismos são propostos, um dos quais (Tipo I) é favorecido pelas baixas concentrações de oxigênio, produzindo íons radicais; e o segundo (Tipo II) em que a riboflavina excitada reage com o oxigênio para produzir moléculas de oxigênio singlete(¹O₂).²² Sob condições aeróbicas, que ocorrem durante a exposição inicial de 15 segundos da UVA, ocorre foto-oxidação de proteínas estromais devido a sua reação com espécies reativas de oxigênio como o ¹O₂ (reação Tipo II).¹⁶³ Após esta breve fase, o oxigênio está esgotado e a reação entre a riboflavina e as proteínas é predominantemente do Tipo I. As espécies reativas podem, em princípio, induzir o cross-linking covalente de muitas moléculas diferentes, incluindo, no estroma da córnea, colágenos, proteoglicanos, DNA e RNA. Lesões, nos ácidos nucleicos, são citotóxicos e levam à apoptose dos queratócitos e, a menos que sejam tomadas precauções, também às células endoteliais. A riboflavina é crucial para o processo. Aplicada ao estroma anterior, induz as ligações cruzadas absorvendo, ao mesmo tempo, a radiação ultravioleta (em teoria) impedindo danos às camadas posteriores da córnea.^{162,164}

Atualmente, ainda não se tem conhecimento exato sobre o que seja a natureza das ligações cruzadas e precisamente onde elas ocorrem dentro da matriz extracelular. Grupos carbonila e amina livre são comumente envolvidos em processos de cross-linking. Um estudo de McCall et al.¹⁶⁵ mostrou que, após CXL, cross-linking baseado em carbonil domina na córnea, com relativamente pouco cross-linking de grupos amina livres. Esse tipo de ligação cruzada pode envolver aminoácidos como histidina, hidroxiprolina, hidroxilisina, tirosina e treonina,¹⁶⁵ mas os exatos aminoácidos envolvidos neste cross-linking e suas localizações moleculares, ainda precisam ser determinados.

Os constituintes da córnea envolvidos no cross-linking também são desconhecidos.

Teoricamente, pode ocorrer não apenas entre moléculas de colágeno, mas também entre colágenos e proteínas proteoglicas. Zhang et al.¹⁶⁶ avaliaram as interações entre os vários constituintes da matriz extracelular, isoladamente e dentro do tecido. Seus resultados demonstraram que o colágeno não somente se ligava a si próprio, mas também a duas proteínas da estrutura dos proteoglicanos - mimecan e decorina. As proteínas do núcleo

poderiam se ligar a si mesmas, mas os glicosaminoglicanos sulfatados (sulfato de queratano e sulfato de condroitina) não estavam envolvidos na ligação cruzada. Além disso, ficou demonstrado que o cross-linking predomina dentro e entre as moléculas nas superfícies das fibrilas e dentro das proteínas do núcleo proteoglicano no espaço interfibrilar.⁸⁸ Neste último caso, pode ser que o termo “cross-linking do colágeno”, tão freqüentemente usado para descrever o CXL, seja de fato uma descrição incompleta do mecanismo.

Estudos do efeito do tratamento com CXL demonstram o aumento significativo da rigidez da córnea imediatamente após o tratamento.¹⁵⁹ O analisador de resposta ocular (ORA; Ocular Response Analyzer) fornece duas medidas, *in vivo*, das propriedades biomecânicas da córnea: a histerese (capacidade viscoelástica de amortecimento da córnea) e fator de resistência da córnea (resistência viscoelástica da córnea à deformação). Esses parâmetros têm valores mais baixos em pacientes portadores de ceratocone e parecem inalterados após o CXL.¹⁶⁷

Os efeitos do CXL nas várias estruturas do estroma corneano, foram estudados por várias técnicas de imagem, *in vivo* e *ex vivo*. A microscopia confocal revelou uma área altamente organizada de compactação dos feixes das fibras de colágeno após o uso do CXL.¹⁶⁸ Estudos com microscópio de transmissão de elétrons mostraram que houve um aumento de 12% nos diâmetros das fibras de colágeno estruturais do estroma anterior, fornecendo evidências diretas de que as próprias fibrilas de colágeno estão envolvidas no processo de cross-linking.¹⁶⁹

Uma grande preocupação, ao irradiar a córnea com UVA, são os aspectos de segurança associados e os possíveis efeitos colaterais do uso da radiação UVA nas estruturas oculares. A maioria dos estudos sobre segurança do procedimento abrange a fototoxicidade na estrutura corneana, especificamente, ao estroma e endotélio.

Os estudos originais sobre os efeitos da irradiação nos queratócitos estromais, utilizados em culturas celulares, tratadas com solução de riboflavina a 0,025% e diversos níveis de irradiâncias UVA, apresentaram nível citotóxico a $0,5\text{mWcm}^{-2}$, porém quando a riboflavina não foi utilizada, a citotoxicidade se apresentou em níveis 10 vezes menor.¹⁷⁰ Estudos, *in vitro*, de cultura de células, demonstraram que a citotoxicidade endotelial ocorre no comprimento de onda de 370 nm, com nível de irradiância próximo a $0,36\text{mWcm}^{-2}$.

Para a proteção das células endoteliais, há necessidade de se quantificar a radiação que penetra no estroma e fazer, por sua vez, a medição cuidadosa do coeficiente de absorção e dos efeitos da riboflavina. Esse parâmetro foi medido em córneas humanas doadoras com e sem riboflavina. A riboflavina levou a um aumento de 50% na absorvância após 30 minutos,¹⁷¹ com coeficiente de absorvância de $56,36 \pm 4,80 \text{ cm}^{-1}$. Esse nível de absorvância foi calculado para produzir um valor de irradiância UVA a uma profundidade de $400 \mu\text{m}$ de $0,18 \text{ mWcm}^{-2}$, que é menos da metade do nível tóxico¹⁷² e, por esse motivo, foi-se estabelecido que o valor máximo de espessura da córnea, que pode ser tratada por esse método, seja de $400 \mu\text{m}$.

Outro motivo de preocupação é a possibilidade de que o limbo corneano, no qual residem as células-tronco epiteliais, possa ser danificado durante o CXL. Um ensaio clínico prospectivo não randomizado não encontrou nenhum dano ao limbo¹⁷³, porém outro estudo, in vitro, demonstrou citotoxicidade e redução da expansão celular de células epiteliais limbais humanas após exposição à riboflavina/UVA.¹⁷⁴ Portanto, como uma proteção adicional, é aconselhável o uso de anéis de polimetacrilato ou outras formas de mascaramento para garantir proteção limbal absoluta, particularmente em pacientes pouco colaborativos, que não conseguem manter fixação adequada durante o procedimento.¹⁷⁴

Os nervos da córnea são danificados durante a CXL, principalmente, como consequência do processo de remoção epitelial. Imediatamente após o CXL, as fibras nervosas do plexo subepitelial e estroma anterior/médio desaparecem. Em humanos e coelhos, a regeneração dessas fibras nervosas ocorre após cerca de 6 meses¹⁷⁵ e a estrutura do plexo após 1 ano.¹⁷⁵

Sabe-se que a exposição direta, sem proteção, à luz UVA e outros comprimentos de onda, pode produzir citotoxicidade no segmento posterior, especificamente na retina.¹⁷⁶ A maculopatia fototóxica, por exemplo, é uma anormalidade retiniana que geralmente afeta pacientes após realizarem atividades como olhar diretamente para um eclipse solar ou utilizar solda de metais sem proteção; também pode ocorrer durante acidentes envolvendo ponteiros a laser ou mesmo após cirurgia ocular devido a uma reação fotoquímica nos fotorreceptores retinianos. Esses pacientes podem apresentar escotoma paracentral, metamorfopsia ou perda de visão leve a moderada após a exposição.¹⁷⁷⁻¹⁷⁹

Os mecanismos, pelos quais a luz pode causar danos à retina, são fototérmicos, fotomecânicos e fotoquímicos.¹⁸⁰⁻¹⁸² Ocorrem danos fototérmicos através da transferência de energia radiante (um fóton) da luz para o tecido da retina, e exemplos comuns incluem termoterapia

transpupilar, fotocoagulação a laser e laser de diodo. Dano fotomecânico refere-se a dano tecidual resultante de forças mecânicas, compressivas ou de tração, geradas pela rápida introdução de energia, como a causada pelo laser Nd: Yag. Os danos fotoquímicos são independentes dos danos mecânicos e térmicos, e esses tipos de danos ocorrem após a exposição à luz UV ou do uso clínico da terapia fotodinâmica (PDT).¹⁸³

Já a luz UVA é potencialmente mais perigosa para a retina do que outros comprimentos de onda.^{184,185} Embora as estruturas anteriores do olho absorvam grande parte do componente UV do espectro de radiação, uma porção da banda UVA (315-400 nm) penetra na retina. Fontes naturais, como o sol, emitem fótons UV em durações relativamente longas que normalmente não resultam em confinamento de energia e, embora não produzam danos térmicos ou mecânicos, são capazes de induzir a danos fotoquímicos. Os danos fotoquímicos ocorrem através dos mecanismos do Tipo 1 (reações diretas envolvendo transferências de prótons ou elétrons) e do Tipo 2 (reações que envolvem espécies reativas de oxigênio).¹⁷⁶

Dessa maneira, há racionalidade na suspeita às estruturas oculares posteriores durante o procedimento de CXL. Embora estudos, *in vitro*, tenham demonstrado que o efeito protetor da riboflavina limita a transmissão da radiação nas estruturas oculares internas, poucos estudos, *in vivo*, foram realizados para avaliar alterações morfológicas da retina após a exposição UVA-riboflavina durante o CXL, e nenhum estudo foi encontrado na literatura sobre alterações funcionais da retina.^{179,186,187}

A literatura carece de consenso sobre quando o tratamento com CXL deva ser indicado; as recomendações, geralmente, dependem de protocolos regionais. A maioria dos profissionais, no entanto, usa parâmetros de ceratometria e acuidade visual como critério.

Baseado em estudos que demonstraram que pacientes com indicação de CXL, com uma ceratometria pré-operatória acima de 58 D, apresentam maior risco de progressão contínua do ceratocone, e que pacientes com idade superior a 35 anos, com acuidade visual corrigida no pré-operatório melhor que 20/25, possuem maior risco de complicações (perda de duas ou mais linhas de Snellen). Observou-se que, ao se restringirem os critérios de elegibilidade a pacientes com idade menor de 35 anos e com um limite máximo de leitura ceratométrica inferior a 58 D, a frequência de complicações e falhas poderão ser reduzidas a menos de 1%.¹⁸⁸

Como a progressão do ceratocone é mais frequente e mais rápida em pacientes com menos de 18 anos de idade do que em pacientes idosos, além de possuírem maior probabilidade de culminar na necessidade de um transplante de córnea; recomenda-se que o CXL seja a terapia de primeira escolha ao ceratocone progressivo, em pacientes com menos de 26 anos de idade, desde que se respeitem todos os critérios de indicação de segurança para o tratamento.^{189,190}

Baseado nos estudos de Santhiago MR,¹⁹¹ a maioria dos centros especializados no Brasil realiza o tratamento com CXL, em pacientes portadores de ceratocone com progressão determinada, pelos seguintes critérios:

- Aumento de, pelo menos, 1 dioptria (D), nos parâmetros ceratométricos, em 12 meses;
- Aumento de, pelo menos, 0.75D, nos parâmetros ceratométricos, em 6 meses;
- Aumento da miopia de 0.75D, em 12 meses, em refração sob cicloplegia;
- Perda de, pelo menos, duas linhas de visão, na melhor visão corrigida em 12 meses.

Os mesmos critérios são utilizados para se determinar falha ou progressão pós-CXL e, nesse caso, se optar pelo re-tratamento ou outra modalidade terapêutica.

Embora o CXL não seja recomendado em pacientes com córnea de espessura inferior a 400 μm (devido ao risco de dano endotelial, como descrito anteriormente), em alguns casos, uma solução hipotônica de riboflavina pode ser usada para aumentar o estroma pré-operatório em córneas finas e permitir que o CXL seja realizado.¹⁹²

Outra contra-indicação postulada para o CXL é história prévia de cirurgia refrativa incisional (como ceratotomia radial ou ceratotomia astigmática), pois as alterações pós-CXL, no estroma corneano, podem causar ruptura das incisões da ceratotomia.¹⁹³

Difícilmente, o CXL beneficiará pacientes com opacidade central da córnea associada à baixa acuidade visual corrigida; sendo assim, outras opções de tratamento (por exemplo, transplante de córnea) devem ser consideradas para esses casos.¹⁹³

O olho seco grave é outra contra-indicação, pois pode dificultar a re-epitelização e aumentar o risco de infecção pós- cirúrgica; essas condições devem ser gerenciadas com plugs de ponto lacrimal e lubrificantes artificiais antes de se considerar o CXL.¹⁹³ Isso também se aplica a

pacientes com ceratoconjuntivites alérgicas, em que o tratamento pré-operatório, com esteróides tópicos e até imunossuppressores sistêmicos, deve ser considerado para garantir que a doença atópica conjuntival esteja em remissão completa antes do procedimento.¹⁹⁴

O protocolo do procedimento de CXL padrão (standard), descrito para o tratamento do ceratocone, envolve anestesiá-lo o olho (por exemplo, com gotas de 0,5% de cloridrato de proximetacaína) sob condições estéreis e remover a parte central de 7 a 9 mm do epitélio. Uma solução de riboflavina (riboflavina-5-fosfato a 0,01% com dextrano T-500 a 20%) é então aplicada à superfície da córnea a cada 5 minutos, por 30 minutos, antes da irradiação; e a intervalos de 5 minutos, durante a exposição de 30 minutos, a 370 nm de radiação UVA, calibrada antes da cirurgia com um medidor de luz UV a 3mWcm^2 . O comprimento de onda de 370 nm foi determinado, porque corresponde ao pico de absorção da riboflavina, e a irradiância de 3mWcm^2 foi selecionada para evitar possível overdose de UV.^{22,195} O objetivo da remoção do epitélio é permitir a penetração da riboflavina que, caso contrário, seria impedida pelas junções estreitas das células epiteliais.¹⁹⁶

Após o tratamento, são aplicados colírios antibióticos e adicionada lente de contato terapêutica, com boa transmissibilidade de oxigênio, para diminuir a dor, sem impedir o processo de re-epitelização do epitélio remanescente.¹⁹³ A aplicação de antibióticos tópicos é necessária, por 1 semana, após a operação, associados ou não a esteróides leves. A regressão total do desconforto ocular ocorre dentro de 5 a 7 dias quando a lente de contato é removida.¹⁹³ Os pacientes são, tipicamente, revistos nos dias 1 e 5 e novamente nos meses 1, 6 e 12 após a cirurgia.¹⁹⁷

Além da dor e potencial perda visual, nos primeiros dias de pós-operatório, causadas pela remoção epitelial, outras complicações potenciais do CXL foram relatadas, algumas temporárias e outras não. Estima-se que a re-epitelização requeira, pelo menos, de quatro dias para ser concluída e até três meses para a melhoria qualitativa do mosaico de células epiteliais em comparação com o pré-operatório.¹⁷³

O haze estromal (“névoa”), normalmente, se desenvolve durante as primeiras semanas ou meses após a cirurgia, o que pode resultar em deterioração visual transitória de uma acuidade visual já comprometida,¹⁷³ sendo seu pico de presença em 1 mês pós-CXL, platô aos 3 meses, para depois diminuir significativamente entre 3 e 12 meses.¹⁹⁸ Essa névoa possui um perfil

espacial característico; em um mês é observada mais pronunciada no estroma superficial, diminuindo, gradualmente, para zero a 240 μ m mais presente no centro do que a 1-3 mm dele.¹⁹⁹ Haze corneano permanente (levando a uma perda de duas ou mais linhas de acuidade visual corrigida) foi descrito em, aproximadamente, 8,6% de todos os olhos tratados.²⁰⁰

Como o CXL envolve desepitelização seguida geralmente pela aplicação de uma lente de contato terapêutica, sempre há o risco de infecção. Há vários estudos de caso relatando o desenvolvimento de ceratite,²⁰¹⁻²⁰⁴ além de casos commelting (“derretimento”) de córnea frequentemente associados às infecções.^{205,206}

2. JUSTIFICATIVAS

Baseando-se nos conceitos citados anteriormente, fica evidente que o ceratocone e suas modalidades terapêuticas, especificamente o CXL, devam ser individualizados caso a caso, levando-se em consideração as características clínicas, os sintomas, a idade e o estágio patológico de cada indivíduo portador.

Estudos mostram a eficácia e segurança do tratamento de cross-linking corneano para pacientes portadores de ceratocone;¹⁷⁰⁻¹⁷⁵ porém há grande preocupação sobre a exposição contínua à luz UVA durante o procedimento, sabendo-se da existência de patologias que acometem estruturas oculares sensíveis, como a retina, à exposição do espectro de luz UV e luzes de outros comprimentos de onda, sendo a maculopatia fototóxica (descrita em detalhes no tópico sobre segurança do CXL) um exemplo disso. Durante o tratamento utilizando-se o protocolo standard, o olho fica exposto à luz UVA (370 nm a 3mWcm²) por 30 minutos, sendo a riboflavina o único potencial filtro à passagem nociva da luz. Dessa maneira, existe racionalidade ao se levantar a hipótese de um possível dano estrutural/funcional durante o procedimento, tendo em vista a existência de potenciais lesões fototóxicas já descritas;¹⁷⁷⁻¹⁷⁹ além da exposição direta da região macular aos feixes de raios UVA emitidos pelo aparelho, devido à necessidade da fixação do olhar do paciente para a fonte luminosa com o objetivo da realização correta do tratamento.

O ceratocone acomete pacientes com idade média de 22,4 anos,⁸ possuindo expressivo número de portadores com idade abaixo de 16 anos.⁹ Tendo em vista sua maior gravidade em pacientes pediátricos,²⁵ é evidente a necessidade do diagnóstico precoce e a indicação consciente do CXL com o objetivo de estabilização de sua progressão e melhor prognóstico visual. Estudos anteriores²²³⁻²²⁴ demonstraram segurança e eficácia do CXL em pacientes pediátricos (18 anos ou menos); porém não existe consenso sobre qual a idade mínima que o portador de ceratocone pode ser submetido ao CXL, e se os resultados do tratamento, em termos de acuidade visual final e parâmetros ceratométricos, podem ser comparáveis com os grupos de pacientes mais velhos.

Dessa maneira, realizamos dois estudos para alcançar os objetivos supra-citados e, assim, reforçar a discussão da indicação do CXL, em que se deve considerar todos os possíveis efeitos colaterais existentes, descritos e recentemente descobertos, e relacioná-los com a população alvo especialmente a mais jovem, que apresenta maior gravidade e, ao mesmo tempo, candidata aos benefícios da estabilização precoce e melhores resultados prognósticos.

3. OBJETIVOS

1. Analisar possíveis efeitos colaterais, de curto prazo, do uso da luz ultravioleta (UV), durante o tratamento cross-linking corneano (CXL), em pacientes portadores de ceratocone, em outras estruturas oculares não antes estudadas, especificamente, na área macular retiniana, através do estudo das alterações vasculares, estruturais e/ou funcionais, antes e após 30 dias do tratamento com CXL.
2. Analisar o benefício da indicação e tratamento com CXL em pacientes portadores de ceratocone, com idade abaixo de 17 anos, através do estudo comparativo das características e progressão do ceratocone, após o tratamento em pacientes com 16 anos ou menos, em relação a pacientes com 17 anos ou mais de idade.

4. METODOLOGIA

4.1 Metodologia do primeiro estudo

Este estudo avaliou 17 olhos de 17 pacientes, com 16 anos de idade ou mais, diagnosticados com ceratocone e indicação de tratamento com CXL em, pelo menos, um olho. Todos os sujeitos foram avaliados no Departamento de Oftalmologia do Hospital das Clínicas da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), em Campinas, São Paulo, Brasil. O mesmo olho serviu como seu próprio controle (antes do CXL vs. depois de CXL). Os olhos foram avaliados, em termos de MAVC, erro refracional, pressão intra-ocular, biomicroscopia com lâmpada de fenda, oftalmoscopia indireta, grade de Amsler, registro de imagem do fundo de olho (retinografia), FA, AF e SD-OCT, antes do CXL, 7 e 30 dias após o procedimento. A eletrorretinografia multifocal (mfERG) foi registrada antes e 7 dias após o CXL. Foram excluídos do estudo, pacientes que apresentaram idade menor de 16 anos, alguma doença ocular que não fosse ceratocone, histórico de qualquer cirurgia oftalmológica no olho em estudo (incluindo CXL anterior), gravidez ou amamentação, ou se exibissem alguma opacidade de córnea que impedisse a visão clara da retina ou que explicasse uma perda de acuidade visual. Todos os participantes forneceram consentimento livre e esclarecido informado por escrito antes da participação; pais ou responsável legal assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido quando os indivíduos apresentaram idade menor que 18 anos. Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP) e aderiu à Declaração de Helsinque.

4.1.1 Procedimento de CXL

A fonte UVA utilizada foi um dispositivo de estado sólido (Sistema de Cross-Linking Corneano X-Link, Opto®, Brasil), consistindo em diâmetro de spot UVA, de 9 mm, com um regulador de tensão potenciométrico. Os parâmetros utilizados foram o comprimento de onda 370 nm e potência de 3 mW/cm² ou 5,4 J/cm² quando a 1,5 cm da córnea. Após a aplicação do blefarostato, um marcador (9 mm de diâmetro), foi utilizada uma espátula para remover o epitélio da córnea, em um círculo central. Uma solução fotossensibilizante (riboflavina a 0,1% - 400 MOSM, Ophthalmos®, Brasil) foi aplicada a cada 5 minutos, durante um período de 30 minutos. Logo em seguida, a riboflavina foi aplicada a cada 5 minutos, durante os 30 minutos de exposição ultravioleta. Todos os cirurgiões que realizaram o procedimento estavam no mesmo nível de habilidade. Após o tratamento, os pacientes foram medicados com antibiótico

tópico (moxifloxacina, Vigamox, Alcon®), 4 vezes ao dia e utilizaram lente de contato gelatinosa terapêutica por 5 dias.

4.1.2 Tomografia de coerência óptica

Para avaliar a anatomia da região macular da retina, foram obtidas imagens utilizando SD-OCT (Spectralis HRA®OCT; Heidelberg Engineering, Alemanha). A pupila foi dilatada com colírio de tropicamida a 1% e de fenilefrina a 10%. Os pacientes foram orientados a olhar para a luz de fixação durante o teste, e a fixação foveal foi controlada pela observação da retina através da câmera de monitoramento infravermelho. A espessura da região do anel central da mácula foi avaliada utilizando-se o padrão de escaneamento “Fast”, com estratégia de seguimento “Follow-Up”, utilizada para realizar a avaliação e comparação da mesma região macular no exame pré-CXL e pós-CXL.

4.1.3 Retinografia, Angiografia Fluoresceínica e Autofluorescência

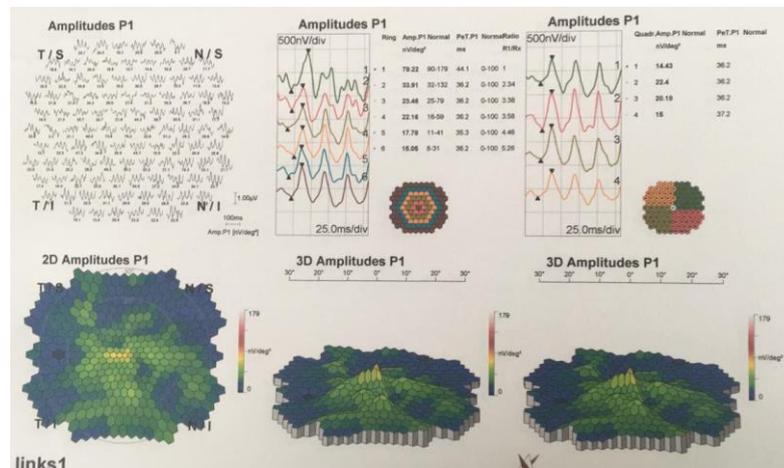
Para analisar o status vascular da retina, da mácula e do pólo posterior, foram obtidas imagens de retinografia, FA e AF utilizando um dispositivo de imagem de fundo (Visucam® NM/FA; Carl Zeiss Meditec AG; Alemanha). A pupila foi dilatada com colírio de tropicamida a 1% e de fenilefrina a 10%; uma solução de fluoresceína sódica a 10% foi administrada por via intravenosa, em bolus, na dose de 7,7 mg/kg, obtendo-se fotografias seriadas da retina durante 15 minutos.

4.1.4 ERG multifocal

O sistema Roland RETI-port/scan 21 system® (Roland Consult, Alemanha) foi utilizado para medir o mfERG de acordo com o protocolo da Sociedade Internacional de Eletrofisiologia Clínica da Visão (ISCEV). A pupila foi dilatada com colírio de tropicamida a 1% e de fenilefrina a 10%, e a córnea foi anestesiada com tetracaína a 0,5%. O olho contra-lateral foi ocluído com uso de tampão ocular. Os indivíduos foram orientados a fixar a visão na cruz central. Solicitou-se aos pacientes, com baixa acuidade visual, que se fixassem firmemente no centro da tela. Eletrodos HK-Loop foram usados, como eletrodos ativos, para se obter os sinais de mfERG. Os eletrodos neutros e de referência foram montados no canto central frontal e no canto externo, respectivamente. O processo de gravação levou aproximadamente 10 minutos, período durante o qual as linhas de fixação cruzadas foram exibidas na tela. Repetia-se o procedimento caso houvesse artefatos como piscar de olhos ou movimentos oculares. O estímulo, que consistia em 103 hexágonos, cobrindo um campo visual de 30°, foi

apresentado em um monitor colorido de alta resolução (monitor PC-System 21", com luminância média de 180 cd/m², e alto contraste). A distância entre os olhos e o monitor era de 33 cm, o que correspondia a um campo estimulado de $\pm 30^\circ$ na horizontal e $\pm 24^\circ$ na vertical. Os 30° centrais da retina foram estimulados por hexágonos oscilantes independentes, pretos e brancos, em uma sequência binária pseudo-aleatória. O tamanho do hexágono foi estipulado, com excentricidade, para evocar respostas focais com aproximadamente a mesma amplitude nas matrizes de resposta. Cada registro foi coletado em 5 segmentos com duração de 45 segundos. Cada sequência durou 16,6 ms e foi seguida por um intervalo de descanso de 66,4 ms, antes que a próxima sequência ativa fosse iniciada. De acordo com as excentricidades, as amplitudes e latências foram avaliadas em cinco regiões retinianas do anel. Os componentes de resposta do mfERG de primeira ordem foram analisados. A densidade de resposta média da amplitude P1 (amplitude por unidade de área da retina [nV/deg²]) e da latência média (milissegundos) foi determinada (Figura 9). Selecionamos os cinco hexágonos mais centrais para coletar as respostas centrais do mfERG, que foram calculadas para a análise. Os exames mfERG foram realizados antes e 7 dias após o procedimento CXL.

Figura 9. mERG com mapas de amplitude P1 e valores de latência P1.



Fonte: Dr. Paulo Rodolfo Tagliari Barbisan

4.1.5 Análise Estatística

Os dados foram analisados usando o software GraphPad Prism, versão 7.0a. Foi realizada análise estatística descritiva e as distribuições foram resumidas utilizando-se proporções e médias \pm desvio padrão. O teste omnibus D'Agostino-Pearson foi usado para confirmar a normalidade dos dados. Os dados sobre as características clínicas dos pacientes foram

analisados utilizando-se o teste t pareado. O teste t pareado também foi utilizado nos dados de amplitude e latência de P1 antes e depois da CXL. A análise de correlação e regressão também foi realizada com base na latência de P1. Um nível de significância de $p < 0,05$ foi estabelecido para todas as análises.

4.2 Metodologia do segundo estudo

Este estudo retrospectivo incluiu dados de 105 olhos, de 94 pacientes diagnosticados com ceratocone, entre 2016 e 2018, nos quais o tratamento com CXL havia sido indicado para, pelo menos, um olho. Todos os sujeitos foram avaliados no Departamento de Oftalmologia do Hospital das Clínicas da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), no Brasil. Os pacientes foram divididos por idade, em dois grupos: o Grupo 1 (16 anos ou menos de idade) foi classificado como intervenção precoce; e o Grupo 2 (17 anos ou mais de idade) classificado como intervenção tardia. Os olhos foram avaliados em termos de MAVC, erro de refração, densidade celular endotelial da córnea (DCE), paquimetria (espessura central da córnea; ECC), além de biomicroscopia com lâmpada de fenda, tonometria de Goldmann, topografia (parâmetros Kmax, Ksteep e Kflat), antes do CXL e depois de um, três, seis e doze meses.

Os critérios que determinaram quais pacientes receberiam o tratamento com CXL foram: aumento de pelo menos 1 dioptria nos parâmetros ceratométricos, ao longo de doze meses; aumento de, pelo menos, 0,75 dioptrias, nos parâmetros ceratométricos, ao longo de seis meses; aumento na miopia de, pelo menos, 0,75 dioptrias na refração sob cicloplegia, no período de doze meses; perda de, pelo menos, duas linhas de visão na MAVC, em doze meses.¹⁹¹ Os mesmos critérios foram utilizados para determinar a progressão ou falha após o tratamento.

Os critérios de exclusão utilizados foram: qualquer doença oftalmológica diferente do ceratocone, história de cirurgia oftalmológica (incluindo CXL anterior), gravidez ou lactação e falta de cooperação do paciente durante o procedimento. Todos os participantes assinaram um termo de consentimento livre e esclarecido antes da participação. Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos, da Universidade Estadual de Campinas e aderiu à Declaração de Helsinque.

4.2.1 Densidade Celular Endotelial da Córnea

A DCE foi medida utilizando um microscópio especular de não-contato (Tomey EM-3000®, Aich, Japão). O método central foi utilizado para a contagem de células e os parâmetros foram medidos automaticamente com o software integrado (Tomey Inc., Erlangen / Alemanha). Três campos centrais foram contados e a média dessas contagens foi utilizada como DCE.

4.2.2 Ceratometria e Paquimetria

A Ceratometria e a Paquimetria foram medidas em todos os olhos estudados utilizando o sistema de imagem Pentacam® rotativo Scheimpflug (Oculus Optikgeräte GmbH, Wetzlar, Alemanha). O sistema Pentacam® utiliza uma câmera rotativa Scheimpflug e uma fonte de luz de fenda monocromática (diodo emissor de luz azul a 475 nm) que gira junto com a câmera em torno do eixo óptico do olho. Em 2 segundos, o sistema gira 180 graus e obtém 25 imagens que contêm 500 pontos de medição nas superfícies anterior e posterior da córnea para construir um verdadeiro mapa de elevação. O software fornece as imagens com os valores em volume e, assim, as projeções multiplanares permitem a criação de mapas axiais e tangenciais. Ao capturar imagens em velocidade constante, o sistema elimina vibrações e artefatos de imagem que possam ser produzidos durante a aceleração ou desaceleração. Após concluir a digitalização, o software cria uma imagem tridimensional do segmento anterior, incluindo superfícies corneanas anterior e posterior, superfícies do cristalino e suas opacidades. Neste estudo, os valores de Ceratometria (máxima, mais curva e mais plana) e os dados de ECC foram gerados pelo sistema de imagem Pentacam®.

4.2.3 Análise Estatística

Os dados foram analisados utilizando o software GraphPad Prism, versão 7.0a. Foi realizada análise estatística descritiva e as distribuições foram resumidas usando proporções e médias \pm desvio padrão. Usamos o teste omnibus D'Agostino-Pearson para confirmar a normalidade dos dados. Os dados clínicos do paciente foram analisados pelo teste t pareado. Os valores de razão do teste t pareado foram utilizados para comparar os dados pré e pós-CXL (medidos com doze meses de intervalo). O nível de significância foi estabelecido em $p < 0,05$ para todas as análises.

5. RESULTADOS

Os resultados desta tese são apresentados em dois artigos, que se encontram transcritos a seguir:

Artigo 1 – “*Macular Phototoxicity after Corneal Cross-Linking.*”

Publicado no periódico “*ClinicalOphthalmology*” (Setembro de 2018, Volume 12, Páginas 1801–1807) - Qualis B2

Artigo 2 – “*Corneal Cross-Linking in Young Patients for Progressive Keratoconus.*”

Publicado no periódico “*Cornea*” (Fevereiro de 2020, Volume 39, Série 2, Páginas 186–191) - Qualis B1

Artigo 1

Macular Phototoxicity after Corneal Cross-Linking

Paulo Rodolfo Tagliari Barbisan¹, Marina Gonçalves Monteiro Viturino¹, Fernanda Maria Silveira Souto¹, Bo Tian^{2,3}, Roberto Damian Pacheco Pinto¹, Lucas Barasnevicius Quagliato¹, Maurício Abujamra Nascimento¹, Rosane Silvestre de Castro¹, Carlos Eduardo Leite Arieta¹.

¹Department of Ophthalmology, State University of Campinas, Campinas, **São Paulo, Brazil.**

²Angiogenesis Laboratory, Department of Ophthalmology, Massachusetts Eye and Ear Infirmary, Harvard Medical School, Boston, MA, United States.

³Department of Ophthalmology & Visual Sciences, University of Massachusetts Medical School, Worcester, MA, United States.

Publicado no periódico “*ClinicalOphthalmology*” (Setembro de 2018, Volume 12, Páginas 1801–1807) - Qualis B2

The authors report no conflicts of interest in this work.

ABSTRACT

Purpose: To assess potential vascular, structural and functional changes to the macula in patients with keratoconus that underwent ultraviolet A (UVA)-riboflavin mediated corneal collagen cross-linking (CXL) therapy.

Patients and Methods: Seventeen eyes from 17 patients 16 years of age or older with keratoconus undergoing CXL treatment. The same eye served as its own control (before CXL vs. after CXL). Eyes were evaluated in terms of best corrected visual acuity (BCVA), refractive error, intra-ocular pressure, Amsler grid, retinography, fluorescein angiography (FA), autofluorescence (AF), and spectral domain optical coherence tomography (SD-OCT) prior to CXL and 7 and 30 days after treatment. Multifocal electroretinography (mfERG) was recorded prior to and 7 days after CXL.

Results: Mean (SD) BCVA by logMAR chart was 0.47 (\pm 0.12) pre-CXL, 0.55 (\pm 0.15) 7 days post-CXL ($p=0.57$), and 0.46 (\pm 0.10) 30 days post-CXL ($p=0.87$). Mean (SD) SD-OCT central macular thickness (μ m) was 253.62 (\pm 20.9) pre-CXL, 260.5 (\pm 18.7) 7 days post-CXL ($p=0.48$), and 256.44 (\pm 21.6) 30 days post-CXL ($p=0.69$). In 12 eyes, mfERG revealed a statistically significant increase ($p=0.0353$) in P1 latency (ms) of ring 4 from the pre-CXL period (39.45 ± 2.05) to 7 days post-CXL (41.04 ± 1.28). Regression analysis showed that the increase in P1 latency was correlated with the increase in central macular thickness ($p=0.027$). Furthermore, 9 patients experienced a significant decrease in P1 amplitudes of rings 1 ($p=0.0014$), 2 ($p=0.0029$), 3 ($p=0.0037$), 4 ($p=0.0014$) and 5 ($p=0.0012$) from pre-CXL to 7 days post-CXL.

Conclusion: In this pilot study, most of the patients exhibited slight changes in their mfERG parameters and OCT thickness, despite a lack of vascular abnormalities observed on FA/AF imaging, no alteration in BCVA and no reports of symptoms. These changes could therefore be categorized as a mild sub-clinical effect of the corneal cross-linking procedure.

Keywords: keratoconus, light damage, multifocal electroretinogram, UVA.

INTRODUCTION

Keratoconus is a bilateral and noninflammatory corneal degenerative disorder distinguished by paracentral corneal thinning and secondary ectasia. It results in irregular astigmatism with impaired vision. The disease occurs in all racial groups, equally affects males and females, and is often asymmetrical. Onset is typically at puberty and is progressive until the third to fourth decade of life. The etiology is not fully understood, and several different biochemical, physical, and genetic pathways have been implicated. The condition itself is a common final pathway for several different diseases.^{1,2} The reported prevalence and incidence vary, but a recent study calculated an annual incidence of 1:7500 (13.3 cases per 100,000) and an estimated prevalence of 1:375 (265 cases per 100,000).³

Keratoconus management depends on the severity of the disease and the extent of irregular astigmatism. Eyeglasses, toric lenses, and rigid gas permeable lenses are treatment options for mild to moderate cases.^{2,4} Surgery (typically keratoplasty) becomes necessary when the disease progresses and in cases of contact lens intolerance, corneal scarring, and corneal thinning.^{2,5} However, none of these approaches treat the underlying causes of keratoconus or halt its progression.

Corneal collagen cross-linking (CXL) is a strengthening technology that alters the collagen matrix of the corneal stroma by creating riboflavin ultraviolet A (UVA)-induced crosslinks.^{6,7} Riboflavin-catalyzed reactions generate free radicals that promote new collagen fibril bonds to a depth of approximately 200 to 300 μm and prevent further thinning of the corneal stroma by increasing the mechanical and biochemical rigidity and stability of stromal tissue.⁶⁻⁹ CXL has been found to be effective in the stabilization of moderate corneal ectasia, in decreasing maximum keratometry, and in improving best corrected visual acuity (BCVA).^{2,6,9,10} Numerous clinical studies have confirmed its efficacy in halting or aiding in the regression of keratoconus.^{2,6,9,10}

Phototoxic maculopathy (PM) is a retinal abnormality that generally affects patients after they engage in activities such as looking directly at a solar eclipse or welding without protection; it may also occur during accidents involving laser pointers or even after ocular surgery due to a photochemical reaction in light receptors. These patients may experience paracentral scotoma, metamorphopsia, or slight to moderate vision loss after exposure.^{11,12,13} The mechanisms by which light can cause damage to the retina are photothermal, photomechanical, and photochemical.^{14,15,16} Photothermal damage occurs through the transfer

of radiant energy (a photon) from light to the retinal tissue, and common examples include transpupillary thermotherapy, laser photocoagulation, and micropulse diode laser. Photomechanical damage refers to tissue damage resulting from mechanical, compressive, or tensile forces generated by the rapid introduction of energy, such as that which is caused by the Nd:Yag laser. Photochemical damage to the retina is independent of mechanical and thermal retinal damage, and this type of damage occurs after UV light exposure or the clinical use of photodynamic therapy (PDT).¹⁷ UVA is potentially more hazardous to the retina than other wavelengths.^{18,19} Its use during the CXL procedure raises concerns over potential damage to ocular structures and to the retina in particular.

Combined UVA-riboflavin treatment is known to cause endothelial toxicity in thin corneas (< 400 μm) when the standard surface irradiation of 3 mW/cm is used.^{2,6,20,21} Although in vitro studies have found that the shielding effect of riboflavin limits radiant transmission to inner ocular structures, few in vivo studies have been performed to assess morphological changes to the retina after UVA-riboflavin CXL, and there seem to be no studies in the literature that have analyzed functional damage to retinal tissue.^{18,22,23}

The objective of this study is to assess potential vascular, structural, and functional changes to the macula in patients with keratoconus after UVA-riboflavin CXL therapy.

MATERIALS AND METHODS

This study evaluated 17 eyes from 17 patients who were 16 years of age or older, who had been diagnosed with keratoconus, and for whom treatment with corneal cross-linking had been indicated for at least one eye. All subjects were assessed in the Department of Ophthalmology of the Clinical Hospital of the State University of Campinas (UNICAMP) in Campinas, São Paulo State, Brazil. The same eye served as its own control (before CXL vs. after CXL). Eyes were evaluated in terms of BCVA, refractive error, and intra-ocular pressure and using slit lamp biomicroscopy, indirect ophthalmoscopy, the Amsler grid, color fundus imaging (retinography), FA, AF and spectral domain optical coherence tomography (SD-OCT) prior to CXL and 7 and 30 days after the procedure. Multifocal electroretinography (mfERG) was recorded prior to and 7 days after CXL.

Patients were excluded if they were younger than 16 years of age, if they had any eye disease other than keratoconus, if they had a history of any ophthalmologic surgery in the eye

being studied (including previous corneal cross-linking), if they were pregnant or breastfeeding, or if they exhibited any corneal opacity that would prevent clear vision of the retina or which would explain a loss of visual acuity. All participants provided informed written consent before participation; a parent or legal guardian signed the informed consent form when subjects were younger than 18 years of age. This study was approved by the Ethics Committee for Research on Human Subjects of the State University of Campinas (UNICAMP) and adhered to the Declaration of Helsinki.

Corneal Cross-Linking Procedure

The UVA source was a solid-state device (X-Link Corneal Crosslinking System, Opto®, Brazil) consisting of a 9 mm UVA array with a potentiometric voltage regulator. Wavelength was 370 nm, and power was 3 mW/cm² or 5.4 J/cm² when 1.5 cm from the cornea. After applying the blepharostat, a marker (9 mm in diameter) was used to remove the corneal epithelium in a central circle with a blunt spatula. A photosensitizing solution (0.1% riboflavin—400 MOSM, Ophthalmos®, Brazil) was applied every 3 minutes over a 30-minute period. Riboflavin was applied every 3 minutes during the 30 minutes of ultraviolet exposure. All of the surgeons who performed the procedure were at same skill level. After treatment, patients were medicated 4 times per day with a topical antibiotic (moxifloxacin, Vigamox, Alcon®), and the eye was dressed with a soft therapeutic contact lens for 5 days.

Optical Coherence Tomography

To evaluate the anatomy of the macular region of the retina, SD-OCT imaging was performed using a spectral domain device (Spectralis HRA®OCT; Heidelberg Engineering, Germany). The pupil was dilated using 1% tropicamide and 10% phenylephrine drops. Patients were asked to gaze at the fixation light during the test, and foveal fixation was controlled by observing the retina through the infrared monitoring camera. Thickness of the macula region in the central ring was calculated using the retinal mapping software.

Retinography, Fluorescein Angiography, and Autofluorescence

In order to perform retina imaging and analyze the retinal vascular status of the macula and posterior pole of the retina, retinography and FA images were obtained using a fundus imaging device (Visucam® NM/FA; Carl Zeiss Meditec AG; Germany). The pupil was dilated using 1% tropicamide and 10% phenylephrine drops. AF images were obtained using the same device. Finally, a 10% solution of sodium fluorescein dye was administered intravenously as a bolus at a dose of 7.7 mg/kg, and serial retinal photographs were taken for 15 minutes.

Multifocal ERG

The Roland RETI-port/scan 21 system® (Roland Consult, Germany) was used to measure mfERG in accordance with the International Society for Clinical Electrophysiology of Vision (ISCEV). The pupil was dilated using 1% tropicamide, and the cornea was anesthetized using 0.5% tetracaine. The fellow eye was occluded by a pad. Subjects were asked to fixate on the central cross. Patients with low visual acuity were asked to fixate steadily on the center of the screen. HK-Loop electrodes were used as active electrodes to record mfERG signals. The neutral and reference electrodes were mounted on the frontal-central canthus and the external canthus, respectively. The recording process took approximately 10 minutes, during which time cross fixation lines were displayed on the screen. The recording procedure was repeated if there were artifacts from eye blinks or if ocular movements were recorded. The stimulus, which consisted of 103 hexagons covering a visual field of 30°, was presented on a high-resolution color monitor (PC-System 21” monitor, mean luminance 180 cd/m², high contrast). The eye-to-monitor distance was 33 cm, which corresponded to a stimulated field of ±30° horizontally and ±24° vertically. The central 30° of the retina was stimulated by flickering hexagons independently between black and white in a pseudorandomized binary sequence. Hexagon size was scaled with eccentricity to evoke focal responses of approximately the same amplitude in the response arrays. Each record was collected in 5 segments and lasted 45 seconds. Every sequence lasted 16.6 ms and was followed by a rest interval of 66.4 ms before the next active sequence was initiated. According to the eccentricities, the amplitudes and latencies were evaluated in five-ring retinal regions. The first-order mfERG response components were analyzed. The mean response density of the P1 amplitude (amplitude per unit of retinal area [nV/deg²]) and mean

latency (milliseconds) were determined. We selected the five most central hexagons to collect the central mfERG responses, which were averaged for the analysis. The mfERG examinations were performed before and 7 days after the CXL procedure.

Statistical Analysis

Data was analyzed using GraphPad Prism, version 7.0a. A descriptive statistical analysis was performed, and distributions were summarized using proportions and means \pm standard deviation. The D'Agostino-Pearson omnibus test was used to confirm the normality of the data. Patients' data on clinical features were analyzed using the paired *t*-test. The paired *t*-test was also used on P1 amplitude data before and after CXL. P1 latency was analyzed using the paired *t*-test and the pre- and post-CXL data. Correlation and regression analysis were also performed based on P1 latency. A significance level of $p < 0.05$ was established for all of the analyses.

RESULTS

Seventeen eyes from 17 subjects were included in the analysis. Mean (SD) age was 22.17 (± 5) years (range 16 to 28 years). Sixty-three percent of the subjects were male. Mean (SD; Snellen) BCVA as per the logMAR chart was 0.47 (± 0.12 ; 20/59) pre-CXL, 0.55 (± 0.15 ; 20/70) 7 days post-CXL, and 0.46 (± 0.10 ; 20/57) 30 days post-CXL, with no significant differences between pre-procedure data and the data obtained 7 days after CXL ($p=0.57$) or 30 days after CXL ($p=0.87$). Mean (SD) near corrected visual acuity (Jaeger) was 2.42 (± 0.60) pre-CXL, 3.4 (± 0.63) 7 days post-CXL, and 2.58 (± 0.61) 30 days post-CXL, with no significant differences between pre-procedure data and the data obtained 7 days after CXL ($p=0.19$) or 30 days after CXL ($p=0.80$). Mean (SD) SD-OCT central macular thickness (μm) was 253.62 (± 20.9) pre-CXL, 260.5 (± 18.7) 7 days post-CXL, and 256.44 (± 21.6) 30 days post-CXL, with no significant differences between pre-procedure data and the data obtained 7 days after CXL ($p=0.48$) or 30 days after CXL ($p=0.69$; **Tables 1 and 2**). Subjects reported no changes on the Amsler grid test in the evaluations performed 7 and 30 days after CXL.

When the eyes were compared before and after the CXL treatment, there were no changes in the fundus of the eye as determined using indirect ophthalmoscopy, biomicroscopy, or retinography, nor were there any abnormalities in the macular vascularity as determined using FA, or any changes to the retinal pigment epithelium (RPE) based on AF

imaging. Though the aforementioned changes in retinal thickness were observed, the intraretinal cysts, atrophy, outer retinal abnormalities, and other anatomical changes to the macular region typically seen in phototoxicity conditions¹⁶ were not observed via SD-OCT imaging when the eyes were compared before and after the CXL treatment. Intra-ocular pressure did not increase after the procedure or during the follow-up period.

In 12 eyes, mfERG revealed a statistically significance increase ($p=0.0353$) in P1 latency (ms) of ring 4 when pre-CXL values (39.45 ± 2.05) were compared to values obtained 7 days post-CXL (41.04 ± 1.28 ; **Figure 1**). Regression analysis in which P1 latency was a dependent variable of macular thickness showed that the increase in P1 latency in these subjects (1.59 ± 0.66) was correlated with the increase in central macular thickness in the SD-OCT scan ($p=0.027$; **Figure 2 and Table 3**). Furthermore, 9 patients were found to have a significant decrease in P1 amplitudes (nV/deg²) of rings 1, 2, 3, 4, and 5 when pre-CXL values were compared to and the values from 7 days after CXL (**Figure 3 and Table 4**). Mean amplitudes in each ring (pre-CXL \pm SD, post-CXL \pm SD, p value) were: ring 1 (88.38 ± 24.65 , 56.60 ± 11.51 , 0.0014), ring 2 (45.07 ± 7.14 , 35.72 ± 7.20 , 0.0029), ring 3 (29.39 ± 3.65 , 25.15 ± 3.50 , 0.0037), ring 4 (19.55 ± 4.16 , 15.99 ± 3.09 , 0.0014) and ring 5 (13.48 ± 2.10 , 11.37 ± 2.19 , 0.0012).

DISCUSSION

Corneal collagen CXL is the only treatment that affects the progression of keratoconus and that has been found to be effective in the stabilization of moderate corneal ectasia, in decreasing maximum keratometry, and in improving BCVA.^{2,6,9,10} In an attempt to strengthen the corneal stroma, the eye is exposed to a direct source of UVA light, a process which creates riboflavin-UVA induced crosslinks on the cornea. It is unknown whether the UVA light to which the patient is exposed during the procedure can pass through ocular structures and cause phototoxicity damage to the retina.

It is known, however, that UVA and other light wavelengths can produce phototoxic maculopathy,²⁴ a fact which raises concern of retinal damage from exposure to UVA light during the CXL procedure. Though in vitro studies have shown that the shielding effect of riboflavin limits radiant transmission on inner ocular structures, few in vivo studies have been performed to assess morphological changes to the retina after UVA-riboflavin CXL, and no

studies were found in the literature on functional damage to retinal tissue.^{13,22,23}

In this study, 17 eyes were evaluated to determine any changes to BCVA, structural changes to the retina (SD-OCT, AF), vascular status (FA), and function (electrophysiology with mfERG) before and after exposure to UVA during the CXL procedure. All patients received slit lamp evaluations before the data was collected to ensure that there were no opacities on the ocular structures (corneal edema, scars, or abnormal surface integrity) that could represent the underlying cause of any abnormalities.

The results showed a slight decrease in BCVA and near vision acuity 7 days after the corneal CXL procedure; acuity, however, was found to have been recovered by day 30. SD-OCT imaging of the macula region showed increased thickness 7 days after CXL and similarly returned to original levels by day 30. None of the differences between the groups were statistically significant.

There were no changes in the fundus of the eye as assessed using indirect ophthalmoscopy, biomicroscopy, or retinography. No changes or abnormalities in macular vascularity were observed in the FA, nor was any RPE damage detected by AF imaging. Moreover, typical signs of phototoxicity, such as disruption of the inner segment – outer segment (IS/OS) junction layer, intraretinal cysts, or atrophy of outer nuclear layer were not detected by SD-OCT imaging.

All patients underwent mfERG so that changes in electrical activity and function of the macular region could be assessed. Changes are usually defined as an increase in P1 latency and a decrease in P1 amplitude. According to the literature, symptoms of light damage to the retina, such as peri-central scotoma, metamorphopsia, or slight to moderate vision loss after light exposure, are typically perceived by patients within hours or days.¹¹ For this reason, electrophysiological function of the macula was evaluated before and 7 days after CXL. Most patients were found to have experienced a significant increase in P1 latency (ms) of ring 4 (**Figure 1**). This change was correlated with an increase in central macular thickness (**Figure 2 and Table 3**). There is no well-known correlation between visual acuity and the loci of mfERG rings; however, based on the location of ring 4 (macular periphery), neither a change in BCVA nor the perception of symptoms would be expected in these cases. Furthermore, because BCVA is usually low among keratoconus patients for whom CXL is indicated, any mild changes in vision resulting from light damage are unlikely to be detected. Therefore, changes to the anatomy or function of the eye could represent phototoxicity damage. In this study, 9 subjects

(52.9%) also exhibited a significant decrease in P1 amplitudes of rings 1, 2, 3, 4, and 5(**Figure 3**), but these changes were not correlated with visual acuity or retinal thickness.

The limitations of the study are the number of patients (due to their difficulties in attending many follow-up appointments) and the lack of an electrophysiology evaluation 30 days after the procedure to analyze further disturbances or recoveries from the changes noticed on day 7.

According to other studies, the retina is protected by the absorption capacity of the cornea and crystalline lens during CXL treatment.¹⁸ Although long-term (30 minutes of) exposure to UVA light during the procedure, this study showed that the changes observed using SD-OCT and mfERG are not similar in nature or magnitude to other phototoxicity conditions described previously. This difference could be explained by the protective features of the anterior segment^{25,26} and the low UVA light intensity of the procedure relative to the intensity associated with typical phototoxicity conditions. The SD-OCT findings also reflected an increase in central macular thickness, which is the opposite of the typical thinning seen in outer retinal abnormalities. The hypothesis here is that this increase in macular thickness could be explained by a mild and self-limiting inflammatory reaction to the procedure and to UV light exposure. This reaction was evident 7 days after the procedure, but the patients were found to have recovered in the evaluations performed 30 days after CXL. Further studies are needed to prove or disprove this hypothesis. Even so, despite the lack of major differences between the groups in terms of BCVA, near vision acuity, and SD-OCT thickness, the slight changes seen during mfERG could raise concerns over sub-clinical macular disturbance after UVA light exposure during CXL. Given the results of a previous study, which showed the standard mfERG is largely shaped by On- and Off-bipolar cell activity with more limited contributions from the photoreceptors and inner retinal (e.g., amacrine and ganglion) cells,²⁷ the hypothesis resulting from the current study is that this atypical presentation of phototoxicity would not produce consistent changes to BCVA, major visual symptoms, or structural changes that would be evident in SD-OCT imaging.

In addition, this is the first study found in the literature in which the anatomy, vascularity and electrophysiology of the macula have been analyzed after exposure to UVA light from the corneal cross-linking procedure. Larger studies with long-term data are needed to further address possible phototoxicity of the retina and the safety of corneal cross-linking for keratoconus patients.

CONCLUSION

Continuous UVA light exposure during corneal collagen cross-linking therapy raises concerns over potential phototoxicity damage to the retina. This study is the first to analyze potential vascular, structural, and functional changes to the macula in patients with keratoconus who have been exposed to UVA light during cross-linking therapy. Most of the patients studied herein experienced slight changes in central macular thickness (as per SD-OCT) and in mfERG parameters, despite the absence of typical phototoxicity-related alterations seen in other conditions resulting from UV light exposure damage, despite the lack of vascular abnormalities as determined by FA/AF imaging, and despite the lack of significant changes in BCVA or near visual acuity and no report of symptoms. The changes seen could therefore be categorized as an early and mild sub-clinical effect on macular function after the corneal cross-linking procedure.

Acknowledgments

This project was supported by the São Paulo Research Foundation (FAPESP) under grant number 2015/23237-1.

Disclosure

The authors report no conflicts of interest relevant to this article.

REFERENCES

1. Rabinowitz YS. Keratoconus. *Surv Ophthalmol*. 1998; 42:297-319.3.
2. Mas Tur V, MacGregor C, Jayaswal R, et al. A review of keratoconus: Diagnosis, pathophysiology, and genetics. *Survey of Ophthalmology*. 2017, 20(6):770-783.
3. Godefrooij DA, de Wit GA, Uiterwaal CS, Imhof SM, Wisse RP. Age-specific incidence and prevalence of keratoconus: a nationwide registration study. *Am J Ophthalmol*. 2017,175:169-172.
4. Mandell RB, Keratoconus. In: Mandell RB, ed. *Contact Lens Practice*. 4th ed. Springfield: Charles C. Thomas; 1988:824-849.
5. Kirkness CM, Ficker LA, Steele AD et al. The success of penetrating keratoplasty for keratoconus. *Eye*. 1990; 4:673-688.

6. Suri K et al. Corneal collagen cross-linking: ectasia and beyond. *Curr Opin Ophthalmol*. 2012, 23:280–287.
7. McCall AC. Mechanisms of Corneal Tissue Cross-linking in Response to Treatment with Topical Riboflavin and Long-Wavelength Ultraviolet Radiation (UVA). *IOVS*. 2010; 51 (1):129-138.
8. Wollensak G, Spoerl E, Seiler T. Stress-strain measurements of human and porcine corneas after riboflavin-ultraviolet-A-induced cross-linking. *J Cataract Refract Surg*. 2003; 29:1780–1785.
9. Raiskup-Wolf F, Hoyer A, Spoerl E, Pillunat LE. Collagen crosslinking with riboflavin and ultraviolet-A light in keratoconus: long-term results. *J Cataract Refract Surg*. 2008; 34:796–801.
10. Hersh PS, Greenstein SA, Fry KL. Corneal collagen crosslinking for keratoconus and corneal ectasia: One-year results. *J Cataract Refract Surg*. 2011; 37:149–160.
11. Rodriguez-Marco NA, Andonegui-Navarro J, Campains-Silva E et al. Optical Coherence Tomography and Macular Phototoxicity. *Arch Soc Esp Ophthalmol*. 2008; 83:267-272.
12. Garg SJ, Martidis A, Nelson ML, Sivalingam A. Optical coherence tomography of chronic solar retinopathy. *Am J Ophthalmol*. 2004; 137:351-354.
13. Bechmann M, Ehrt O, Thiel MJ, Kristin N, Ulbig MW, Kampik A. Optical coherence tomography findings in early solar retinopathy. *Br J Ophthalmol*. 2000; 84:547-548.
14. Glickman RD. Phototoxicity to the retina: mechanisms of damage. *Int J Toxicol*. 2002; 21(6): 473–490.
15. Solley WA, Sternberg Jr P. Retinal phototoxicity. *Int Ophthalmol Clin*. 1999; 39(2):1–12.
16. Verma L, Venkatesh P, Tewari HK. Phototoxic retinopathy. *Ophthalmol Clin North Am*. 2001; 14(4): 601–609.
17. Youssef PN, Sheibani N, Albert DM. Retinal light toxicity. *Eye*. 2011; 25:1-14.
18. Goldish Y et al. Safety of Corneal Collagen Cross-linking With UV-A and Riboflavin in Progressive Keratoconus. *Cornea*. 2010; 29:409–411.
19. Ham WT Jr, Mueller HA, Sliney DH. Retinal sensitivity to damage from short wavelength light. *Nature*. 1976; 260:153–155.
20. Wollensak G, Spoerl E, Wilsch M et al. Endothelial cell damage after riboflavin-ultraviolet-A treatment in the rabbit. *J Cataract Refract Surg*. 2003; 29:1786–1790.

21. Kymionis GD, Portaliou DM, Diakonis VF et al. Corneal collagen cross-linking with riboflavin and ultraviolet-A irradiation in patients with thin corneas. *Am J Ophthalmol.* 2012; 153:24–28.
22. Spoerl E, Mrochen M, Sliney D et al. Safety of UVA-riboflavin crosslinking of the cornea. *Cornea.* 2007; 26:385–389.
23. Grewal DS, Brar GS, Jain R et al. Corneal collagen crosslinking using riboflavin and ultraviolet-A light for keratoconus:one-year analysis using Scheimpflug imaging. *J Cataract Refract Surg.* 2009; 35:425–432.
24. Glickman RD. Ultraviolet Phototoxicity to the Retina. *Eye Contact Lens.* 2011; 37(4):196-205.
25. Söderberg PG, Talebizadeh N, Yu Z, Galichanin K. Does infrared or ultraviolet light damage the lens? *Eye.* 2016; 30:241–246.
26. Löfgren S, Söderberg PG. Lens lactate dehydrogenase inactivation after UV-B irradiation: an *in vivo* measure of UVR-B penetration. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2001; 42(8):1833–1836.
27. Hood DC, Frishman LJ, Saszik S, Viswanathan S. Retinal origins of the primate multifocal ERG: implications for the human response. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2002;43:1673–1685.

Table 1. Demographic and clinical information on patients.

Parameters	Pre-CXL	7 Days Post-CXL	* <i>p</i>	30 Days Post-CXL	* <i>p</i>
Age (Years)	22.0 ± 5.0	-	-	-	-
Gender (Male, %)	63.64	-	-	-	-
BCVA (LogMAR)	0.47 ± 0.12	0.55 ± 0.15	0.57	0.46 ± 0.10	0.87
Near Visual Acuity (Jaeger)	2.42 ± 0.60	3.4 ± 0.63	0.19	2.58 ± 0.61	0.80
SD-OCT Thickness	253.62 ± 20.9	260.5 ± 18.7	0.48	256.44 ± 21.6	0.69

Notes: Data presented as Mean±SD. Independent t-test. **p*<0.05 was considered significant.

Abbreviations: SD: standard deviation; BCVA: best corrected visual acuity; CXL: corneal collagen cross-linking; SD-OCT: spectral domain optical coherence tomography.

Table 2. Changes in BCVA (logMAR), CMT(μm) and the five rings of latency as per the mfERG (ms) 7 days after CXL relative to pre-treatment values.

	LogMAR BCVA	CMT OCT (μm)	Latency Ring 1	Latency Ring 2	Latency Ring 3	Latency Ring 4	Latency Ring 5
1	-0.3	+13	-0.1	+0.6	+0.6	+0.4	-0.3
2	-0.5	+15	+2.8	+1.9	+2.1	+3.6	+1.8
3	-0.4	+13	+1.9	0	+5.6	+4.4	+0.9
4	+0.1	+5	-0.3	+0.6	+0.2	+1.9	0
5	0	+3	-0.7	-0.9	-1.9	0	0
6	0	+5	0	+0.3	-0.1	+1.8	+0.3
7	+0.2	+10	+0.3	-0.2	0	0	0
8	0	+2	+1.6	+0.8	+0.7	+1.9	+0.9
9	-0.1	+11	+1.9	-0.2	+0.6	+1.2	+0.5
10	0	+2	+1.9	+0.5	0	+0.9	+0.8
11	-0.1	+8	-1.5	0	+0.9	+3.0	0
12	+0.2	+6	-1.9	-0.9	-0.3	0	0
13	0	+4	-1.8	-1.8	-0.9	+0.9	-1.0
14	-0.3	+12	-0.7	+0.9	-1.0	+1.0	0
15	-0.2	+11	-0.7	-1.8	-2.3	+0.9	-0.9
16	0	-2	-0.6	-1.9	-0.9	-2.8	-1.9
17	0	-1	-0.9	-0.9	-2.5	0	0
AVERAGE	- 0.08	+ 6.88	+ 0.14	- 0.17	+ 0.04	+ 1.30	+ 0.06

Notes: Data presented as changes in total values in each eye.

Abbreviations: BCVA: best corrected visual acuity; CXL: corneal collagen cross-linking; OCT: spectral domain optical coherence tomography; mfERG: multifocal electroretinography; ms: milliseconds.

Table 3. Regression analysis of P1 latency (ms) as a dependent variable with increase in macular thickness as determined by mfERG.

	Mean \pm SD	<i>p</i> Value
P1 latency increase	1.59 \pm 0.66	0.027 ^a

Notes: ^aLinear regression

Abbreviations: mfERG: multifocal electroretinography; ms: milliseconds.

Table 4. Changes in amplitudes of rings 1, 2, 3, 4, 5 as per the mfERG (nV/deg²) 7 days after CXL relative to pre-treatment values.

	RING 1	RING 2	RING 3	RING 4	RING 5
1	-17.63	-0.97	-8.74	-5.07	-1.59
2	-39.14	-3.0	-2.61	-4.35	-1.8
3	-5.1	-11.33	-2.88	-3.5	+1.99
4	-60.76	-11.31	-4.89	-7.8	-2.14
5	-49.15	-16.62	-0.47	-0.6	-4.76
6	-45.45	-5.86	-4.73	-3.19	-1.15
7	-42.75	-2.99	+4.3	-4.82	-1.36
8	+32.71	-4.06	+4.55	-4.02	+1.98
9	-16.01	-13.32	+0.06	-1.29	-0.59
10	+29.5	+3.3	+1.69	+3.32	+1.21
11	+15.49	+7.43	-5.08	+0.63	-0.30
12	+7.04	+5.42	-8.72	+5.47	-3.63
13	-11.61	-1.06	-2.43	-3.02	-2.0
14	+28.23	+2.11	-2.66	-1.68	+0.22
15	+3.46	+11.61	+7.06	+4.34	+3.89
16	+24.08	+6.44	+5.64	+4.06	+2.72
17	+29.27	+8.32	-10.03	-7.22	+0.61
AVERAGE	-7.34	-1.40	-1.76	-1.69	-0.39

Notes: Data presented as changes in total values in each eye.

Abbreviations: CXL: corneal collagen cross-linking; mfERG: multifocal electroretinography; ms: milliseconds.

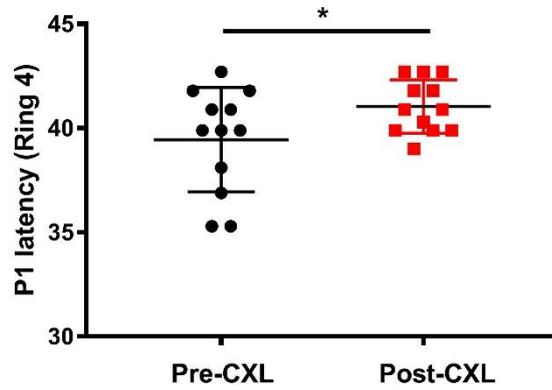


Figure 1. P1 latency (ms) of ring 4 region. Data from before CXL and 7 days after CXL. Paired *t*-test. **p*<0.05. Data presented as mean ± standard deviation.

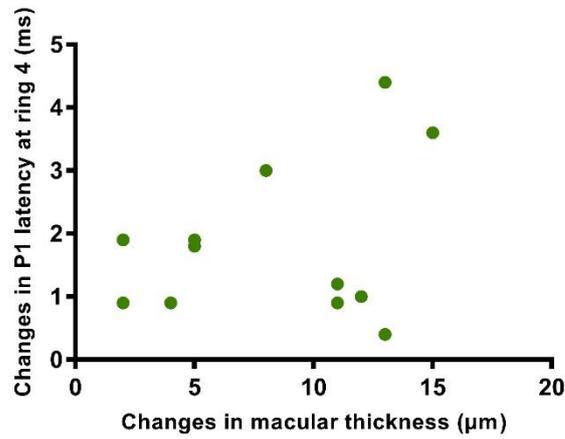


Figure 2. Scatter plot for changes in macular thickness and P1 latency.

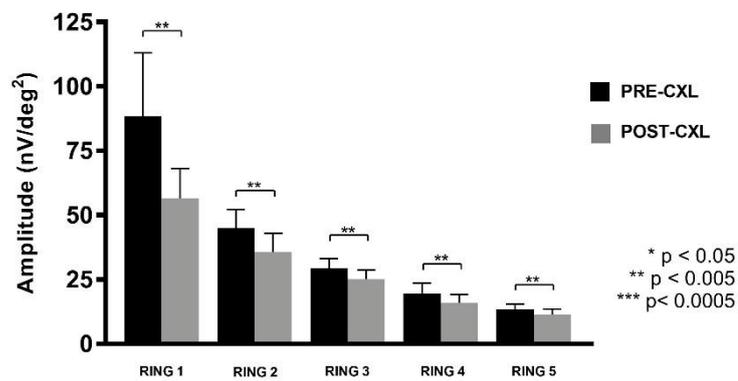


Figure 3. P1 amplitude (nV/deg²) of rings 1, 2, 3, 4, and 5. Data from before crosslinking (pre-CXL) and from 7 days after crosslinking (post-CXL). Paired *t*-test. Data presented as mean ± standard deviation.

Artigo 2

Corneal Cross-Linking in Young Patients for Progressive Keratoconus

Paulo Rodolfo Tagliari Barbisan, MD¹, Roberto Damian Pacheco Pinto, MD, PhD¹, Camillo Carneiro Gusmão, MD¹, Rosane Silvestre de Castro, MD, PhD¹, Carlos Eduardo Leite Arieta, MD, PhD¹.

¹Department of Ophthalmology, State University of Campinas, Campinas, **São Paulo, Brazil.**

Publicado no periódico “*Cornea*” (Fevereiro de 2020, Volume 39, Série 2, Páginas 186–191) - Qualis B1

The authors report no conflicts of interest in this work.

Keywords: keratoconus, corneal, cross-linking, pediatric, older.

ABSTRACT

Purpose: The goal of this study was to compare the effect of early corneal cross-linking (CXL) intervention (before 17 years of age) with late intervention (after 17 years of age) on the characteristics and progression of keratoconus.

Patients and Methods: One hundred and five eyes of 94 patients with keratoconus undergoing treatment with CXL were included. Patients were divided in two groups by age: Group 1 (mean age of 13.8 years; range 10-16) and Group 2 (mean age of 21.5 years; range 17-36). Eyes were evaluated in terms of best corrected visual acuity (BCVA), refractive error, corneal endothelium cell density (ECD), and central corneal thickness (CCT), as well as using slit lamp biomicroscopy, Goldmann tonometry, and the keratometry (Kmax, Ksteep and Kflat parameters) test prior to CXL and one, three, six, and twelve months thereafter.

Results: The mean (SD) BCVA of Group 1 was 0.45 (\pm 0.25) pre-CXL and 0.56 (\pm 0.29) one year after CXL ($p=0.030$); mean (SD) Kmax, Ksteep, and Kflat were 58.47 (\pm 7.2), 52.93 (\pm 5.4), 47.22 (\pm 4.2) pre-CXL, respectively, and 58.21 (\pm 7.7), 52.25 (\pm 5.5), and 46.56 (\pm 4.6) one year after CXL, respectively ($p=0.897$, 0.481, and 0.491). The mean (SD) BCVA of Group 2 was 0.50 (\pm 0.30) pre-CXL and 0.56 (\pm 0.32) one year thereafter ($p=0.346$); mean (SD) Kmax, Ksteep, and Kflat were, respectively, 57.64 (\pm 7.1), 54.02 (\pm 6.2), and 48.60 (\pm 4.1) pre-CXL and 56.46 (\pm 8.0), 52.46 (\pm 5.8), and 47.85 (\pm 4.9) one year after CXL ($p=0.553$, 0.258, and 0.640).

Conclusion: The study showed no statistical differences between younger and older patients. These findings support the indication of CXL treatment in pediatric patients for early stabilization of the disease and better progress in terms of BCVA and keratometry parameters.

INTRODUCTION

Keratoconus is a bilateral corneal degenerative disorder distinguished by paracentral corneal thinning and secondary ectasia, which results in irregular astigmatism with impaired vision. The disease occurs in all racial groups, equally affects males and females, and is often asymmetrical. Typically, its onset is at puberty and it progresses until the third to fourth decade of life, at which point it usually arrests, although cases of severe keratoconus have been reported in children as young as 4 years of age.¹ The etiology is not fully understood; several different biochemical, physical, and genetic pathways have been implicated, and the condition is a final common pathway for several diseases in which structural changes within the cornea cause thinning and the development of a more conical shape than the normal gradual curve, leading to visual impairment from irregular astigmatism and, in more advanced cases, corneal scarring.^{2,3} Reports on prevalence and incidence vary, but a recent study⁴ calculated an annual incidence of 1:7500 (13.3 cases per 100,000) and an estimated prevalence of 1:375 (265 cases per 100,000).

Diagnosis of keratoconus before adulthood is a negative prognostic factor for progression and is associated with an increased probability of a need for corneal transplantation.⁷ Younger patients are particularly at risk for faster progression of the disease.^{5,6} In this situation, an inverse relationship has been found between patient age and disease severity: on average, pediatric cases are more severe and are more likely to become progressive.⁷

Management of keratoconus consists of spectacles, contact lenses, intrastromal corneal ring segments,⁸ and, when these treatment options are no longer effective, lamellar or penetrating keratoplasty.⁹ Conservative management must include avoidance of eye rubbing and, if necessary, the prescription of topical agents such as mast cell stabilizers, antihistamines, and combined agents. However, none of these approaches treat the underlying causes of keratoconus or its progression.

The only treatment that aims to stop or slow keratoconus progression is corneal collagen cross-linking (CXL), that alters the collagen matrix of the corneal stroma by creating riboflavin ultraviolet A (UVA)-induced crosslinks.^{10,11} Riboflavin-catalyzed reactions generate free radicals that promote new bonds among the collagen fibrils to a depth of approximately 200 to 300 μm and prevent further corneal stroma thinning by increasing the mechanical and biochemical rigidity and stability of stromal tissue.¹⁰⁻¹³ CXL has been found to be effective in

stabilizing moderate corneal ectasia, in decreasing maximum keratometry, and in improving best corrected visual acuity (BCVA).^{10,13,14} Numerous clinical studies have confirmed its efficacy in adults CXL among pediatric patients.^{15,16,17}

The general recommendation has been to perform CXL if progression is documented over a six- to twelve-month period,^{18,19} although there is no consensus regarding the criteria to use to define progression. As opposed to adult ectatic corneal disease, in which one may elect to wait for clear signs of progression before CXL, pediatric cases often present with more aggressive keratoconus and require treatment immediately after the diagnosis is confirmed.^{7,20} Thus, treatment of pediatric keratoconus is often recommended upon initial presentation without waiting for progression.²⁰

The goal of this study was to compare early CXL intervention patients (16 years of age or younger) to late intervention patients (17 years of age or older) in terms of the characteristics and progression of keratoconus after the CXL procedure.

MATERIALS AND METHODS

This retrospective study included data from 105 eyes of 94 patients diagnosed with keratoconus between 2016 to 2018 and in whom treatment with CXL had been indicated for at least one eye. All subjects were assessed in the Department of Ophthalmology of the Clinical Hospital of the State University of Campinas (UNICAMP) in Brazil. Patients were divided by age into two groups: Group 1 (mean age of 13.8 years; range 10-16) was classified as early intervention, and Group 2 (mean age of 21.5 years; range 17-36) classified as late intervention (Figure 1). Eyes were evaluated in terms of BCVA, refractive error, corneal endothelium cell density (ECD), and pachymetry (central corneal thickness; CCT), as well as using slit lamp biomicroscopy, Goldmann tonometry, keratometry (Kmax, Ksteep and Kflat parameters) test prior to CXL and one, three, six, and twelve months thereafter.

The criteria that determined which patients would receive the CXL treatment were an increase by at least 1 diopter in keratometric parameters over twelve months, an increase by at least 0.75 diopter in keratometric parameters over six months, an increase in myopia by at least 0.75 diopters in refraction under cycloplegia over twelvemonths, or the loss of at least two lines of vision in BCVA over twelvemonths.¹⁹ The same criteria were used to determine progression after treatment or failure of the treatment.

Exclusion criteria were any ophthalmologic disease other than keratoconus, a history of any ophthalmologic surgery in the eye included in the study (including previous CXL), pregnancy or lactation, and failure on the part of the patient to cooperate during the procedure. All participants provided written informed consent before participation. This study was approved by the Ethics Committee for Research on Human Subjects of the State University of Campinas and adhered to the Declaration of Helsinki.

Corneal Endothelium Cell Density

ECD was measured using a non-contact specular microscope (Tomey EM-3000[®], Aich, Japan). The central method was used for cell counting, and the parameters were measured automatically with the integrated software (Tomey Inc., Erlangen/Germany). Three central fields were counted, and the average of these counts was used to represent ECD at a given point in time.

Keratometry and Pachymetry

Keratometry and pachymetry were measured in all studied eyes using the Pentacam[®] rotating Scheimpflug imaging system (Oculus Optikgeräte GmbH, Wetzlar, Germany). The Pentacam[®] system uses a rotating Scheimpflug camera and a monochromatic slit light source (blue-light-emitting diode at 475 nm) that rotates together with the camera around the optical axis of the eye. Within 2 seconds, the system rotates 180 degrees and obtains 25 images that contain 500 measurement points on the front and back surfaces of the cornea to construct a true elevation map. The software supplies the images as volume data; thus, multiplanar projections allow for the creation of axial and tangential maps. By capturing images at a steady speed, the system eliminates vibrations and image artifacts that might be produced during acceleration or deceleration. After completing a scan, the software creates a three-dimensional image of the anterior segment, including anterior and posterior corneal surfaces, lens surfaces, and lens opacities. In this study, keratometry values (maximum, steepest, and flattest) and CCT data were generated by the Pentacam[®] imaging system.

Corneal Cross-Linking Procedure

The UVA source was a solid-state device (X-Link Corneal Crosslinking System, Opto®, São Paulo, Brazil) consisting of a 9-mm UVA array with a potentiometric voltage regulator. Wavelength was 370 nm, and power was 3 mW/cm² or 5.4 J/cm² when located 1.5 cm from the cornea. After applying the blepharostat, a 9-mm-diameter marker was used to remove the corneal epithelium in a central circle with a blunt spatula. Photosensitizing solution (0.1% riboflavin–400 MOSM, Ophthalmos®, São Paulo, Brazil) was instilled every 3 minutes over a 30-minute period. Riboflavin was then applied every 3 minutes for the 30 minutes of ultraviolet light. After treatment, patients were medicated four times a day with a topical antibiotic (moxifloxacin, Vigamox, Alcon®, São Paulo, Brazil), and the eye was dressed with a soft therapeutic contact lens for 5 days.

Statistical Analysis

Data was analyzed using GraphPad Prism, version 7.0a. A descriptive statistical analysis was performed, and distributions were summarized using proportions and means \pm standard deviation. We used the D'Agostino-Pearson omnibus test to confirm the normality of the data. Patient's clinical data were analyzed using the paired *t*-test. The ratio paired *t*-test was used to compare the pre- and post-CXL data (measured twelvemonths apart). The significance level was set as $p < 0.05$ for all analyses.

RESULTS

One hundred and five eyes of 94 subjects were included in the analysis and divided into two groups by age. Group 1 (16 years of age or younger) included 52 eyes (45 patients), and Group 2 (17 years of age or older) included 53 eyes (49 patients). Table 1 shows the baseline characteristics of patients in the different groups. In Group 1, 65.4% of the subjects were male versus 54.7% in Group 2. Measurements of BCVA, ECD, CCT, and keratometry (Kmax, Ksteep, and Kflat) prior to CXL and twelvemonths after the procedure were compared between the two groups. In Group 1, mean (SD) BCVA in decimals was 0.45 (\pm 0.25) pre-CXL and 0.56 (\pm 0.29) one year after CXL, with a statistically significant improvement (0.030) (Figure 2). Mean (SD) ECD was 2659.0 (\pm 120.7) pre-CXL and 2504.8 (\pm 141.8) one year after CXL, with a statistically significant decrease (0.0002) (Figure 3A). Mean (SD) CCT was 466.60 (\pm 45.1) pre-CXL and 426.07 (\pm 67.5) one year after CXL, with

a statistically significant decrease (0.009) (Figure 3B). Mean (SD) Kmax, Ksteep, and Kflat were, respectively, 58.47 (\pm 7.2), 52.93 (\pm 5.4), and 47.22 (\pm 4.2) pre-CXL and 58.21 (\pm 7.7), 52.25 (\pm 5.5), and 46.56 (\pm 4.6) one year after CXL, with no statistically significant decrease (0.897, 0.481, and 0.491) (Table 2).

In Group 2, mean (SD) BCVA in decimals was 0.50 (\pm 0.30) pre-CXL and 0.56 (\pm 0.32) one year after CXL, with no statistically significant improvement (0.346) (Figure 2). Mean (SD) ECD was 2630.0 (\pm 284.0) pre-CXL and 2457.6 (\pm 335.8) one year after CXL, with a statistically significant decrease (0.043) (Figure 3A). Mean (SD) CCT was 453.30 (\pm 38.8) pre-CXL and 415.03 (\pm 51.1) one year after CXL, with a statistically significant decrease (0.0018) (Figure 3B). Mean (SD) Kmax, Ksteep, and Kflat were, respectively, 57.64 (\pm 7.1), 54.02 (\pm 6.2), and 48.60 (\pm 4.1) pre-CXL and 56.46 (\pm 8.0), 52.46 (\pm 5.8), and 47.85 (\pm 4.9) one year after CXL, with no statistically significant decrease (0.553, 0.258, and 0.640) (Table 2).

The data from the two groups were compared at the same points in time. Before the CXL treatment, there were no statistically significant differences between the two groups in terms of BCVA (0.308), ECD (0.643), CCT (0.115), Kmax (0.444), Ksteep (0.344), or Kflat (0.092). One year after CXL, there were no statistical significant differences between the two groups in terms of BCVA (0.914), ECD (0.525), CCT (0.241), Kmax (0.812), Ksteep (0.852), or Kflat (0.169) (Figure 3).

To determine whether patients experienced keratoconus progression after treatment with CXL or treatment failure, we used the same criteria used in the indication of the procedure. In Group 1, 19.2% of the patients experienced keratoconus progression after CXL: seven eyes had an increase by at least 1 diopter in Kmax parameters over twelve months, and three eyes had a loss of at least two lines of vision in BCVA over twelve months. In Group 2, 20.7% of the patients experienced progression: seven eyes had an increase of by least 1 diopter in Kmax parameters over twelve months, and four eyes had a loss of at least two lines of vision in BCVA over twelve months.

DISCUSSION

In cases of keratoconus, CXL is the only treatment that can slow disease progression. Previous studies^{15,16,17} have shown the safety and efficacy of CXL in pediatric patients (18 years

of age or younger). The current study compared early CXL intervention patients (16 years of age or younger) to late intervention patients (17 years of age or older) in terms of keratoconus characteristics and progression after the corneal CXL procedure.

In this study, there was a slight prevalence of male patients in the younger group, a difference which was in accordance with previous studies.^{15,16,17} There was a statistically significant improvement in BCVA one year after CXL in Group 1 (+0.11 Snellen lines; $p=0.030$) but no statistically significant improvement in Group 2 (+0.06 Snellen lines; $p=0.346$). Importantly, the difference in improvement between the groups was not statistically significant between groups ($p=0.941$) (Figure 2). This finding could be explained by the lower mean baseline BCVA in the younger group, as has been reported in other studies,^{10,13,14} since pediatric cases tend to be more severe and more likely to be cases of progressive keratoconus. After one year, however, the mean BCVA results did not differ significantly between the groups. As expected and due to one of the side effects of CXL,^{21,23} patients in both groups exhibited significantly lower ECD one year after treatment, but the difference between these final ECD measurements in the two groups was not statistically significant (Figure 3A). Similarly, CCT was significantly lower in both groups after one year, but the final CCTs did not differ significantly between the two groups (Figure 3B).

Keratometry analysis usually relies on Kmax as the principal parameter in the Pentacam tomography^{24,25} in order to determine the stages of keratoconus and progression criteria.²¹ In both groups, mean Kmax was lower after one year of CXL, but not significantly so. Baseline Kmax in the younger group was higher than in the older group, as was expected^{21,22} however, in this study, the mean Ksteep and Kflat values were higher (baseline and one year after CXL) in the older group. Ksteep and Kflat were also lower after one year in both groups, but not significantly so (Figure 3C; Table 2).

Based on the aforementioned criteria used to define keratoconus progression and treatment failure, our study demonstrated similar rates of progression after one year in the two groups: 19.2% in the younger group and 20.7% in the older group. These rates are in line with previous studies,^{16,17,22} despite the fact that the progression/treatment failure criteria differed slightly between studies.

The literature lacks a consensus regarding when CXL should be indicated, and recommendations typically depend on regional protocols. Most professionals, however, use keratometry parameters and visual acuity as criteria. As mentioned previously, CXL is not

without side effects, with corneal endothelial cell loss being one of the most common.²³ We recently published a study on the effect of UV light during the CXL procedure on the macula region of the retina, in which we reported a disturbance in the electrophysiology of the region classified as an early mild sub-clinical effect on macular function after the procedure.²⁶ Therefore, the indication of CXL for pediatric patients must be well established to avoid future complications.

In this study, we compared a younger group of keratoconus patients (mean age of 13.8 years) to an older group (mean age of 21.5 years). Our younger group had a younger mean age than is usually seen in similar comparison studies. The goal of this study was to analyze the characteristics and progress of keratoconus one year after CXL in order to determine if either age group experienced more benefits from the procedure. The results reflect the effectiveness of the treatment in both groups: apart from the statistically significant BCVA gain in the younger group, all others studied parameters were similar, with no statistically significant differences between them and a similar failure/progression rate as well. It is well known that younger keratoconus patients already possess more severe baseline parameters; therefore, this study further corroborates the importance of indicating CXL as treatment for pediatric patients, especially in the more severe cases typically seen in this population, since it can provide the benefits of early stabilization of the disease and better progression in terms of BCVA and keratometry parameters.

Acknowledgements

This study was financed in part by the Brazilian Association for the Improvement of Higher Education Personnel (CAPES) - Finance Code 001.

Disclosure

The authors report no conflicts of interest in this work.

REFERENCES

1. Sabti S, Tappeiner C, Frueh BE. Corneal Cross-Linking in a 4-Year-Old Child With Keratoconus and Down Syndrome. *Cornea*. 2015;34:1157-1160.
2. Rabinowitz YS. Keratoconus. *Surv Ophthalmol*. 1998;42:297-319.

3. Mas Tur V, MacGregor C, Jayaswal R, et al. A review of keratoconus: Diagnosis, pathophysiology, and genetics. *Survey of Ophthalmology*. 2017;20:770-783.
4. Godefrooij DA, Ardine de Wit G, Uiterwaal CS, et al. Age- specific incidence and prevalence of keratoconus: a nationwide registration study. *Am J Ophthalmol*. 2017;175:169-172.
5. Reeves SW, Stinnett S, Adelman RA, et al. Risk factors for progression to penetrating keratoplasty in patients with keratoconus. *Am J Ophthalmol*. 2005;140:607-611.
6. Wollensak G. Crosslinking treatment of progressive keratoconus: new hope. *Curr Opin Ophthalmol*. 2006;17:356-360.
7. Al Suhaibani AH, Al-Rajhi AA, Al-Motowa S, et al. Inverse relationship between age and severity and sequelae of acute corneal hydrops associated with keratoconus. *Br J Ophthalmol*. 2007;91:984-985.
8. Siganos CS, Kymionis GD, Kartakis N, et al. Management of keratoconus with Intacs. *Am J Ophthalmol*. 2003;135:64-70.
9. Frost NA, Wu J, Lai TF, et al. A review of randomized controlled trials of penetrating keratoplasty techniques. *Ophthalmology*. 2006;113:942-949.
10. Suri K, et al. Corneal collagen cross-linking: ectasia and beyond. *Curr Opin Ophthalmol*. 2012;23:280–287.
11. McCall AC. Mechanisms of Corneal Tissue Cross-linking in Response to Treatment with Topical Riboflavin and Long-Wavelength Ultraviolet Radiation (UVA). *IOVS*. 2010;51:129-138.
12. Wollensak G, Spoerl E, Seiler T. Stress-strain measurements of human and porcine corneas after riboflavin-ultraviolet-A-induced cross-linking. *J Cataract Refract Surg*. 2003;29:1780–1785.
13. Raiskup-Wolf F, Hoyer A, Spoerl E, et al. Collagen crosslinking with riboflavin and ultraviolet-A light in keratoconus: long-term results. *J Cataract Refract Surg*. 2008;34:796–801.
14. Hersh PS, Greenstein SA, Fry KL. Corneal collagen crosslinking for keratoconus and corneal ectasia: One-year results. *J Cataract Refract Surg*. 2011;37:149–160.
15. Vinciguerra P, Albé E, Frueh BE, et al. Two-year corneal cross-linking results in patients younger than 18 years with documented progressive keratoconus. *Am J Ophthalmol*. 2012;154:520-526.

16. Padmanabhan P, Rachapalle Reddi S, Rajagopal R, et al. Corneal Collagen Cross-Linking for Keratoconus in Pediatric Patients-Long-Term Results. *Cornea*. 2017;36:138-143.
17. Godefrooij DA, Soeters N, Imhof SM, et al. Corneal Cross-Linking for Pediatric Keratoconus: Long-Term Results. *Cornea*. 2016;35:954-958.
18. Randleman JB, Khandelwal SS, Hafezi F. Corneal cross-linking. *Surv Ophthalmol*. 2015;60:509-523.
19. Santhiago MR. Corneal Crosslinking: The Standard Protocol. *Rev. bras.oftalmol*. 2017;76:43-49.
20. Alió JL, Toffaha BT, Piñero DP, et al. Cross-linking in progressive keratoconus using an epithelial debridement or intrastromal pocket technique after previous corneal ring segment implantation. *J Refract Surg*. 2011;27:737-743.
21. Caporossi A, Mazzotta C, Baiocchi S, et al. Riboflavin-UVA-induced corneal collagen cross-linking in pediatric patients. *Cornea*. 2012;31:227-231.
22. Mazzotta C, Traversi C, Baiocchi S, et al. Corneal Collagen Cross-Linking With Riboflavin and Ultraviolet A Light for Pediatric Keratoconus: Ten-Year Results. *Cornea*. 2018;37:560-566.
23. Razmjoo H, Ghoreishi S, Mohammadi Z, et al. Comparison of the findings of endothelial specular microscopy before and after corneal cross-linking. *Adv Biomed Res*. 2015;4:52.
24. Du XL, Chen M, Xie LX. Correlation of basic indicators with stages of keratoconus assessed by Pentacam tomography. *Int J Ophthalmol*. 2015;8:1136–1140.
25. Duncan J, Belin M, Borgstrom M. Assessing progression of keratoconus: novel tomographic determinants. *Eye Vis (Lond)*. 2016;3:6.
26. Barbisan PRT, Viturino M, Souto F, et al. Macular phototoxicity after corneal cross-linking. *Clin Ophthalmol*. 2018;12:1801–1807.

Table 1. Baseline characteristics of patients in the different groups.

Parameters	Group 1	Group 2	p value
Age (Years)	13.8 ± 1.8 (10 - 16)	21.5 ± 5.1 (17-36)	-
Male (%)	65.4	54.7	-
BCVA (Decimals)	0.45 ± 0.25 (0.05 - 1.00)	0.50 ± 0.30 (0.05 - 1.00)	0.308
ECD (cells/mm ²)	2659 ± 120 (2488 - 2925)	2630 ± 284 (2028 - 3262)	0.643
Pachymetry (µm)	466.60 ± 45.1 (402 - 562)	453.3 ± 38.8 (408 - 546)	0.115
Kmax (D)	58.47 ± 7.2 (47.88 - 68.03)	57.64 ± 7.1 (48.35 - 79.69)	0.662
Ksteep (D)	52.93 ± 5.4 (41.85 - 66.41)	54.02 ± 6.2 (44.50 - 71.46)	0.521
Kflat (D)	47.22 ± 4.2 (42.62 - 56.84)	48.60 ± 4.1 (41.85 - 61.25)	0.752

Notes: Data presented as mean±SD (range).

Abbreviations: SD, standard deviation; BCVA, best corrected visual acuity; EDC, endothelium cell density; mm, millimeters; µm, micrometers; Kmax, maximum keratometry; Ksteep, keratometry in the steepest meridian; Kflat, keratometry in the flattest meridian; D, diopter.

Table 2. Keratometry of patients in the different groups.

	Group 1			Group 2		
	PRE-CXL	POST ONE YEAR	p value	PRE-CXL	POST ONE YEAR	p value
Kmax (D)	58.47 ± 7.2	58.21 ± 7.7	0.897	57.64 ± 7.1	56.46 ± 8.0	0.553
Ksteep (D)	52.93 ± 5.4	52.25 ± 5.5	0.481	54.02 ± 6.2	52.46 ± 5.8	0.258
Kflat (D)	47.22 ± 4.2	46.56 ± 4.6	0.491	48.60 ± 4.1	47.85 ± 4.9	0.640

Notes: Data presented as mean±SD.

Abbreviations: SD, standard deviation; Kmax, maximum keratometry; Ksteep, keratometry in the steepest meridian; Kflat, keratometry in the flattest meridian; D, diopter.

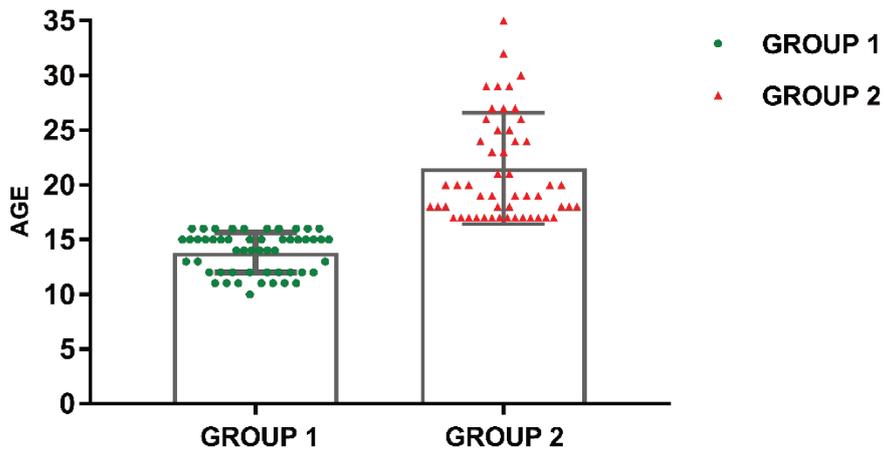


Figure 1. Age distribution by group. Data as shown in mean \pm SD. SD: standard deviation.

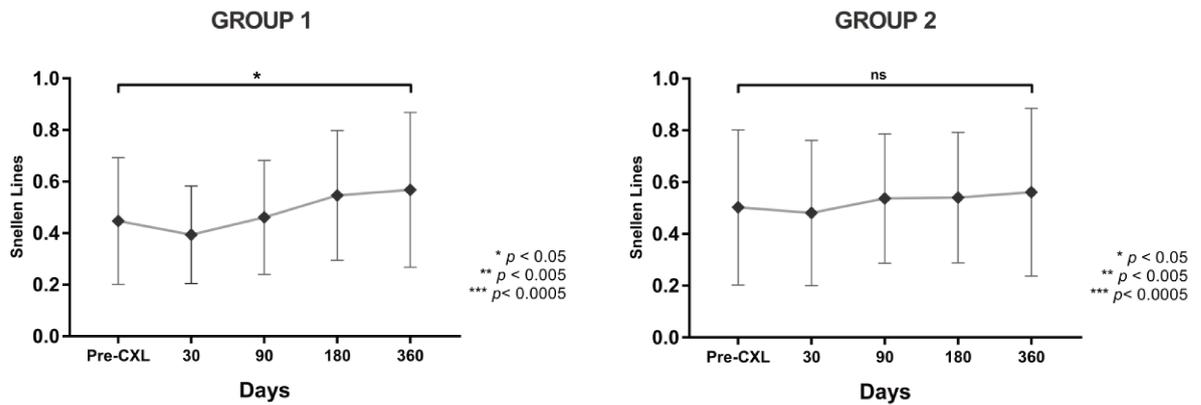


Figure 2. BCVA progression in Group 1 and Group 2 from baseline to one year after CXL. Paired t-test, data is shown as mean \pm SD; Snellen lines chart in decimals. SD: standard deviation; BCVA: best corrected visual acuity; CXL: corneal cross

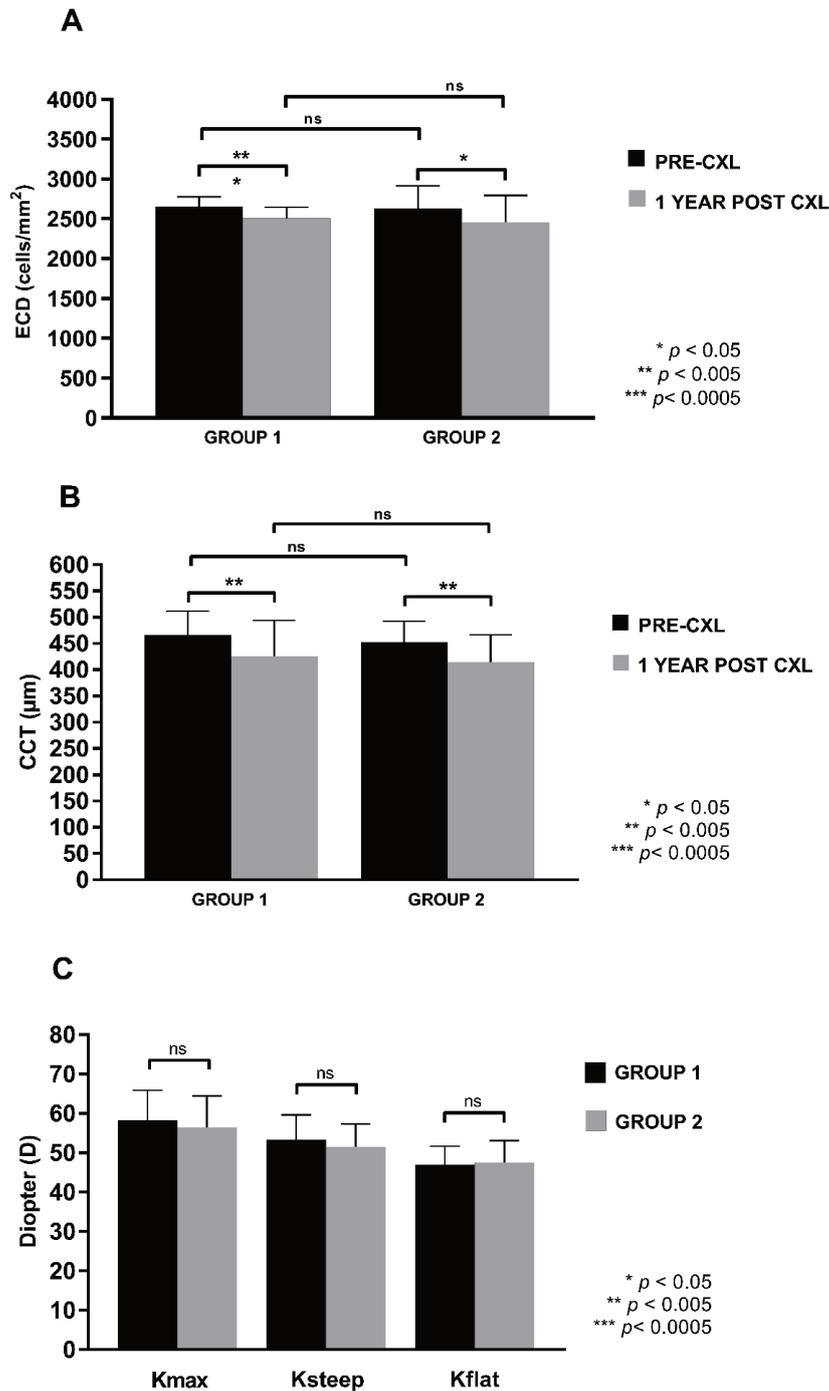


Figure 3. A: ECD in Group 1 and Group 2 pre-CXL and after one year. Paired t-test, data is shown as mean \pm SD. SD: standard deviation; EDC: endothelium cell density; CXL: corneal cross-linking. **B:** CCT in Group 1 and Group 2 pre-CXL and after one year. Paired t-test, data is shown as mean \pm SD. SD: standard deviation; CCT: central corneal thickness; μm : micrometers; CXL: corneal cross-linking. **C:** Kmax, Ksteep and Kflat comparison between Group 1 and Group 2 after one year of CXL. Paired t-test, data is shown as mean \pm SD. SD: standard deviation; Kmax: maximum keratometry; Ksteep: keratometry in the steepest meridian; Kflat: keratometry in the flattest meridian; CXL: corneal cross-linking.

6. DISCUSSÃO GERAL

O cross-linking corneano é o único tratamento que atua na progressão do ceratocone e é eficaz na estabilização da ectasia moderada da córnea, na diminuição da ceratometria máxima e na melhora da MAVC.^{127,207-209} Para produzir o enrijecimento do estroma corneano, através do cross-linking das fibras de colágeno, o olho é exposto a uma fonte direta de luz UVA associada à aplicação, na córnea, de solução de riboflavina. Baseado em estudos de grande impacto, não se sabe, atualmente, se essa exposição à luz UVA, durante o procedimento, pode atravessar as estruturas oculares anteriores e causar danos às outras estruturas posteriores como, por exemplo, à retina.

Como descrito anteriormente, a maioria dos estudos sobre segurança do procedimento abrange a fototoxicidade na estrutura corneana especificamente ao estroma e endotélio, além de determinar que o uso da riboflavina é uma barreira suficiente contra a passagem patológica dos raios UVA, impedindo-se danos às estruturas oculares.¹⁷⁰⁻¹⁷⁵ Os estudos originais sobre os efeitos da irradiação nos queratócitos estromais, utilizando-se culturas celulares tratadas com solução de riboflavina a 0,025%, e diversos níveis de irradiâncias UVA, determinaram o comprimento de onda de 370 nm e profundidade corneana de 400µm como margens de segurança contra a fototoxicidade corneana.^{170,171}

Sabe-se que o UVA e outros comprimentos de onda da luz podem produzir maculopatia fototóxica¹⁷⁶ e, dessa maneira, a exposição à luz do UVA, durante o procedimento CXL, levanta a preocupação de um potencial dano à retina. Embora estudos, *in vitro*, tenham mostrado que o efeito protetor da riboflavina limitou a transmissão radiante às estruturas oculares internas; poucos estudos, *in vivo*, anteriores, foram realizados para avaliar alterações morfológicas da retina após o CXL, e nenhum estudo analisou dano funcional ao tecido da retina.^{179,186,187}

No primeiro estudo (artigo 1), dezessete olhos foram avaliados para detectar alterações na MAVC, na estrutura anatômica (SD-OCT, AF), status vascular (FA) e função (eletrofisiologia com ERG multifocal) da retina, especificamente, a região macular, antes e depois da exposição regular ao UVA, durante o procedimento de CXL. Todos os pacientes foram submetidos a exame oftalmológico completo, pela lâmpada de fenda, antes de coletar os dados, para garantir que não houvesse opacidades nas estruturas oculares (edema da córnea, cicatrizes ou integridade superficial anormal) que pudessem justificar anormalidades. Os resultados desse estudo mostraram uma ligeira diminuição na MAVC e na visão de perto, após 7 dias do procedimento, sendo que a visão foi recuperada após trinta dias do CXL. As

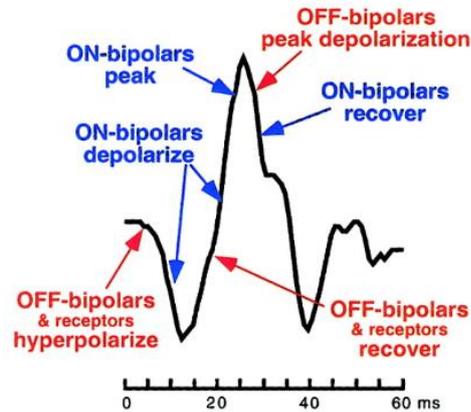
imagens de SD-OCT da região macular mostraram aumento na espessura, após 7 dias de CXL, com recuperação no trigésimo dia, sem nenhuma diferença, estatisticamente significativa.

Diversos estudos e série de casos sobre lesões retinianas secundárias à exposição à luz UV descrevem, como sinais típicos de fototoxicidade, a presença de alteração pigmentar perifoveal, em forma de leque, ao exame de fundo de olho e retinografia; defeitos em janelas maculares à angiografia fluoresceínica; focos dispersos de hipoautofluorescência intercalados com focos de hiperautofluorescência; alterações na retina externa como ruptura da zona elipsóide (junção de segmentos internos/externos; IS/OS) e motilimento do epitélio pigmentar da retina (EPR) ao exame de SD-OCT.^{177-180,210} Em nosso estudo, não houve alterações/anormalidades na vascularização macular demonstrada através da angiografia fluoresceínica e/ou danos no epitélio pigmentar (EPR) na AF. Além disso, não foram detectados interrupção da junção IS/OS, cistos intrarretinianos ou atrofia da camada nuclear externa nas imagens SD-OCT em nenhum dos time-points estabelecidos.

Para analisar as mudanças na atividade elétrica e na função da região macular, realizamos ERG multifocal em todos os pacientes. O mERG permite que as respostas locais do ERG sejam gravadas simultaneamente em múltiplas regiões da retina. Semelhante ao ERG de campo total, as respostas elétricas se originam amplamente da retina externa, com as células ganglionares contribuindo pouco à resposta. O mfERG é particularmente valioso nos casos em que o fundo de olho não apresenta alterações e há dificuldade em se distinguir entre doenças da retina externa e doenças das células ganglionares e/ou nervo óptico.²¹¹ Os sinais registrados pelo mfERG originam-se a partir do 25° (de raio) central da retina (área macular). Devido à alta taxa de estimulação combinada com os níveis de luz utilizados, as respostas dos fotorreceptores são captadas predominantemente dos cones, sendo pouca a contribuição dos bastonetes, exceto em circunstâncias muito incomuns.²¹² Semelhante ao ERG fotópico tradicional (acionado por cones), o mfERG mostra um componente negativo inicial (N1), seguido por um componente positivo (P1). Esses componentes têm uma semelhança superficial com as ondas *a* e *b* do ERG fotópico de campo total. Apesar das diferenças na análise dos estímulos entre o ERG tradicional e o mERG, a onda N1 compreende os mesmos componentes que a onda *a* do ERG de campo total; e a onda P1 compreende os mesmos componentes que as ondas positivas (onda *b* e potenciais oscilatórios).²¹³ Os sinais captados pelo mfERG são amplamente moldados pela atividade das células da retina externa (bipolares com contribuições dos fotorreceptores), com pouca contribuição das células da camada interna da retina (amácricas e gânglionares). Os componentes N1, P1 e N2 são influenciados,

de diferentes maneiras, pelas células bipolares e, em menor grau, pelos fotorreceptores (Figura 9).²¹⁴

Figura 9. A origem retiniana das curvas no eletrorretinograma multifocal.



Fonte: (Figura 9B) Hood DC, Frishman LJ, Saszik S, et al. Retinal origins of the primate multifocal ERG: implications for the human response. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2002; 43:1673-1685. Todos direito de imagem: ARVO.

A análise dos componentes do mfERG revela que danos nas células bipolares e fotorreceptoras diminuem substancialmente a amplitude P1. Já alterações na retina interna não afetam a amplitude de P1, embora possam apresentar pequenas alterações na forma de sua onda.²¹⁵ O mfERG pode ajudar a diferenciar doenças retinianas baseadas em mudanças nas amplitudes e latências de N1 e P1. O aumento da latência em P1 está associado a danos aos fotorreceptores e células da camada externa, enquanto danos às células bipolares, amácrinas ou ganglionares, produzem pequenas mudanças ou até encurtamento da latência P1.⁶ A latência no mERG, não a amplitude, é a medida mais sensível de alterações em doenças degenerativas dos fotorreceptores.²¹⁶ Tendo em vista esses conceitos, a utilização do mERG, em situações como maculopatias fototóxicas, vem sendo utilizada recentemente, como um método de identificação de lesões funcionais após a exposição a luzes potencialmente nocivas. Estudos com pacientes expostos à solda de metais e luz solar, sem a correta proteção, demonstraram redução na amplitude P1, associada a pouco ou nenhum aumento da latência, além de possível atenuação das respostas eletrorretinográficas.^{217,218}

Com base na literatura, os sintomas de dano leve à retina, como escotoma peri-central, metamorfopsia ou perda de visão leve/moderada após exposição à luz, geralmente são percebidos pelos pacientes dentro de horas a dias após a exposição;¹⁷⁷⁻¹⁸⁰ dessa maneira,

avaliamos a função macular eletrofisiológica antes e 7 dias após o CXL. Os resultados mostraram que, na maioria dos pacientes, houve um aumento estatisticamente significativo na latência P1 (ms) do anel 4. Essa alteração foi correlacionada com o aumento da espessura macular central ($p=0.027$). Atualmente, não existe uma correlação conhecida entre a acuidade visual e o locus dos anéis do mfERG, mas com base na localização do anel 4 (periferia macular), não esperaríamos, nesses pacientes, uma alteração da MAVC ou percepção de sintomas visuais. Ademais, devido ao próprio ceratocone, que produziu uma baixa acuidade visual nos pacientes selecionados ao tratamento, potenciais alterações visuais leves, secundárias ao CXL, provavelmente não seriam detectadas. Assim sendo, a detecção de alterações da anatomia ou da função do olho pode representar algum dano relacionado à fototoxicidade. Neste estudo, alguns indivíduos (nove pacientes) também mostraram uma diminuição de significância estatística nas amplitudes P1 dos anéis 1, 2, 3, 4 e 5, mas essas alterações não foram correlacionadas com a acuidade visual ou espessura macular.

De acordo com estudos e a literatura, a retina é protegida contra a fototoxicidade, durante o tratamento com CXL, pela capacidade da córnea e do cristalino em absorver a luz UVA nociva.¹⁸⁴ Embora a exposição à luz UVA, durante o procedimento, seja de período longo (30 minutos), nosso estudo mostrou que as alterações observadas no SD-OCT e mfERG não são semelhantes, em natureza ou magnitude, a outras condições de fototoxicidade descritas anteriormente.¹⁷⁷⁻¹⁸⁰ Essa diferença pode ser explicada pelas características protetoras do segmento anterior^{219,220} e pela baixa intensidade de luz UVA do procedimento, em relação à intensidade associada às condições típicas de fototoxicidade. Os achados do SD-OCT também refletiram em um aumento na espessura macular central, que é o oposto do afinamento típico observado nas anormalidades externas da retina secundárias à fototoxicidade. A hipótese aventada seria que esse aumento na espessura macular possa ser explicado por uma reação inflamatória leve e autolimitada ao procedimento e à exposição à luz UV. Essa reação ficou evidente 7 dias após o procedimento, mas os pacientes se recuperaram, de acordo com as avaliações realizadas, 30 dias após o CLX. Mais estudos serão necessários para provar ou refutar essa hipótese. Mesmo assim, apesar da falta de grandes diferenças entre os grupos em termos de MAVC, acuidade visual de perto e espessura no SD-OCT, as pequenas alterações observadas durante o mfERG podem produzir preocupações sobre distúrbios maculares subclínicos, após a exposição à luz UVA, durante o CXL. Com base nos resultados de um estudo anterior, que mostraram que o mfERG padrão é amplamente moldado pela atividade celular On e Off-bipolar, com contribuições mais limitadas dos fotorreceptores e células da

retina interna (por exemplo, amácrinas e ganglionares),²²¹ a hipótese resultante do nosso estudo atual é que essa apresentação atípica da fototoxicidade não produzirá alterações consistentes na MAVC, nem sintomas visuais ou alterações estruturais evidentes nas imagens de SD-OCT.

Além disso, nosso estudo é o primeiro encontrado na literatura, em que a anatomia, vascularização e eletrofisiologia da mácula foram analisadas após a exposição à luz UVA do procedimento de CXL. Estudos maiores, com dados de longo prazo, serão necessários para se comprovar a possível fototoxicidade na retina, avaliando-se os aspectos anatômicos, vasculares e eletrofisiológicos; além de estudos avaliando-se diferentes protocolos de tratamento do CXL, a fim de se comprovar possíveis sinais de fototoxicidade secundários à exposição da UVA, determinando-se assim a real segurança do CXL em pacientes com ceratocone.

As limitações desse estudo incluem o número de pacientes (devido às dificuldades em comparecer às muitas consultas de acompanhamento) e a falta de uma avaliação eletrofisiológica 30 dias após o procedimento, para analisar outros distúrbios ou recuperações das alterações observadas no sétimo dia pós-CXL.

Como descrito anteriormente, nos casos de ceratocone, o CXL é o único tratamento que poderá retardar a progressão da doença. Estudos anteriores²²²⁻²²⁴ demonstraram a segurança e a eficácia do CXL em pacientes pediátricos (18 anos ou menos), porém não existe consenso sobre qual a idade mínima em que o portador de ceratocone poderá ser submetido ao CXL. Dessa maneira, o segundo estudo realizado (artigo 2) comparou pacientes com intervenção precoce (16 anos de idade ou menos) classificados como grupo 1, com pacientes com intervenção tardia (17 anos ou mais) classificados como grupo 2, em termos de características e parâmetros do ceratocone e o surgimento de progressão após o procedimento com CXL. Neste estudo, houve uma ligeira prevalência de pacientes do sexo masculino no grupo mais jovem, em semelhança com estudos anteriores.²²²⁻²²⁴ Houve melhora estatisticamente significativa na MAVC, um ano após o CXL, no grupo 1 (+0,11 linhas da tabela de acuidade visual de Snellen; $p = 0,030$), mas não houve melhora estatisticamente significativa no Grupo 2 (+0,06 linhas de Snellen; $p = 0,346$). Esse achado pode ser explicado pela menor média da MAVC basal no grupo mais jovem, como já foi relatado em outros estudos,^{127,208,209} uma vez que os casos pediátricos tendem a ser mais graves e mais propensos a se tornarem progressivos. Após um ano, no entanto, os resultados médios da MAVC não diferiram significativamente entre os grupos. Como esperado e devido a um dos efeitos colaterais do CXL,^{225,226} pacientes, em ambos os grupos, exibiram DCE menor um ano após o tratamento;

porém a diferença entre as medidas finais de DCE nos dois grupos não foi estatisticamente significativa. Da mesma forma, a ECC foi menor nos dois grupos após um ano, mas seus valores finais não diferiram significativamente entre os dois grupos.

No exame de tomografia Pentacam, a análise da ceratometria geralmente se baseia no Kmax como parâmetro principal, a fim de determinar os estágios do ceratocone e os critérios de progressão.^{227,228} Nos dois grupos, o Kmax médio foi menor após um ano de CXL, mas não estatisticamente significativo. O Kmax basal no grupo mais jovem foi maior que no grupo mais velho como era esperado;^{225,226} no entanto, neste estudo, os valores médios de Ksteep e Kflat foram maiores (basal e um ano após o CXL) no grupo mais velho. Os valores ceratométricos Ksteep e Kflat também foram menores após um ano, em ambos os grupos, mas não estatisticamente significativo.

Com base nos critérios previamente mencionados, utilizados para definir a progressão do ceratocone e a falha no tratamento,¹⁹¹ nosso estudo demonstrou taxas semelhantes de progressão após um ano, nos dois grupos: 19,2% no grupo mais jovem e 20,7% no grupo mais velho. Essas taxas estão alinhadas com estudos anteriores,^{223,224} apesar de os critérios de progressão/falha do tratamento diferirem ligeiramente entre os estudos.

A literatura carece de consenso sobre quando o CXL deva ser indicado, e as recomendações geralmente dependem de protocolos regionais. A maioria dos profissionais, no entanto, utiliza parâmetros de ceratometria e acuidade visual como critério, preferencialmente abordando pacientes em idades mais avançadas (acima de 17 anos), provavelmente pela escassez de estudos comprovando a segurança e a eficácia em pacientes mais novos (abaixo de 16 anos). Como mencionado anteriormente, o CXL apresenta poucos efeitos colaterais, sendo a perda de células endoteliais da córnea uma das mais comuns. Portanto, a indicação do CXL para pacientes pediátricos deve estar bem estabelecida para evitar complicações futuras. Neste estudo, comparamos um grupo mais jovem de pacientes com ceratocone (idade média de 13,8 anos) com um grupo mais velho (idade média de 21,5 anos). Nosso grupo mais jovem possuía uma idade média menor do que a utilizada em estudos de comparação semelhantes. O objetivo deste estudo foi analisar as características e a presença de progressão do ceratocone um ano após o CXL, a fim de determinar se uma das faixas etárias apresenta mais benefícios com o procedimento que a outra. Os resultados apresentados refletem a eficácia do tratamento nos dois grupos, corroborando a importância de se indicar o CXL, como tratamento para pacientes pediátricos, principalmente nos casos mais graves, observados nessa população; pois pode proporcionar os benefícios da estabilização precoce da doença e melhorar sua evolução em termos de MAVC e ceratometria.

A limitação desse estudo inclui seu desenho retrospectivo. Novos estudos prospectivos e em grande número de pacientes serão necessários para corroborar os resultados apresentados. Baseando-se nos resultados dos dois estudos produzidos (artigos 1 e 2), espera-se que a abordagem e indicação do tratamento CXL para pacientes portadores de ceratocone se torne mais confiável e embasado cientificamente. No artigo 1, demonstramos um possível novo sinal subclínico, não estudado previamente, que poderá ser mais aprofundado em estudos maiores e de longo prazo, com o objetivo de se estabelecer todos os possíveis efeitos colaterais do procedimento de CXL. Já o artigo 2, reforça ainda mais a necessidade do diagnóstico e do tratamento precoce do ceratocone para se atingir melhores resultados e prognóstico, especialmente nos casos mais graves e de pior evolução, que em sua maioria, se apresentam em pacientes mais jovens. Assim sendo, os resultados de ambos os estudos em conjunto, reforçam a discussão da indicação do CXL, em que se deverão considerar todos os possíveis efeitos colaterais existentes, descritos e recentemente descobertos, relacionando-os com a população alvo, especialmente a mais jovem, em que se comprova sua maior gravidade e, ao mesmo tempo, sujeita a maiores preocupações com relação aos possíveis malefícios do tratamento com CXL.

7. CONCLUSÕES

- 1- A maioria dos pacientes submetidos ao CXL exibiram pequenas alterações na espessura macular central (SD-OCT) e nos parâmetros do mfERG, categorizados como um efeito subclínico inicial e precoce da função macular, após o procedimento de CXL.

- 2- Pacientes jovens (16 anos ou menos) com ceratocone submetidos ao tratamento com CXL demonstraram resultados semelhantes aos mais velhos (17 anos ou mais) em termos de MAVC, parâmetros ceratométricos e efeitos colaterais após 1 ano do procedimento.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Elias RMS, Lipener C, Uras R, et al. Keratoconus: prognosis factors. *Arq Bras Oftalmol.* 2005;68(4):491-4.
2. Bawazeer AM, Hodge WG, Lorimer B. Atopy and keratoconus: amultivariate analysis. *British Journal of Ophthalmology.* 2000; 84():34-836.
3. Georgiou T, Funnell CL, Cassels-Brown A, et al. Influence of ethnic origin on the incidence of keratoconus and associated atopic disease in Asians and white patients, *Eye.* 2004; 18(4):379-383.
4. Lim N, Vogt U. Characteristics and functional outcomes of 130 patients with keratoconus attending a specialist contact lens clinic. *Eye.* 2002; 16(1):54-59.
5. Millodot M, Shneor E, Albou S, et al. Prevalence and associated factors of keratoconus in jerusalem: a cross-sectional study. *Ophthalmic Epidemiology.* 2011; 18(2):91-97.
6. Fink BA, Wagner H, Steger-May K, et al. Differences in keratoconus as a function of gender. *The American Journal of Ophthalmology.* 2005;140(3):459-468.
7. Godefrooij DA, Ardine de Wit G, Uiterwaal CS, et al. Age- specific incidence and prevalence of keratoconus: a nationwide registration study. *Am J Ophthalmol.* 2017,175:169-72.
8. Tuft SJ, Moodaley LC, Gregory WM, et al. Prognostic factors for the progression of keratoconus. *Ophthalmology.* 1994;101(3):439-47.
9. Sabti S, Tappeiner C, Frueh BE. Corneal Cross-Linking in a 4-Year-Old Child With Keratoconus and Down Syndrome. *Cornea.* 2015;34(9):1157-60.
10. Arora R, Gupta D, Goyal JL, et al. Results of corneal collagen cross-linking in pediatric patients. *Journal of Refractive Surgery.*2012;28(11):759-762.
11. Buzzonetti L, Petrocelli G. Transepithelial corneal crosslinking in pediatric patients: early results. *Journal of RefractiveSurgery.*2012;28(11):763-767.
12. Zotta PG, Moschou KA, Diakonis VF, et al. Corneal collagen cross-linking for progressive keratoconus in pediatric patients: a feasibility study. *Journal of Refractive Surgery.* 2012;28(11):793-799.
13. Barbara R, Pikkell J, Garzozzi H, et al. Collagencross-linking and keratoconus in pediatric patients. *InternationalJournal of Keratoconus and Ectatic Corneal Diseases.* 2012;1(1):57-60.

14. Lass JH , Lembach RG, Park SB, et al. Clinical management of keratoconus. Amulticenter analysis. *Ophthalmology*.1990;97(4):433-445.
15. McMonnies CW. Where are the older keratoconus patients? *Cornea*. 2009;28(7):836.
16. Moodaley LCM, Woodward EG, Liu CSC, et al. Life expectancy in keratoconus. *British Journal of Ophthalmology*.1992;76(10):590-591.
17. Pobelle-Frasson C, Velou S, Huslin V, B. Massicault, et al. Keratoconus: what happens with older patients?. *Journal Franc,ais d'Ophtalmologie*. 2004;27(7):779-782.
18. Reeves SW, Ellwein LB, Kim T, et al. Keratoconus in the Medicare population, *Cornea*.2009;28(1):40-42.
19. Yeung KT, Tai JH, Weissman BA. Where have all the keratoconic patients gone?. *International Contact Lens Clinic*. 1998;25(4):109-113.
20. Zadnik K , Barr JT, Edrington TB, et al. Baseline findings in the Collaborative Longitudinal Evaluation of Keratoconus (CLEK) study. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*. 1998;39(13):2537-2546.
21. Romagnani S. The increased prevalence of allergy and the hygiene hypothesis: missing immune deviation, reduced immune suppression, or both?. *Immunology*, 2004;112(3):352-363.
22. Reeves SW, Stinnett S, Adelman RA, Afshari NA. Risk factors for progression to penetrating keratoplasty in patients with keratoconus. *Am J Ophthalmol*. 2005;140(4):607-11.
23. Wollensak G. Crosslinking treatment of progressive keratoconus: new hope. *Curr Opin Ophthalmol*. 2006;17(4):356-60.
24. Al Suhaibani AH, Al-Rajhi AA, Al-Motowa S, et al. Inverse relationship between age and severity and sequelae of acute corneal hydrops associated with keratoconus. *Br J Ophthalmol*. 2007;91(7):984-5.
25. Gordon MO, Steger-May K, Szczotka-Flynn L, et al. Baseline factors predictive of incident penetrating keratoplasty in keratoconus. *Am J Ophthalmol*. 2006;142(6):923-30.
26. Coster DJ, Williams KA. The Australian Corneal Graft Registry (ACGR). *Klin Monbl Augenheilkd*. 1994;205(5):271-4.
27. Davidson AE, Hayes S, Hardcastle AJ, et al. The pathogenesis of keratoconus. *Eye*. 2014; 28(2):189-195.

28. Kenney MC, Brown DJ. The cascade hypothesis of keratoconus. *Contact Lens and Anterior Eye*. 2003;26(3):139-146.
29. Gondhowiardjo TD, van Haeringen NJ, Volker-Dieben HJ, et al. Analysis of corneal aldehyde dehydrogenase patterns in pathologic corneas. *Cornea*. 1993;12(2):146-154.
30. McMonnies CW, Boneham GC. Keratoconus, allergy, itch, eye-rubbing and hand dominance. *Clinical and Experimental Optometry*. 2003;86(6):376-384.
31. Khor WB, Wei RH, Lim L, et al. Keratoconus in Asians: demographics, clinical characteristics and visual function in a hospital-based population. *Clinical and Experimental Ophthalmology*. 2011;39(4):299-307.
32. Rabinowitz YS. The genetics of keratoconus. *Ophthalmology Clinics of North America*. 2003;16(4):607-620.
33. Gordon-Shaag A, Shneor E, Millodot M. The epidemiology and etiology of Keratoconus. *International Journal of Keratoconus and Ectatic Corneal Diseases*. 2012;1(1):7-15.
34. Shneor E, Millodot M, Blumberg S, et al. Characteristics of 244 patients with keratoconus seen in an optometric contact lens practice. *Clinical and Experimental Optometry*. 2013;96(2):219-224.
35. Weed KH, MacEwen CJ, Giles T, J. Low, et al. The Dundee University Scottish Keratoconus study: demographics, corneal signs, associated diseases, and eye rubbing. *Eye*. 2008;22(4):534-541.
36. McMonnies CW. Mechanisms of rubbing-related corneal trauma in keratoconus. *Cornea*. 2009;28(6):607-615.
37. Carlson NA. Expanding our understanding of eye rubbing and keratoconus. *Cornea*. 2010;29(2):245.
38. Jafri B, Lichter H, Stulting RD. Asymmetric keratoconus attributed to eye rubbing. *Cornea*. 2004;23(6):560-564.
39. Zadnik K, Steger-May, Fink KBA, et al. Between-eye asymmetry in keratoconus. *Cornea*. 2002;21(7):671-679.
40. Gordon-Shaag A, Millodot M, Essa M, et al. Is consanguinity a risk factor for keratoconus?. *Optometry and Vision Science*. 2013;90(5):448-454.
41. Kim H, Joo CK. Measure of keratoconus progression using Orbscan II. *Journal of Refractive Surgery*. 2008;24(6):600-605.
42. Kennedy RH, Bourne WM, Dyer JÁ. A 48-year clinical and epidemiologic study of keratoconus. *The American Journal of Ophthalmology*. 1986;101(3):267-273.

43. Ridley F. Eye-Rubbing and Contact Lenses. *The British Journal of Ophthalmology*. 196;45(9):631.
44. Korb DL, Greiner CD, Prevalence JV. Prevalence and characteristics of eye rubbing for keratoconic and nonkeratoconic subjects. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*. 1991;32:1057.
45. McMonnies CW. Abnormal rubbing and keratectasia. *Eye and Contact Lens*. 2007;33(6):265-271.
46. Mackiewicz Z, Määtä M, Stenman M, et al. Collagenolytic proteinases in keratoconus. *Cornea*. 2006;25(5):603-610.
47. Seppälä HPS, Määtä M, Rautia M, et al. EMMPRIN and MMP1 in keratoconus. *Cornea*. 2006;25(3):325-330.
48. Crews MJ, Driebe Jr. WT, Stern GA. The clinical management of keratoconus: a 6 year retrospective study. *Contact Lens Association of Ophthalmologists Journal*. 1994;20(3):194-197.
49. Kaya V, Karakaya M, Utine CA, et al. Evaluation of the corneal topographic characteristics of keratoconus with Orbscan II in patients with and without atopy. *Cornea*. 2007;26(8):945-948.
50. Lowell FC, Carroll JM. A study of the occurrence of atopic traits in patients with keratoconus. *Journal of Allergy*. 1970;46(1):32-39.
51. Wachtmeister L, Ingemansson SO, Moller E. Atopy and HLA antigens in patients with keratoconus. *Acta Ophthalmologica*. 1982;60(1):113-122.
52. Newkirk KM, Chandler HL, Parent AE, et al. Ultraviolet radiation-induced corneal degeneration in 129 mice. *Toxicologic Pathology*. 2007;35(6):819-826.
53. Podskochy A, Gan L, Fagerholm P. Apoptosis in UV exposed rabbit corneas. *Cornea*. 200;19(1):99-103.
54. Raiskup-Wolf F, Hoyer A, Spoerl E, Pillunat LE. Collagen crosslinking with riboflavin and ultraviolet-A light in keratoconus: long-term results. *J Cataract Refract Surg*. 2008; 34:796–801.
55. Karimian F, Aramesh S, Rabei HM, et al. Topographic evaluation of relatives of patients with keratoconus. *Cornea*. 2008;27(8):874-878.
56. Wheeler J, Hauser MA, Afshari NA, et al. The genetics of keratoconus: a review, *Reproductive System & Sexual Disorders*. 2012; 6, article 001.

57. Bisceglia L, de Bonis P, Pizzicoli C, et al. Linkage analysis in keratoconus: replication of locus 5q21.2 and identification of other suggestive Loci. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*. 2009;50(3):1081-1086.
58. 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. *Genetics in Medicine*. 2005;7(6):397-405.
59. Li X, Rabinowitz YS, Tang YG, et al. Two-stage genomewide linkage scan in keratoconus sib pair families. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*. 2006;47(9):791-3795.
60. Teng CC. Electron microscope study of the pathology of keratoconus: part 1. *Am J Ophthalmol*. 1963;55:18-47.
61. Tsubota K, Mashima Y, Murata H, et al. Corneal epithelium in keratoconus. *Cornea*. 1995;14(1):77-83.
62. Sawaguchi S, Fukuchi T, Abe H, et al. Three dimensional electron microscopic study of keratoconus. *Arch Ophthalmol*. 1998;116:62-98.
63. Sturbaum CW, Peiffer Jr RL. Pathology of corneal endothelium in keratoconus. *Ophthalmologica*. 1993;206(4):192-208.
64. Critchfield J, Caladra A, Nesburn A, et al. Biomechanical studies of normal and keratoconus cornea. *Exp Eye Res*. 1988;46:953-963.
65. Buddecke E, Wollensak J. Acid mucopolysaccharide and glycoprotein in the human cornea in relation to age and keratoconus. *Albrecht von Graefes Arch Klin Exp Ophthalmol*. 1966;172:105-120.
66. Sawaguchi S, Twining SS, Yue BY, et al. Alpha-2-Macroglobulin levels in normal and keratoconus corneas. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 1994;35:4008-4014.
67. Funderburgh JL, Hevelone ND, Roth MR, et al. Decorin and biglycan of normal and pathological human corneas. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 1998;39(10):1957-1964.
68. Joseph R, Srivastava O, Pfister R. Differential epithelial and stromal protein profiles in keratoconus and normal human corneas. *Exp Eye Res*. 2011;92:282-298.
69. Wentz-Hunter K, Cheng EL, Ueda J, et al. Keratan expression is increased in the stroma of keratoconus corneas. *Mol Med*. 2001;7(7):470-477.
70. Funderburgh JL, Panjwani N, Conrad GW, et al. Altered keratan sulphate epitopes in keratoconus. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 1989;30(10):2278-2281.
71. Zimmermann DR, Fischer RW, Winterhalter KH, et al. Comparative studies of collagens in normal and keratoconus corneas. *Exp Eye Res*. 1998;46(3):431-442.

72. Nakayasu K, Tanaka M, Konomi H, et al. Distribution of types I, II, III, IV and V collagen in normal and keratoconus corneas. *Ophthalmic Res.* 1986;18:1–10.
73. Newsome DA, Foidart JM, Hassell JR, et al. Detection of specific collagen types in normal and keratoconus corneas. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1981;20:738–750.
74. Hayes S, Boote C, Tuft S, et al. A study of corneal thickness, shape and collagen organisation in keratoconus using videokeratography and X-ray scattering techniques. *Exp Eye Res.* 2007;84(3):423-434.
75. Oxlund H, Simonsen AH. Biochemical studies of normal and keratoconus corneas. *Acta Ophthalmologica.* 1985;63(6):666-669.
76. Zhou L, Zhao SZ, Koh SK, et al. In-depth analysis of the human tear proteome. *J Proteomics.* 2012;75(13):3877-3885.
77. Joseph R, Srivastava OP, Pfister RR. Differential epithelial and stromal protein profiles in keratoconus and normal human corneas. *Exp Eye Res.* 2011;92(4):282-298.
78. Chaerkady R, Shao H, Scott SG, et al. The keratoconus corneal proteome: loss of epithelial integrity and stromal degeneration. *J Proteomics.* 2013;87:122-131.
79. Rabinowitz YS. Keratoconus. *Surv Ophthalmol.* 1998;42(4):297-319.
80. Roberts CJ. Concepts and misconceptions in corneal biomechanics. *J Cataract Refract Surg.* 2014;40:862-869.
81. Abahussin M, Hayes S, Cartwright NEK, et al. 3D collagen orientation study of the human cornea using X-ray diffraction and femtosecond laser technology. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2009;50:5159-5164.
82. Sherwin T, Brookes NH, Loh IP, et al. Cellular incursion into Bowman's membrane in the peripheral cone of the keratoconic cornea. *Exp Eye Res.* 2002;74(4):473-482.
83. Zhou LL, Sawaguchi S, Twining SS, et al. Expression of degradative enzymes and protease inhibitors in corneas with keratoconus. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1998;39:1117-1124.
84. Polack FM. Contributions of electron microscopy to the study of corneal pathology. *Surv Ophthalmol.* 1976;20:375-414.
85. Morshige N, Wahlert A, Kenney M, et al. Second harmonic imaging microscopy of normal and keratoconus cornea. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2007;48(3):1087-1094.
86. Meek KM, Tuft SJ, Huang Y, et al. Changes in collagen orientation and distribution in keratoconus corneas. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2005;46(6):1948-1956.
87. Daxer A, Fratzl P. Collagen fibril orientation in the human corneal stroma and its implications in keratoconus. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1997;38:121-129.

88. Hayes S, Kamma-Lorger C, Boote C, et al. The effect of riboflavin/UVA collagencross-linking therapy on the structure and hydrodynamicbehaviour of the ungulate and rabbit corneal stroma. *PLoS One*.2013;8(1):e52860.
89. Amsler M. [The ‘forme fruste’ of keratoconus]. *Wien Klin Wochenschr*. 1961;73:842-843.
90. Klyce SD. Chasing the suspect: keratoconus. *Br J Ophthalmol*. 2009;93:845-847.
91. Saad A, Gatinel D. Topographic and tomographic properties of forme fruste keratoconus corneas. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2010;51:5546-5555.
92. Muftuoglu O, Ayar O, Ozulken K, et al. Posterior corneal elevation and back difference corneal elevation in diagnosing forme fruste keratoconus in the fellow eyes of unilateral keratoconus patients. *J Cataract Refract Surg*. 2013;39:1348-1357.
93. Li X, Yang H, Rabinowitz YS. Keratoconus: Classification scheme based on videokeratography and clinical signs. *J Cataract Refract Surg*. 2009;35(9):1597-1603.
94. De Sanctis U, Loiacono C, Richiardi L, et al. Sensitivity and specificity of posterior corneal elevation measured by Pentacam in discriminating keratoconus/subclinical keratoconus. *Ophthalmology*. 2008;115:1534-1539.
95. De Sanctis U, Aragno V, Dalmasso P, et al. Diagnosis of subclinical keratoconus using posterior elevation measured with 2 different methods. *Cornea*. 2013;32:911-915.
96. Uçakhan ÖÖ, Çetinkor V, Özkan M, et al. Evaluation of Scheimpflug imaging parameters in subclinical keratoconus, keratoconus, and normal eyes. *J Cataract Refract Surg*. 2011;37:1116–1124.
97. Mousa A, Kondkar A, Abu Amero KK. Keratoconus: globally and in the middle east (epidemiology, genetics, and future research). *Essentials in Ophthalmology*. Tokyo: Springer Japan. 2017:391-402.
98. Hashemi H, Khabazkhoob M, Yazdani N, et al. The prevalence of keratoconus in a young population in Mashhad, Iran. *Ophthalmic Physiol Opt*. 2014;34(5):519-527.
99. Schor P. Keratoconus. *Arq. Bras. Oft*. 1998;6(2).
100. McGhee CN. 2008 Sir Norman McAlister Gregg Lecture: 150 years of practical observations on the conical cornea – what have we learned? *Clin Experiment Ophthalmol*. 2009;37(2):160-176.
101. Romero-Jiménez M, Santodomingo-Rubido J, Wolffsohn JS. Keratoconus: a review. *Cont Lens Anterior Eye*. 2010;33(4):157-166.

102. Perry HD, Bwton JN, Fini BS. Round and oval cones in keratoconus. *Ophthalmology*. 1980;87:905-909.
103. Mousa A, Kondkar A, Abu Amero KK. Keratoconus: globally and in the middle east (epidemiology, genetics, and future research). *Essentials in Ophthalmology*. Tokyo: Springer Japan. 2017:391-402.
104. Hawkes E, Nanavaty MA. Eye rubbing and keratoconus: a literature review. *Int J Keratoco Ectatic Corneal Dis*. 2014;3(3):118-121.
105. Klyce SD. Computer-assisted corneal topography. High-resolution graphic presentation and analysis of keratoscopy. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 1984;25(12):1426-1435.
106. Rabinowitz YS, McDonnell PJ. Computer-assisted corneal topography in keratoconus. *Refract Corneal Surg*. 1989;5(6):400-408.
107. Maeda N, Klyce SD, Smolek MK, et al. Automated keratoconus screening with corneal topography analysis. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 1994;35(6):2749-2757.
108. Maeda N, Klyce SD, Smolek MK. Comparison of methods for detecting keratoconus using videokeratography. *Arch Ophthalmol*. 1995;113(7): 870-874.
109. Rabinowitz YS. Videokeratographic indices to aid in screening for keratoconus. *J Refract Surg*. 1995;11(5):371-379.
110. Rabinowitz YS, Rasheed K. KISA% index: a quantitative videokeratography algorithm embodying minimal topographic criteria for diagnosing keratoconus. *J Cataract Refract Surg*. 1999;25(10):1327-1335.
111. Li X, Yang H, Rabinowitz YS. Longitudinal study of keratoconus progression. *Exp Eye Res*. 2007;85(4):502-507.
112. Lim L, Wei RH, Chan WK, et al. Evaluation of keratoconus in Asians: role of Orbscan II and Tomey TMS-2 corneal topography. *Am J Ophthalmol*. 2007;143(3):390-400.
113. Quisling S, Sjoberg S, Zimmerman B, et al. Comparison of Pentacam and Orbscan IIz on posterior curvature topography measurements in keratoconus eyes. *Ophthalmology*. 2006;113(9):1629-1632.
114. Ambrósio R Jr, Alonso RS, Luz A, et al. Corneal-thickness spatial profile and corneal-volume distribution: Tomographic indices to detect keratoconus. *J Cataract Refract Surg*. 2006;32(11): 1851-1859.

115. Piñero DP, Alio JL, Alesón A, et al. Corneal volume, pachymetry, and correlation of anterior and posterior corneal shape in subclinical and different stages of clinical keratoconus. *J Cataract Refract Surg.* 2010;36(5):814-825.
116. Uçakhan ÖÖ, Çetinkor V, Özkan M, et al. Evaluation of Scheimpflug imaging parameters in subclinical keratoconus, keratoconus, and normal eyes. *J Cataract Refract Surg.* 2011;37(6):1116-1124.
117. Piñero DP, Nieto JC, Lopez-Miguel A. Characterization of corneal structure in keratoconus. *J Cataract Refract Surg.* 2012;38(12): 2167–2183.
118. Muftuoglu O, Ayar O, Ozulken K, et al. Posterior corneal elevation and back difference corneal elevation in diagnosing forme fruste keratoconus in the fellow eyes of unilateral keratoconus patients. *J Cataract Refract Surg.* 2013;39(9):1348-1357.
119. Maeda N, Fujikado T, Kuroda T, et al. Wavefront aberrations measured with Hartmann-Shack sensor in patients with keratoconus. *Ophthalmology.* 2002;109(11):1996-2003.
120. Schweitzer C, Roberts CJ, Mahmoud AM, et al. Screening of forme fruste keratoconus with the ocular response analyzer. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2010;51(5):2403-2410.
121. Johnson RD, Nguyen MT, Lee N, et al. Corneal biomechanical properties in normal, forme fruste keratoconus, and manifest keratoconus after statistical correction for potentially confounding factors. *Cornea.* 2011;30(5):516-523.
122. Fontes BM, Ambrósio R, Velarde GC, et al. Ocular response analyzer measurements in keratoconus with normal central corneal thickness compared with matched normal control eyes. *J Refract Surg.* 2011;27(3):209-215.
123. Alio JL, Piñero DP, Alesón A, et al. Keratoconus-integrated characterization considering anterior corneal aberrations, internal astigmatism, and corneal biomechanics. *J Cataract Refract Surg.* 2011;37(3):552-568.
124. Wagner H, Barr JT, Zadnik K. Collaborative Longitudinal Evaluation of Keratoconus (CLEK) Study: methods and findings to date. *Cont Lens Anterior Eye.* 2007;30(4):223-232.
125. Barnett M, Mannis MJ. Contact lenses in the management of keratoconus. *Cornea.* 2011;30(12):1510-1516.

126. Hafezi F, Mrochen M, Iseli HP, et al. Collagen crosslinking with ultraviolet-A and hypotonic riboflavin solution in thin corneas. *J Cataract Refract Surg.* 2009;35:621-4.
127. Hoyer A, Raiskup-Wolf F, Spörl E, et al. Collagen cross-linking with riboflavin and UVA light in keratoconus. Results from Dresden. *Ophthalmologie.* 2009;106:133-40.
128. Kanellopoulos AJ. Long term results of a prospective randomized bilateral eye comparison trial of higher fluence, shorter duration ultraviolet A radiation, and riboflavin collagen cross linking for progressive keratoconus. *Clin Ophthalmol.* 2012;6:97-101.
129. Stojanovic A, Zhang J, Chen X, et al. Topography-guided transepithelial surface ablation followed by corneal collagen cross-linking performed in a single combined procedure for the treatment of keratoconus and pellucid marginal degeneration. *J Refract Surg.* 2010;26:145-52.
130. Shetty R, Nuijts RM, Nicholson M, et al. Cone location-dependent outcomes after combined topography-guided photorefractive keratectomy and collagen cross-linking. *Am J Ophthalmol* 2014.
131. Rohit, et al. Five-point management algorithm for keratoconus. *Indian Journal of Ophthalmology.* 2015;63(1):46-53.
132. Koller T, Iseli HP, Donitzky C, et al. Topography-guided surface ablation for forme fruste keratoconus. *Ophthalmology.* 2006;113:2198-202.
133. Yeung SN, Lichtinger A, Ku JY, et al. Intracorneal ring segment explantation after intracorneal ring segment implantation combined with same-day corneal collagen crosslinking in keratoconus. *Cornea* 2013;32:1617-20.
134. Kamburoglu G, Ertan A. Intacs implantation with sequential collagen cross-linking treatment in postoperative LASIK ectasia. *J Refract Surg.* 2008;24:726-9.

135. Torquetti L, Berbel RF, Ferrara P. Long-term follow-up of intrastromal corneal ring segments in keratoconus. *J Cataract Refract Surg.* 2009;35:1768-73.
136. Sekundo W, Stevens JD. Surgical treatment of keratoconus at the turn of the 20th century. *J Refract Surg.* 2001;17:69-73.
137. Piñero DP, Alio JL. Intracorneal ring segments in ectatic corneal disease –* A review. *Clin Experiment Ophthalmol.* 2010;38:154-7.
138. Ganesh S, Shetty R, D'Souza S, et al. Intrastromal corneal ring segments for management of keratoconus. *Indian J Ophthalmol.* 2013;61:451-5.
139. Shetty R, Kurian M, Anand D, et al. Intacs in advanced keratoconus. *Cornea.* 2008;27:1022-9.
140. Smiddy WE, Hamburg TR, Kracher GP, et al. Keratoconus. Contact lens or keratoplasty? *Ophthalmology.* 1988;95(4):487-492.
141. Sray WA, Cohen EJ, Rapuano CJ, et al. Factors associated with the need for penetrating keratoplasty in keratoconus. *Cornea.* 2002;21(8):784-786.
142. Gordon MO, Steger-May K, Szczotka-Flynn L, et al. Baseline factors predictive of incident penetrating keratoplasty in keratoconus. *Am J Ophthalmol.* 2006;142(6):923-930.
143. Sharif KW, Casey TA. Penetrating keratoplasty for keratoconus: complications and long-term success. *Br J Ophthalmol.* 1991;75(3): 142-146.
144. Buzard KA, Fundingsland BR. Corneal transplant for keratoconus: results in early and late disease. *J Cataract Refract Surg.* 1997;23(3): 398-406.
145. Olson RJ, Pingree M, Ridges R, et al. Penetrating keratoplasty for keratoconus: a long-term review of results and complications. *J Cataract Refract Surg.* 2000;26(7):987–991.
146. Javadi MA, Motlagh BF, Jafarinasab MR, et al. Outcomes of penetrating keratoplasty in keratoconus. *Cornea.* 2005;24(8):941-946.
147. Price FW, Whitson WE, Marks RG. Graft survival in four common groups of patients undergoing penetrating keratoplasty. *Ophthalmology.* 1991;98(3):322-328.
148. Pramanik S, Musch DC, Sutphin JE, et al. Extended long-term outcomes of penetrating keratoplasty for keratoconus. *Ophthalmology.* 2006;113(9):1633-1638.

149. Williams KA, Lowe MT, Keane MC, et al. The Australian Corneal Graft Registry 2012. Available from: http://ebaanz.org/doc/ACGR_2012_REPORT_COMPLETE.pdf. Accessed August 16, 2013.
150. Busin M, Zambianchi L, Arffa RC. Microkeratome-assisted lamellar keratoplasty for the surgical treatment of keratoconus. *Ophthalmology*. 2005;112(6):987-997.
151. Basu S, Sangwan VS. Deep anterior lamellar keratoplasty for resolved hydrops. *Cornea*. 2011;30(9):1067.
152. Anwar M, Teichmann KD. Deep lamellar keratoplasty: surgical techniques for anterior lamellar keratoplasty with and without baring of Descemet's membrane. *Cornea*. 2002;21(4):374-383.
153. Sarnicola V, Toro P, Gentile D, et al. Descemetic DALK and predescemetic DALK: outcomes in 236 cases of keratoconus. *Cornea*. 2010;29(1):53-59.
154. Jones MNA, Armitage WJ, Ayliffe W, et al. Penetrating and deep anterior lamellar keratoplasty for keratoconus: a comparison of graft outcomes in the United Kingdom. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2009;50(12):5625-5629.
155. Han DCY, Mehta JS, Por YM, et al. Comparison of outcomes of lamellar keratoplasty and penetrating keratoplasty in keratoconus. *Am J Ophthalmol*. 2009;148(5):744-751.
156. Javadi MA, Feizi S, Yazdani S, et al. Deep anterior lamellar keratoplasty versus penetrating keratoplasty for keratoconus: a clinical trial. *Cornea*. 2010;29(4):365-371.
157. Kubaloglu A, Sari ES, Unal M, et al. Long-term results of deep anterior lamellar keratoplasty for the treatment of keratoconus. *Am J Ophthalmol*. 2011;151(5):760-767.
158. Keith M, and Hayes S. Corneal cross-linking – a review. *Ophthalmic Physiol Opt*. 2013;33:78–93.
159. Wollensak G, Iomdina E. Long-term biomechanical properties of rabbit cornea after photodynamic collagen crosslinking. *Acta Ophthalmol*. 2009; 87: 48-51.
160. Spoerl E, Wollensak G, Seiler T. Increased resistance of crosslinked cornea against enzymatic digestion. *Curr Eye Res*. 2004; 29:35-40.

161. Stewart J, Lee O-T, Wong F, et al. Crosslinking with ultraviolet-A and riboflavin reduces corneal permeability. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2011;52: 275-9278.
162. Wollensak G, Redl B. Gel electrophoretic analysis of corneal collagen after photodynamic cross-linking treatment. *Cornea.* 2008;27:353–356.
163. Kamaev P, Friedman M, Sherr E, et al. Photochemical kinetics of corneal cross-linking with riboflavin. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2012;53:2360-2367.
164. Kymionis G, Portaliou D. Use of isoptocarpine in corneal collagen crosslinking. *J Cataract Refract Surg.* 2008;34:2008-2009.
165. McCall A, Kraft S, Edelhauser H et al. Mechanisms of corneal tissue cross-linking in response to treatment with topical riboflavin and long-wavelength ultraviolet radiation (UVA). *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2010;51:129-138.
166. Zhang Y, Conrad A, Conrad G. Effects of Ultraviolet-A and riboflavin on the interaction of collagen and proteoglycans during corneal cross-linking. *The J Biol Chem.* 2011;286:13011-13022.
167. Sedaghat M, Naderi M, Zarei-Ghanavati M. Biomechanical parameters of the cornea after collagen crosslinking measures by waveform analysis. *J Cataract Refract Surg.* 2010;36:1728-1731.
168. Bottos K, Dreyfuss J, Regatieri C et al. Immunofluorescence confocal microscopy of porcine corneas following collagen cross-linking treatment with riboflavin and ultravioleta. *A. J Refract Surg.* 2008;24:S715-S719.
169. Wollensak G, Wilsch M, Spoerl , et al. Collagen fiber diameter in the rabbit cornea after collagen crosslinking by riboflavin/UVA. *Cornea.* 2004; 23(5):503-507.
170. Wollensak G, Spoerl E, Reber F, et al. Keratocyte cytotoxicity of riboflavin/UVA-treatment in vitro. *Eye.* 2004;18:718-722.
171. Wollensak G, Aurich H, Wirbelauer , et al. Significance of the riboflavin film in corneal collagen crosslinking. *J Cataract Refract Surg.* 2010;36:114-120.
172. Spoerl E, Mrochen M, Sliney D, et al. Safety of UVA-riboflavin cross-linking of the cornea. *Cornea.* 2007;26:385-389.
173. Mazzotta C, Traversi C, Baiocchi S et al. Corneal healing after riboflavin ultraviolet-A collagen cross-linking determined by confocal laser scanning microscopy in vivo: early and late modifications. *Am J Ophthalmol.* 2008;146:527-533.

174. Thorsrud A, Nicolaisen B, Drolsum L. Corneal collagen crosslinking in vitro: inhibited regeneration of human limbal epithelial cells after riboflavin-ultraviolet-A exposure. *J Cataract Refract Surg.* 2012;38:1072-1076.
175. Xia Y, Chai X, Zhou C & Ren Q. Corneal nerve morphology and sensitivity changes after ultraviolet A/riboflavina treatment. *Exp Eye Res.* 2011;93:541-547.
176. Glickman RD. Ultraviolet Phototoxicity to the Retina. *Eye Contact Lens.* 2011; 37(4):196-205.
177. Rodriguez-Marco NA, Andonegui-Navaro J, Campains-Silva E et al. Optical Coherence Tomography and Macular Phototoxicity. *Arch Soc Esp Oftalmol.* 2008; 83:267-272.
178. Garg SJ, Martidis A, Nelson ML, Sivalingam A. Optical coherence tomography of chronic solar retinopathy. *Am J Ophthalmol.* 2004; 137:351-354.
179. Bechmann M, Ehrt O, Thiel MJ, Kristin N, Ulbig MW, Kampik A. Optical coherence tomography findings in early solar retinopathy. *Br J Ophthalmol.* 2000; 84:547-548.
180. Glickman RD. Phototoxicity to the retina: mechanisms of damage. *Int J Toxicol.* 2002; 21(6): 473-490.
181. Solley WA, Sternberg Jr P. Retinal phototoxicity. *Int Ophthalmol Clin.* 1999; 39(2):1-12.
182. Verma L, Venkatesh P, Tewari HK. Phototoxic retinopathy. *Ophthalmol Clin North Am.* 2001; 14(4): 601-609.
183. Youssef PN, Sheibani N, Albert DM. Retinal light toxicity. *Eye.* 2011; 25:1-14.
184. Goldish Y et al. Safety of Corneal Collagen Cross-linking With UV-A and Riboflavin in Progressive Keratoconus. *Cornea.* 2010; 29:409-411.
185. Ham WT Jr, Mueller HA, Sliney DH. Retinal sensitivity to damage from short wavelength light. *Nature.* 1976; 260:153-155.
186. Spoerl E, Mrochen M, Sliney D et al. Safety of UVA-riboflavin crosslinking of the cornea. *Cornea.* 2007; 26:385-389.
187. Grewal DS, Brar GS, Jain R et al. Corneal collagen crosslinking using riboflavin and ultraviolet-A light for keratoconus:one-year analysis using Scheimpflug imaging. *J Cataract Refract Surg.* 2009; 35:425-432.
188. Koller T, Mrochen M, Seiler T. Complication and failure rates after corneal crosslinking. *J Cataract Refract Surg.* 2009;35:1358-1362.

189. Reeves S, Stinnett S, Adelman R, et al. Risk factors for progression to penetrating keratoplasty in patients with keratoconus. *Am J Ophthalmol.* 2005;140:601-607.
190. Caporossi A, Mazzotta C, Baiocchi S, et al. Longterm results of riboflavin ultraviolet a corneal collagen cross-linking for keratoconus in Italy: the Siena eye cross study. *Am J Ophthalmol.*2010;149:585-593.
191. Santhiago MR. Corneal Crosslinking: The Standard Protocol. *Rev. bras.ofthalmol.* 2017;76:43-49.
192. Hafezi F, Mrochen M, Iseli H, et al. Collagen crosslinking with ultraviolet A and hypoosmolar riboflavina solution in thin corneas. *J Cataract Refract Surg.* 2009;35:621-624.
193. Abad J & Panesso J. Corneal collagen cross-linking induced by UVA and riboflavin (CXL). *Techniques in Ophthalmology.* 2008;6:8-12.
194. Arora R, Jain P, Gupta D, et al. Sterile keratitis after corneal collagen crosslinking in a child. *Cont Lens Anterior Eye.* 2012;35:233-235.
195. Wollensak G, Spoerl E, Seiler T. Riboflavin/Ultraviolet-A-induced collagen crosslinking for the treatment of keratococnus. *Am J Ophthalmol.*2003;135:620-627.
196. Baiocchi S, Mazzotta C, Cerretani D, et al. Corneal crosslinking: riboflavin concentration in corneal stroma exposed with and without epithelium. *J Cataract Refract Surg.* 2009;35:893-899.
197. Samaras KE. Corneal collagen cross linking (CXL): areview. *Int Ophthalmol Clin.*2010;50:89-100.
198. Greenstein S, Fry K, Bhatt J, et al. Natural history of corneal haze after collagen crosslinking for keratoconusand corneal ectasia:scheimpflug and biomicroscopic analysis.*J Cataract Refract Surg.*2010;36:2105-2114.
199. Beckman Rehnman J, Janbaz C, Behndig , et al. Spatialdistribution of corneal light scattering after corneal collagencrosslinking. *J Cataract Refract Surg.*2011;37:1939-1944.
200. Raiskup F, Hoyer A, Spoerl E. Permanent corneal hazeafter riboflavin-UVA-induced cross-linking in keratoconus. *J Refract Surg.* 2009;25:S824-S828.
201. Pollhammer M, Cursiefen C. Bacterial keratitis early after corneal crosslinking with riboflavin and ultraviolet-A. *JCataract Refract Surg.*2009;35:588-589.

202. Kymionis G, Portaliou D, Bouzoukis D et al. Herpetic keratitis with iritis after corneal crosslinking with riboflavin and ultraviolet A for keratoconus. *J Cataract Refract Surg.* 2007;33:1982-1984.
203. Sharma N, Maharana P, Singh G, et al. Pseudomonas keratitis after collagen crosslinking for keratoconus: a case report and review of literature. *J Cataract Refract Surg.* 2010;36:517-520.
204. Perez-Santonja J, Artola A, Javaloy J, et al. Microbial keratitis after corneal collagen crosslinking. *J Cataract Refract Surg.* 2009;35:1138-1140.
205. Rama P, Di Matteo F, Matuska S, et al. Acanthamoeba keratitis with perforation after corneal crosslinking and bandage contact lens use. *J Cataract Refract Surg.* 2009;35:788-791.
206. Angunawela R, Arnalich-Montiel F, Allan B. Peripheral sterile corneal infiltrates and melting after collagen crosslinking for keratoconus. *J Cataract Refract Surg.* 2009;35:606-607.
207. Mas Tur V, MacGregor C, Jayaswal R, et al. A review of keratoconus: Diagnosis, pathophysiology, and genetics. *Survey of Ophthalmology.* 2017;20:770-783.
208. Suri K et al. Corneal collagen cross-linking: ectasia and beyond. *Curr Opin Ophthalmol.* 2012, 23:280–287.
209. Hersh PS, Greenstein SA, Fry KL. Corneal collagen crosslinking for keratoconus and corneal ectasia: One-year results. *J Cataract Refract Surg.* 2011; 37:149–160.
210. Yonekawa Y, Abbey AM, Shah AR, et al. Endoillumination phototoxic maculopathy associated with combined ICG-assisted epiretinal membrane and internal limiting membrane peeling. *Clinical Ophthalmology.* 2014;8:2501-2506.
211. Hood DC, Odel JG, Chen CS, et al. The Multifocal Electroretinogram. *J Neuro-Ophthalmol.* 2003; 23(3).
212. Hood DC, Wladis EJ, Shady S, et al. Multifocal rod electroretinograms. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1998;39:1152-1162.
213. Hood DC, Seiple W, Holopigian K, et al. A comparison of the components of the multifocal and full-field ERGs. *Vis Neurosci.* 1997; 14:533-544.
214. Hood DC, Frishman LJ, Saszik S, et al. Retinal origins of the primate multifocal ERG: implications for the human response. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2002;43:1673-1685.

215. Hasegawa S, Takagi M, Usui T, et al. Waveform changes of the first-order multifocal electroretinogram in patients with glaucoma. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2000;41:1597-603.
216. Hood DC. Assessing retinal function with the multifocal technique. *Prog Ret Eye Res.* 2000;19:607-646.
217. Cellini, M., Gattegna, R., Toschi, P.G. *et al.* Multifocal electroretinogram and Optical Coherence tomography spectral-domain in arc welding macular injury: a case report. *BMC Ophthalmol.* 2011;11,40.
218. Schatz P, Eriksson U, Ponjavic V, et al. Multifocal electroretinography and optical coherence tomography in two patients with solar retinopathy. *Acta Ophthalmol Scand.* 2004;82:476-480.
219. Söderberg PG, Talebizadeh N, Yu Z, Galichanin K. Does infrared or ultraviolet light damage the lens? *Eye.* 2016; 30:241–246.
220. Löfgren S, Söderberg PG. Lens lactate dehydrogenase inactivation after UV-B irradiation: an *in vivo* measure of UVR-B penetration. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2001; 42(8):1833–1836.
221. Hood DC, Frishman LJ, Saszik S, Viswanathan S. Retinal origins of the primate multifocal ERG: implications for the human response. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2002;43:1673–1685.
222. Vinciguerra P, Albé E, Frueh BE, et al. Two-year corneal cross-linking results in patients younger than 18 years with documented progressive keratoconus. *Am J Ophthalmol.* 2012;154:520-526.
223. Padmanabhan P, Rachapalle Reddi S, Rajagopal R, et al. Corneal Collagen Cross-Linking for Keratoconus in Pediatric Patients-Long-Term Results. *Cornea.* 2017;36:138-143.
224. Godefrooij DA, Soeters N, Imhof SM, et al. Corneal Cross-Linking for Pediatric Keratoconus: Long-Term Results. *Cornea.* 2016;35:954-958.
225. Caporossi A, Mazzotta C, Baiocchi S, et al. Riboflavin-UVA-induced corneal collagen cross-linking in pediatric patients. *Cornea.* 2012;31:227-231.
226. Razmjoo H, Ghoreishi S, Mohammadi Z, et al. Comparison of the findings of endothelial specular microscopy before and after corneal cross-linking. *Adv Biomed Res.* 2015;4:52.

227. Du XL, Chen M, Xie LX. Correlation of basic indicators with stages of keratoconus assessed by Pentacam tomography. *Int J Ophthalmol*. 2015;8:1136–1140.
228. Duncan J, Belin M, Borgstrom M. Assessing progression of keratoconus: novel tomographic determinants. *Eye Vis (Lond)*. 2016;3:6.

9. ANEXOS

9.1. Parecer de aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Estadual de Campinas - UNICAMP.

COMITÊ DE ÉTICA EM
PESQUISA DA UNICAMP -
CAMPUS CAMPINAS



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Fototoxicidade Macular Após Cross-Linking Corneano

Pesquisador: Paulo Rodolfo Tagliari Barbisan

Área Temática:

Versão: 3

CAAE: 47833015.0.0000.5404

Instituição Proponente: Hospital de Clínicas da UNICAMP

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio
FUNDAÇÃO DE AMPARO A PESQUISA DO ESTADO DE SÃO PAULO

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.241.616

Apresentação do Projeto:

Adequada. A substância própria da córnea, conhecida também como estroma corneano, apresenta cerca de 500µm de espessura. É considerada um tecido conjuntivo altamente especializado formado por organização e interação precisas entre os colágenos tipo I, VI e XII, principalmente, e os proteoglicanos da matriz. Em uma córnea normal, existem pontes de ligações covalentes cruzadas entre as moléculas de colágeno que compõem a espessura estromal e que são essenciais para que o tecido conjuntivo corneano ofereça adequada resistência à tensão. Sabe-se que com o envelhecimento há mudanças nas propriedades biomecânicas do tecido da córnea devido ao aumento fisiológico dessas ligações cruzadas colágenas. Certas condições, a exemplo do diabetes, aumentam o processo de glicosilação do colágeno corneano que ocorre com o avançar da idade corroborando, assim, para a perda de flexibilidade do tecido corneano. Sabe-se que alterações na organização fisiológica do estroma corneano levam ao desenvolvimento de ectasias corneanas, sendo o ceratocone a mais comum delas. O ceratocone é uma desordem degenerativa caracterizada por afinamento da córnea paracentral e pela presença de astigmatismo irregular. É uma condição tipicamente bilateral e assimétrica, sem preferência por raça ou sexo, que se desenvolve na puberdade e que progride por cerca de 10 a 20 anos quando apresenta estabilização do quadro clínico. A etiologia do ceratocone não está claramente definida, mas se

Endereço: Rua Tessália Vieira de Camargo, 126
Bairro: Barão Geraldo CEP: 13.083-887
UF: SP Município: CAMPINAS
Telefone: (19)3521-8936 Fax: (19)3521-7187 E-mail: cep@fcm.unicamp.br

COMITÊ DE ÉTICA EM
PESQUISA DA UNICAMP -
CAMPUS CAMPINAS



Continuação do Parecer: 1.241.818

acredita que fatores genéticos, bioquímicos, físicos e ambientais estão envolvidos na patogênese da doença. Em recentes estudos moleculares evidenciou-se atividade aumentada de enzimas proteolíticas e redução dos inibidores de proteases o que resultava em incremento da digestão de proteínas estromais e perda da estabilidade biomecânica da córnea. Essa ectasia pode ser condição clínica isolada, como acontece na maioria dos casos, ou pode estar associada a afecções sistêmicas e oculares, tais como conjuntivite vernal, uso crônico de lentes de contato, retinose pigmentar, síndrome de Down e Turner e desordens do tecido conectivo a exemplo das síndromes de Marfan e Ehlers-Danlos e osteogênese imperfecta. O tratamento do ceratocone se baseia na gravidade e na extensão do astigmatismo irregular e visa a melhora da acuidade visual sem, entretanto, impedir a progressão da doença. Ele consiste em uso de óculos e lentes de contato gelatinosas tóricas nos casos iniciais e adaptação de lentes de contato rígidas gás-permeáveis à medida que a doença avança. Segundo a literatura, em cerca de 15 a 20% dos pacientes com ceratocone é necessária intervenção cirúrgica (ceratoplastia) devido à intolerância ao uso de lentes de contato, cicatrizes e afinamento corneanos importantes. O advento do Cross-linking com riboflavina e luz UVA (CXL) revolucionou o tratamento do ceratocone. O CXL para estabilização biomecânica da córnea ainda é o único método capaz de interromper a progressão do ceratocone. No procedimento descrito, a riboflavina (vitamina B2) absorve a luz UVA com comprimento de onda de 370nm e age como foto sensibilizador que produz radicais livres de oxigênio. Esses radicais livres ativam as vias naturais da lisil e transglutaminase oxidase induzindo, assim, a formação de novas ligações cruzadas entre as fibras e fibrilas de colágeno. Desse modo, ao aumentar ativamente a interação entre as moléculas de colágeno, o CXL amplia a rigidez corneana e potencialmente diminui e, em alguns casos, interrompe a progressão do ceratocone. Recentemente pesquisas evidenciaram novos mecanismos envolvidos a formação de ligação cruzadas entre as fibrilas de colágeno após a utilização do CXL. São exemplos desses mecanismos a produção de imidazolina, capaz de se ligar a moléculas como a histidina e formar ligações covalentes, a liberação de grupos carbonil com potencial de aumentar as ligações cruzadas além da presença de 2,3-butanediona, produto da degradação da própria riboflavina, que reage com grupos carbonil das proteínas estromais. Com algumas pequenas variações a depender do serviço onde se realiza o CXL, o protocolo clínico consiste em anestesia tópica pré-operatória associada a debridamento epitelial em 9mm corneanos centrais. São aplicadas gotas de solução de riboflavina 0,1% a cada 2-3 minutos durante 30 minutos. É realizada biomicroscopia para confirmar a presença de riboflavina na câmara anterior e realizada paquimetria para confirmar que a espessura estromal é maior que 400m. Radiação UVA (370nm com 3mW/cm² de energia) é aplicada a 1cm

Endereço: Rua Tessália Vieira de Camargo, 126
Bairro: Barão Geraldo CEP: 13.083-887
UF: SP Município: CAMPINAS
Telefone: (19)3521-8936 Fax: (19)3521-7187 E-mail: cep@fcm.unicamp.br

COMITÊ DE ÉTICA EM
PESQUISA DA UNICAMP -
CAMPUS CAMPINAS



Continuação do Parecer: 1.241.616

de distância da córnea durante 30 minutos, resultando em uma dose total de 3,4J (5,4J/cm²). Novas administrações de riboflavina são realizadas a cada 2-3 minutos durante o tratamento e checada a espessura corneana cada 5 minutos para confirmar que seu valor é maior que 400m. Sabe-se que radiação UVA é citotóxica e pode induzir danos a estruturas intraoculares como células endoteliais, cristalino e retina. A radiação visível e ultravioleta (UV) tem o potencial para danificar a retina e o epitélio pigmentar da retina (EPR) como mostram estudos e a literatura. Reações adversas indesejáveis compreendem a geração de espécies reativas de oxigênio potencialmente prejudiciais dentro das estruturas da retina altamente vulneráveis. Os estudos demonstraram que duas camadas distintas da retina são altamente susceptíveis a lesão fotoquímica, os segmentos externos de fotorreceptores e EPR, sendo este dano mediado por pigmentos visuais e lipofuscina, respectivamente. Pesquisas em animais sugerem que existam dois tipos distintos de danos fotoquímicos, um associado com exposições curtas que operam ao nível do EPR e o outro associado com exposições mais longas, ao nível dos segmentos externos dos fotorreceptores. Exposições curtas, de até cerca de 12 h, com luzes de curto comprimento de onda, podem produzir danos no nível do EPR em primatas. Exposições mais longas (em geral, 12-48 h) produzem danos ao nível dos fotorreceptores. Resultados similares foram obtidos em jovens primatas em que os cones se mostraram mais vulneráveis do que os bastonetes, apresentando degeneração após uma exposição de 12 h quando a irradiação da retina estava entre 195 e 361 mW/cm². Estudos realizados em modelos animais e celulares foram capazes de demonstrar a toxicidade da luz ultravioleta (UV), nas células do EPR e fotorreceptores. Experiências in vivo revelaram que os danos fotoquímicos exibem limiares de dose mais baixos nos UVs e na gama azul do que para a luz verde ou vermelha sobre a retina de macaco, ratos e coelhos. Por outro lado, olhos humanos possuem estruturas naturais que podem exercer função protetora ao dano fotoquímico. Os comprimentos de onda mais curtos de radiações não-ionizantes podem ser impedidos de atingir a retina pela córnea e cristalino. A córnea absorve comprimentos de onda inferiores a 295nm, enquanto o cristalino absorve parte de luz UV-B (300-315nm) e UV-A (315-400nm). O vítreo absorve a luz acima de 1400nm (1400-10000nm). Assim sendo, grande parte das radiações ultravioleta podem ser filtradas antes de atingir as camadas retinianas se o olho estiver em condições de exposição a essas luzes. Alguns trabalhos demonstram que 85-90% da radiação UVA utilizada no atual protocolo de tratamento com CXL é absorvida pela riboflavina nos 400m anteriores do estroma corneano e que a densidade de radiação residual que atinge as demais estruturas corresponde a menos de 1 J/cm². Dessa forma, a dose que atinge o endotélio da córnea corresponde a menos de 50% do nível considerado tóxico para essa estrutura enquanto

Endereço: Rua Tessália Vieira de Camargo, 126
Bairro: Barão Geraldo CEP: 13.083-887
UF: SP Município: CAMPINAS
Telefone: (19)3521-8936 Fax: (19)3521-7187 E-mail: cep@fcm.unicamp.br

COMITÊ DE ÉTICA EM
PESQUISA DA UNICAMP -
CAMPUS CAMPINAS



Continuação do Parecer: 1.241.616

que a radiação UVA que chega ao cristalino e à retina condiz com menos de 3% do limiar citotóxico para essas estruturas. Esses dados se encontram dentro dos limites propostos por guidelines que versam sobre segurança com uso de radiação. Embora sejam encontrados muitos estudos sobre os efeitos do CXL no segmento anterior do olho, a literatura ainda é escassa ao descrever as possíveis alterações retinianas decorrentes deste procedimento. Apesar de já ter sido descrito que a exposição a radiação do segmento posterior é inferior aos limiares de dano potencial, novos estudos são necessários para descrever as possíveis alterações estruturais e/ou funcionais que possam ser observadas na retina em razão do uso do CXL na córnea. Dessa maneira, o objetivo desse estudo é de avaliar estruturalmente e funcionalmente a região macular após a terapêutica do uso do CXL em pacientes portadores de ceratocone e tentar detectar algum possível dano estrutural e/ou funcional à região macular e/ou foveal ainda não demonstrada e em teoria inexistente. A avaliação funcional da região macular será realizada através do Eletroretinograma Multifocal (mERG) atualmente utilizado para avaliar a função visual selecionando respostas eletrofisiológicas de vários locais da retina da área macular e já permitiu aos investigadores demonstrar anormalidades funcionais em várias doenças da retina. Por sua vez, para avaliação estrutural da região macular será utilizado a Tomografia de Coerência Óptica de Domínio Espectral (SD-OCT), que permite a visualização da estrutura retiniana in vivo. Por fim, a Angiofluoresceinografia Retiniana (AFG) será utilizada para análise da estrutura vascular da retina. Até onde sabemos será o primeiro estudo com essas características realizado no Brasil.

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário:

- Avaliar estruturalmente a região macular após a terapêutica do uso do CXL em pacientes portadores de Ceratocone e tentar detectar algum possível dano estrutural com o uso SD-OCT.
- Avaliar estruturalmente a região macular após a terapêutica do uso do CXL em pacientes portadores de Ceratocone e tentar detectar algum possível dano vascular com o uso da AFG.
- Avaliar funcionalmente a região macular após a terapêutica do uso do CXL em pacientes portadores de Ceratocone e tentar detectar algum possível dano funcional com o uso do mERG.

Objetivo Secundário:

- Análise de mudança de espessura ou presença de alteração da arquitetura retiniana na região foveal e macular através do SD-OCT, comparando-se os exames antes e após a terapêutica do uso do CXL em pacientes portadores de Ceratocone.
- Análise de mudança de padrões vasculares e preenchimento capilar, venoso e coroideo na região foveal e macular através da AFG, comparando-se os exames antes e após a terapêutica do uso do

Endereço: Rua Tessália Vieira de Camargo, 126
Bairro: Barão Geraldo CEP: 13.083-887
UF: SP Município: CAMPINAS
Telefone: (19)3521-8936 Fax: (19)3521-7187 E-mail: cep@fcm.unicamp.br

COMITÊ DE ÉTICA EM
PESQUISA DA UNICAMP -
CAMPUS CAMPINAS



Continuação do Parecer: 1.241.616

CXL em pacientes portadores de Ceratocone.

•Análise de alterações dos padrões eletrorretinográficos na região foveal e macular através do mERG, comparando-se os exames antes e após a terapêutica do uso do CXL em pacientes portadores de Ceratocone.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos:

A Angiofluoresceinografia (AFG) é um procedimento diagnóstico que utiliza 5ml de um corante, a fluoresceína sódica, injetado numa veia do antebraço. O contraste fluoresceína sódica é utilizado há muito tempo, sendo considerado bastante seguro e não contém iodo. O exame de AFG não é, portanto, contraindicado para pacientes alérgicos a iodo e eliminação do contraste é rápida e realizada pelo rim. Após a injeção do contraste a pele pode se tornar amarelada por algumas horas devido à impregnação dos tecidos superficiais da pele pelo corante, mas essa coloração desaparece à medida que o corante é eliminado pelos rins. A urina costuma ficar verde-amarelada por um período de 24 a 48 horas após o exame devido à coloração do corante. Se o corante extravasa da veia durante a injeção, pode haver leve sensação de queimação no local com melhora rápida após lavagem com água corrente e sem maiores consequências. São eventualmente descritas queixas passageiras de náuseas, vômitos, tonturas durante a injeção do contraste. Reações alérgicas ao corante são muito raras, sendo a mais comum delas o prurido (coceira), facilmente tratado com medicamentos antialérgicos via oral.

Benefícios:

Aparentemente não há benefícios diretos aos sujeitos de pesquisa. Há benefício social, já que a avaliação de possíveis danos à região macular da retina, passíveis de mudanças futuras na metodologia do tratamento do ceratocone com Cross-Linking.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

O protocolo está bem escrito, detalhado e claro. A metodologia é adequada e factível. A amostra estudada será constituída por pacientes com idade acima de 15 anos completos portadores de ceratocone que frequentam o Ambulatório de Ceratocone no setor de Oftalmologia do Departamento de Oftalmologia-Otorrinolaringologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas – FCM – UNICAMP e que, em ao menos um olho, possua indicação de tratamento com crosslinking corneano. Como rotina, todos os pacientes avaliados no setor de ceratocone são submetidos a avaliação oftalmológica completa composta por: anamnese; acuidade visual com melhor correção; refração dinâmica; biomicroscopia de

Endereço: Rua Tessália Vieira de Camargo, 126
Bairro: Barão Geraldo CEP: 13.083-887
UF: SP Município: CAMPINAS
Telefone: (19)3521-8936 Fax: (19)3521-7187 E-mail: cep@fcm.unicamp.br

COMITÊ DE ÉTICA EM
PESQUISA DA UNICAMP -
CAMPUS CAMPINAS



Continuação do Parecer: 1.241.818

seguimento anterior; tonometria de aplanção; biomicroscopia de fundo. Os pacientes que apresentem os critérios de inclusão serão convidados a assinar o TCLE a fim de se tornarem integrantes voluntários do estudo. Após orientações e informações sobre os potenciais riscos e benefícios do projeto, caso aceitem participar e assinem o referido termo terão seus dados catalogados em ficha específica. As avaliações clínicas durante o estudo serão compostas por: visita inicial, realização do tratamento de CXL com riboflavina e UVA, visitas de acompanhamento nos primeiro, sétimo e trigésimo dias pós-operatório. Em visita inicial (visita 1) os procedimentos a serem realizados consistem em anamnese, medida da acuidade visual com melhor correção, exame de refração dinâmica, tonometria de aplanção, biomicroscopia de seguimento anterior, biomicroscopia de fundo, retinografia, angiofluoresceinografia (AFG), Tomografia de Coerência Óptica (SD-OCT) e Eletroretinograma Multifocal (mERG). Conforme citado, esses procedimentos, a exceção da retinografia, AFG e SD-OCT, são realizados de rotina no ambulatório de Ceratocone. Caso os pacientes concordem com a participação no estudo, os dados dessa consulta serão catalogados como visita inicial e eles realizarão a retinografia, AFG e SD-OCT no Setor de Retina e Vítreo do Departamento de Oftalmologia-Otorrinolaringologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas e o exame de mERG na Clínica Quagliato em Campinas-SP, para que as etapas dessa visita sejam completadas e, em seguida, darão seguimento ao protocolo do estudo. A visita 2 consiste na realização do procedimento do CXL com riboflavina e UVA. Esse procedimento é realizado no Laser Campinas-Centro de Cirurgia Refrativa, em Campinas, clínica conveniada com o Departamento de Oftalmologia-Otorrinolaringologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas. A visita 3 consiste na visita de acompanhamento no primeiro dia pós operatório (1o DPO) após a realização do CXL consiste, rotineiramente, em anamnese e biomicroscopia de seguimento anterior. Durante a participação do estudo, os pontos a serem avaliados durante essa visita serão exatamente os mesmos. Durante a visita 4, a visita de acompanhamento no sétimo dia pós operatório (7o DPO), serão avaliados os seguintes pontos, semelhante a visita inicial: anamnese, medida da acuidade visual com melhor correção, exame de refração dinâmica, tonometria de aplanção, biomicroscopia de seguimento anterior, biomicroscopia de fundo, AFG, SD-OCT e mERG. Por sua vez, a visita 5, visita de acompanhamento no trigésimo dia pós operatório (30o DPO), serão realizadas anamnese, medida da acuidade visual com melhor correção, exame de refração dinâmica, tonometria de aplanção, biomicroscopia de seguimento anterior, biomicroscopia de fundo, SD-OCT, AFG caso exame realizado no 7o DPO esteja alterado e mERG caso exame realizado no 7o DPO esteja alterado.

Endereço: Rua Tessália Vieira de Camargo, 126
Bairro: Barão Geraldo CEP: 13.083-887
UF: SP Município: CAMPINAS
Telefone: (19)3521-8936 Fax: (19)3521-7187 E-mail: cep@fcm.unicamp.br

**COMITÊ DE ÉTICA EM
PESQUISA DA UNICAMP -
CAMPUS CAMPINAS**



Continuação do Parecer: 1.241.616

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Além do relatório de pesquisa, foi encaminhada a folha de rosto da CONEP assinada pela pesquisadora e complementada por autorização do Coordenador de Assistência do Hospital das Clínicas da Unicamp. Foi encaminhada, também, a autorização para a realização de exames na Clínica Quagliato, onde uma parte da pesquisa será realizada, assinada pelo responsável. Com relação ao TCLE, a linguagem é clara. No TCLE constam o título completo da pesquisa e o nome do pesquisador responsável. Constam a justificativa, uma descrição dos procedimentos envolvidos, riscos e benefícios. Está explicado como será feito o acompanhamento, e que poderá haver esclarecimentos se necessário. Está claro o direito de recusa, e que a recusa não acarretará em consequências para o tratamento do paciente. Está claro que haverá confidencialidade dos dados. Está claro no TCLE que o sujeito irá receber uma via. Há dados do CEP e formas de contato com o pesquisador. Foi encaminhado o termo de assentimento para que os menores que participarão da pesquisa manifestem sua concordância em participar.

Recomendações:

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Aprovado.

Com relação à pendência anterior:

Favor verificar como formular um termo de assentimento, que não é um termo de consentimento. Tais participantes devem ser esclarecidos sobre a natureza da pesquisa, seus objetivos, métodos, benefícios previstos, potenciais riscos e o incômodo que esta possa lhes acarretar, na medida de sua compreensão e respeitados em suas singularidades.

Considerações Finais a critério do CEP:

- O sujeito de pesquisa deve receber uma via do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, na íntegra, por ele assinado.

- O sujeito da pesquisa tem a liberdade de recusar-se a participar ou de retirar seu consentimento em qualquer fase da pesquisa, sem penalização alguma e sem prejuízo ao seu cuidado.

- O pesquisador deve desenvolver a pesquisa conforme delineada no protocolo aprovado. Se o pesquisador considerar a descontinuação do estudo, esta deve ser justificada e somente ser

Endereço: Rua Tessália Vieira de Camargo, 126
 Bairro: Barão Geraldo CEP: 13.083-887
 UF: SP Município: CAMPINAS
 Telefone: (19)3521-8936 Fax: (19)3521-7187 E-mail: cep@fcm.unicamp.br

COMITÊ DE ÉTICA EM
PESQUISA DA UNICAMP -
CAMPUS CAMPINAS



Continuação do Parecer: 1.241.616

realizada após análise das razões da descontinuidade pelo CEP que o aprovou. O pesquisador deve aguardar o parecer do CEP quanto à descontinuação, exceto quando perceber risco ou dano não previsto ao sujeito participante ou quando constatar a superioridade de uma estratégia diagnóstica ou terapêutica oferecida a um dos grupos da pesquisa, isto é, somente em caso de necessidade de ação imediata com intuito de proteger os participantes.

- O CEP deve ser informado de todos os efeitos adversos ou fatos relevantes que alterem o curso normal do estudo. É papel do pesquisador assegurar medidas imediatas adequadas frente a evento adverso grave ocorrido (mesmo que tenha sido em outro centro) e enviar notificação ao CEP e à Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA – junto com seu posicionamento.

- Eventuais modificações ou emendas ao protocolo devem ser apresentadas ao CEP de forma clara e sucinta, identificando a parte do protocolo a ser modificada e suas justificativas. Em caso de projetos do Grupo I ou II apresentados anteriormente à ANVISA, o pesquisador ou patrocinador deve enviá-las também à mesma, junto com o parecer aprovatório do CEP, para serem juntadas ao protocolo inicial.

- Relatórios parciais e final devem ser apresentados ao CEP, inicialmente seis meses após a data deste parecer de aprovação e ao término do estudo.

- Lembramos que segundo a Resolução 466/2012, item XI.2 letra e, "cabe ao pesquisador apresentar dados solicitados pelo CEP ou pela CONEP a qualquer momento".

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto Detalhado.pdf	12/07/2015 22:08:15		Aceito
Outros	Ficha Clínica-ANEXO 3.pdf	12/07/2015 22:22:39		Aceito
Folha de Rosto	Folha de Rosto.pdf	16/07/2015 11:28:30		Aceito
Declaração de	anexo 4.pdf	16/07/2015		Aceito

Endereço: Rua Tessália Vieira de Camargo, 126
Bairro: Barão Geraldo CEP: 13.083-887
UF: SP Município: CAMPINAS
Telefone: (19)3521-8936 Fax: (19)3521-7187 E-mail: cep@fcm.unicamp.br

**COMITÊ DE ÉTICA EM
PESQUISA DA UNICAMP -
CAMPUS CAMPINAS**



Continuação do Parecer: 1.241.616

Instituição e Infraestrutura	anexo 4.pdf	11:30:14		Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	anexo 5.pdf	16/07/2015 11:30:35		Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	anexo 6.pdf	16/07/2015 11:31:02		Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_ANEXO_2_modificado.pdf	04/09/2015 11:24:37	Paulo Rodolfo Tagliari Barbisan	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_ANEXO_1_modificado.pdf	04/09/2015 11:25:52	Paulo Rodolfo Tagliari Barbisan	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	anexo_7_modificado.pdf	04/09/2015 11:26:31	Paulo Rodolfo Tagliari Barbisan	Aceito
Outros	RESPOSTAS_AO_CEP.pdf	04/09/2015 11:27:09	Paulo Rodolfo Tagliari Barbisan	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TermodeAssentimento_ANEXO8.pdf	16/09/2015 19:53:42	Paulo Rodolfo Tagliari Barbisan	Aceito
Outros	RESPOSTAS_AO_CEP2.pdf	16/09/2015 19:54:17	Paulo Rodolfo Tagliari Barbisan	Aceito
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BASICAS_DO_PROJETO_550474.pdf	16/09/2015 19:54:32		Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

CAMPINAS, 23 de Setembro de 2015

Assinado por:
Renata Maria dos Santos Celeghini
(Coordenador)

Endereço: Rua Tessália Vieira de Camargo, 126
Bairro: Barão Geraldo CEP: 13.083-887
UF: SP Município: CAMPINAS
Telefone: (19)3521-8936 Fax: (19)3521-7187 E-mail: cep@fcm.unicamp.br

9.2. Permissão junto à editora para a inclusão do artigo “*Macular Phototoxicity after Corneal Cross-Linking*” na tese, em atendimento à legislação que rege o direito autoral.



Marketplace™

Dove Medical Press Ltd. - License Terms and Conditions

Order Date	20-Jan-2020
Order license ID	1014501-1
ISSN	1177-5483
Type of Use	Republish in a thesis/dissertation
Publisher	Dove Medical Press Limited
Portion	Chapter/article

LICENSED CONTENT

Publication Title	Clinical Ophthalmology	Rightsholder	Dove Medical Press Ltd.
Article Title	Macular phototoxicity after corneal cross-linking.	Publication Type	e-journal
Author/Editor	Society for Clinical Ophthalmology (Great Britain)	Start Page	1801
Date	01/01/2007	End Page	1807
Language	English	Volume	12
Country	New Zealand	URL	http://www.dovepress.com/clinical-ophthalmology-journal

REQUEST DETAILS

Portion Type	Chapter/article	Rights Requested	Main product
Page range(s)	1801-1807	Distribution	Worldwide
Total number of pages	7	Translation	Original language of publication
Format (select all that apply)	Print	Copies for the disabled?	No
Who will republish the content?	Author of requested content	Minor editing privileges?	No
Duration of Use	Life of current edition	Incidental promotional use?	No
Lifetime Unit Quantity	Up to 499	Currency	USD

NEW WORK DETAILS

Title	CORNEAL CROSS-LINKING - NEW INDICATIONS AND EFFECTS ON OTHER EYE STRUCTURES	Institution name	State University of Campinas
Instructor name	Carlos Eduardo Leite Arieta	Expected presentation date	2020-02-19

ADDITIONAL DETAILS

Order reference number	N/A	The requesting person / organization to appear on the license	Paulo Rodolfo Tagliari Barbisan
------------------------	-----	---	---------------------------------

REUSE CONTENT DETAILS

Title, description or numeric reference of the portion(s)	Macular phototoxicity after corneal cross-linking.	Title of the article/chapter the portion is from	Macular phototoxicity after corneal cross-linking.
---	--	--	--

9.3. Permissão junto à editora para a inclusão do artigo “*Corneal Cross-Linking in Young Patients for Progressive Keratoconus*” na tese, em atendimento à legislação que rege o direito autoral.



Special Requests > Special Request Details

Cancel Request

Cornea

GENERAL INFORMATION

Request ID	Request Date
600005432	20 Jan 2020
Request Status	
Awaiting Customer Reply	

ALL DETAILS

COMMENTS

Add Comment / Attachment

23 Jan 2020 5:08:13 PM, by Jenna Silliboy

Hello Paulo,

Thank you for your permissions query. Please be advised that the final published article may not be used in the thesis at any time. Wolters Kluwer policy permits only the final peer-reviewed manuscript of the article to be reused in a thesis. You are free to use the final peer-reviewed manuscript in your print thesis only. After the 12 month embargo period has passed on your article, the final peer-reviewed manuscript may appear in your electronic thesis. The content may only appear in the electronic version if the electronic thesis is to be password protected online.

Since your article published online in Cornea in the Feb 2020 issue, the final peer-reviewed manuscript may not appear in your online thesis until Feb 2021. These policies are outlined in the Copyright Transfer Agreement signed upon publication, and are also outlined in our Author Guidelines.

If you have questions, please let me know. You do not need a written permission to use your manuscript.

Best,
Jenna

[View Less](#)

20 Jan 2020 6:59:12 PM, by Paulo Rodolfo Barbisan

Title of the article requested: "Corneal Collagen Cross-Linking in Young Patients for Progressive Keratoconus."

9.4. Permissão junto à editora para a inclusão da Figura 9. (Figure 9B): Hood DC, Frishman LJ, Saszik S, et al. Retinal origins of the primate multifocal ERG: implications for the human response. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2002; 43:1673–1685.; em atendimento à legislação que rege o direito autoral.

12/03/2020 <https://marketplace.copyright.com/rs-ui-web/mp/license/3c76566a-5a4a-4132-8ef2-e8545616ce91/1ce121e5-7b51-421f-a398-35d...>



Association for Research in Vision & Ophthalmology (ARVO) - License Terms and Conditions

Order Date	12-Mar-2020
Order license ID	1022822-1
ISSN	1552-5783
Type of Use	Republish in a thesis/dissertation
Publisher	ASSOCIATION FOR RESEARCH IN VISION AND OPHTHALMOLOGY
Portion	Image/photo/illustration

LICENSED CONTENT

Publication Title	Investigative ophthalmology & visual science	Country	United States of America
Author/Editor	Association for Research in Vision and Ophthalmology.	Rightsholder	Association for Research in Vision & Ophthalmology (ARVO)
Date	01/01/1977	Publication Type	e-Journal
Language	English	URL	http://www.iovs.org/

REQUEST DETAILS

Portion Type	Image/photo/illustration	Distribution	Worldwide
Number of images / photos / illustrations	1	Translation	Original language of publication
Format (select all that apply)	Electronic	Copies for the disabled?	No
Who will republish the content?	Academic institution	Minor editing privileges?	No
Duration of Use	Life of current and all future editions	Incidental promotional use?	No
Lifetime Unit Quantity	Up to 499	Currency	USD
Rights Requested	Main product and any product related to main product		

NEW WORK DETAILS

Title	Corneal Cross-Linking: Early indications and side effects in the retina	Institution name	State University of Campinas
Instructor name	Carlos Eduardo Leite Arieta	Expected presentation date	2020-04-29

ADDITIONAL DETAILS

Order reference number	N/A	The requesting person / organization to appear on the license	Paulo Rodolfo Tagliari Barbisan
------------------------	-----	---	---------------------------------

REUSE CONTENT DETAILS

12/03/2020 <https://marketplace.copyright.com/rs-ui-web/mp/license/3c76566a-5a4a-4132-8ef2-e8545616ce91/1ce121e5-7b51-421f-a398-35d...>

Title, description or numeric reference of the portion(s)	Figure 9B	Title of the article/chapter the portion is from	Retinal Origins of the Primate Multifocal ERG: Implications for the Human Response
Editor of portion(s)	N/A	Author of portion(s)	Association for Research in Vision and Ophthalmology.
Volume of serial or monograph	Volume 43	Issue, if republishing an article from a serial	Issue 5
Page or page range of portion	Figure 9B	Publication date of portion	2002-05-01

PUBLISHER SPECIAL TERMS AND CONDITIONS

A reprint of this material must include a full article citation and acknowledge ARVO as the copyright holder.

CCC Reproduction Terms and Conditions

1. Description of Service; Defined Terms. This Reproduction License enables the User to obtain licenses for reproduction of one or more copyrighted works as described in detail on the relevant Order Confirmation (the "Work(s)"). Copyright Clearance Center, Inc. ("CCC") grants licenses through the Service on behalf of the rightsholder identified on the Order Confirmation (the "Rightsholder"). "Reproduction", as used herein, generally means the inclusion of a Work, in whole or in part, in a new work or works, also as described on the Order Confirmation. "User", as used herein, means the person or entity making such reproduction.
2. The terms set forth in the relevant Order Confirmation, and any terms set by the Rightsholder with respect to a particular Work, govern the terms of use of Works in connection with the Service. By using the Service, the person transacting for a reproduction license on behalf of the User represents and warrants that he/she/it (a) has been duly authorized by the User to accept, and hereby does accept, all such terms and conditions on behalf of User, and (b) shall inform User of all such terms and conditions. In the event such person is a "freelancer" or other third party independent of User and CCC, such party shall be deemed jointly a "User" for purposes of these terms and conditions. In any event, User shall be deemed to have accepted and agreed to all such terms and conditions if User reproduces the Work in any fashion.
3. Scope of License; Limitations and Obligations.
 - 3.1. All Works and all rights therein, including copyright rights, remain the sole and exclusive property of the Rightsholder. The license created by the exchange of an Order Confirmation (and/or any invoice) and payment by User of the full amount set forth on that document includes only those rights expressly set forth in the Order Confirmation and in these terms and conditions, and conveys no other rights in the Work(s) to User. All rights not expressly granted are hereby reserved.
 - 3.2. General Payment Terms: You may pay by credit card or through an account with us payable at the end of the month. If you and we agree that you may establish a standing account with CCC, then the following terms apply: Remit Payment to: Copyright Clearance Center, 29118 Network Place, Chicago, IL 60673-1291. Payments Due: Invoices are payable upon their delivery to you (or upon our notice to you that they are available to you for downloading). After 30 days, outstanding amounts will be subject to a service charge of 1-1/2% per month or, if less, the maximum rate allowed by applicable law. Unless otherwise specifically set forth in the Order Confirmation or in a separate written agreement signed by CCC, invoices are due and payable on "net 30" terms. While User may exercise the rights licensed immediately upon issuance of the Order Confirmation, the license is automatically revoked and is null and void, as if it had never been issued, if complete payment for the license is not received on a timely basis either from User directly or through a payment agent, such as a credit card company.
 - 3.3. Unless otherwise provided in the Order Confirmation, any grant of rights to User (i) is "one-time" (including the editions and product family specified in the license), (ii) is non-exclusive and non-transferable and (iii) is subject to any and all limitations and restrictions (such as, but not limited to, limitations on duration of use or circulation) included in the Order Confirmation or invoice and/or in these terms and conditions. Upon completion of the licensed use, User shall either secure a new permission for further use of the Work(s) or immediately cease any new use of the Work(s) and shall render inaccessible (such as by deleting or by removing or severing links or other locators) any further copies of the Work (except for copies printed on paper in accordance with this license and still in User's stock at the end of such period).

<https://marketplace.copyright.com/rs-ui-web/mp/license/3c76566a-5a4a-4132-8ef2-e8545616ce91/1ce121e5-7b51-421f-a398-35d5fa05bf75>

- 3.4. In the event that the material for which a republication license is sought includes third party materials (such as photographs, illustrations, graphs, inserts and similar materials) which are identified in such material as having been used by permission, User is responsible for identifying, and seeking separate licenses (under this Service or otherwise) for, any of such third party materials; without a separate license, such third party materials may not be used.
- 3.5. Use of proper copyright notice for a Work is required as a condition of any license granted under the Service. Unless otherwise provided in the Order Confirmation, a proper copyright notice will read substantially as follows: "Republished with permission of [Rightsholder's name], from [Work's title, author, volume, edition number and year of copyright]; permission conveyed through Copyright Clearance Center, Inc. " Such notice must be provided in a reasonably legible font size and must be placed either immediately adjacent to the Work as used (for example, as part of a by-line or footnote but not as a separate electronic link) or in the place where substantially all other credits or notices for the new work containing the republished Work are located. Failure to include the required notice results in loss to the Rightsholder and CCC, and the User shall be liable to pay liquidated damages for each such failure equal to twice the use fee specified in the Order Confirmation, in addition to the use fee itself and any other fees and charges specified.
- 3.6. User may only make alterations to the Work if and as expressly set forth in the Order Confirmation. No Work may be used in any way that is defamatory, violates the rights of third parties (including such third parties' rights of copyright, privacy, publicity, or other tangible or intangible property), or is otherwise illegal, sexually explicit or obscene. In addition, User may not conjoin a Work with any other material that may result in damage to the reputation of the Rightsholder. User agrees to inform CCC if it becomes aware of any infringement of any rights in a Work and to cooperate with any reasonable request of CCC or the Rightsholder in connection therewith.
4. Indemnity. User hereby indemnifies and agrees to defend the Rightsholder and CCC, and their respective employees and directors, against all claims, liability, damages, costs and expenses, including legal fees and expenses, arising out of any use of a Work beyond the scope of the rights granted herein, or any use of a Work which has been altered in any unauthorized way by User, including claims of defamation or infringement of rights of copyright, publicity, privacy or other tangible or intangible property.
5. Limitation of Liability. UNDER NO CIRCUMSTANCES WILL CCC OR THE RIGHTSHOLDER BE LIABLE FOR ANY DIRECT, INDIRECT, CONSEQUENTIAL OR INCIDENTAL DAMAGES (INCLUDING WITHOUT LIMITATION DAMAGES FOR LOSS OF BUSINESS PROFITS OR INFORMATION, OR FOR BUSINESS INTERRUPTION) ARISING OUT OF THE USE OR INABILITY TO USE A WORK, EVEN IF ONE OF THEM HAS BEEN ADVISED OF THE POSSIBILITY OF SUCH DAMAGES. In any event, the total liability of the Rightsholder and CCC (including their respective employees and directors) shall not exceed the total amount actually paid by User for this license. User assumes full liability for the actions and omissions of its principals, employees, agents, affiliates, successors and assigns.
6. Limited Warranties. THE WORK(S) AND RIGHT(S) ARE PROVIDED "AS IS". CCC HAS THE RIGHT TO GRANT TO USER THE RIGHTS GRANTED IN THE ORDER CONFIRMATION DOCUMENT. CCC AND THE RIGHTSHOLDER DISCLAIM ALL OTHER WARRANTIES RELATING TO THE WORK(S) AND RIGHT(S), EITHER EXPRESS OR IMPLIED, INCLUDING WITHOUT LIMITATION IMPLIED WARRANTIES OF MERCHANTABILITY OR FITNESS FOR A PARTICULAR PURPOSE. ADDITIONAL RIGHTS MAY BE REQUIRED TO USE ILLUSTRATIONS, GRAPHS, PHOTOGRAPHS, ABSTRACTS, INSERTS OR OTHER PORTIONS OF THE WORK (AS OPPOSED TO THE ENTIRE WORK) IN A MANNER CONTEMPLATED BY USER; USER UNDERSTANDS AND AGREES THAT NEITHER CCC NOR THE RIGHTSHOLDER MAY HAVE SUCH ADDITIONAL RIGHTS TO GRANT.
7. Effect of Breach. Any failure by User to pay any amount when due, or any use by User of a Work beyond the scope of the license set forth in the Order Confirmation and/or these terms and conditions, shall be a material breach of the license created by the Order Confirmation and these terms and conditions. Any breach not cured within 30 days of written notice thereof shall result in immediate termination of such license without further notice. Any unauthorized (but licensable) use of a Work that is terminated immediately upon notice thereof may be liquidated by payment of the Rightsholder's ordinary license price therefor; any unauthorized (and unlicensable) use that is not terminated immediately for any reason (including, for example, because materials containing the Work cannot reasonably be recalled) will be subject to all remedies available at law or in equity, but in no event to a payment of less than three times the Rightsholder's ordinary license price for the most closely analogous licensable use plus Rightsholder's and/or CCC's costs and expenses incurred in collecting such payment.
8. Miscellaneous.

12/03/2020 <https://marketplace.copyright.com/rs-ui-web/mp/license/3c76566a-5a4a-4132-8ef2-e8545616ce91/1ce121e5-7b51-421f-a398-35d...>

- 8.1. User acknowledges that CCC may, from time to time, make changes or additions to the Service or to these terms and conditions, and CCC reserves the right to send notice to the User by electronic mail or otherwise for the purposes of notifying User of such changes or additions; provided that any such changes or additions shall not apply to permissions already secured and paid for.
- 8.2. Use of User-related information collected through the Service is governed by CCC's privacy policy, available online here: <https://marketplace.copyright.com/rs-ui-web/mp/privacy-policy>
- 8.3. The licensing transaction described in the Order Confirmation is personal to User. Therefore, User may not assign or transfer to any other person (whether a natural person or an organization of any kind) the license created by the Order Confirmation and these terms and conditions or any rights granted hereunder; provided, however, that User may assign such license in its entirety on written notice to CCC in the event of a transfer of all or substantially all of User's rights in the new material which includes the Work(s) licensed under this Service.
- 8.4. No amendment or waiver of any terms is binding unless set forth in writing and signed by the parties. The Rightsholder and CCC hereby object to any terms contained in any writing prepared by the User or its principals, employees, agents or affiliates and purporting to govern or otherwise relate to the licensing transaction described in the Order Confirmation, which terms are in any way inconsistent with any terms set forth in the Order Confirmation and/or in these terms and conditions or CCC's standard operating procedures, whether such writing is prepared prior to, simultaneously with or subsequent to the Order Confirmation, and whether such writing appears on a copy of the Order Confirmation or in a separate instrument.
- 8.5. The licensing transaction described in the Order Confirmation document shall be governed by and construed under the law of the State of New York, USA, without regard to the principles thereof of conflicts of law. Any case, controversy, suit, action, or proceeding arising out of, in connection with, or related to such licensing transaction shall be brought, at CCC's sole discretion, in any federal or state court located in the County of New York, State of New York, USA, or in any federal or state court whose geographical jurisdiction covers the location of the Rightsholder set forth in the Order Confirmation. The parties expressly submit to the personal jurisdiction and venue of each such federal or state court. If you have any comments or questions about the Service or Copyright Clearance Center, please contact us at 978-750-8400 or send an e-mail to support@copyright.com.

v 1.1

9.5. Relatório de plágio da tese escrita submetida à checagem de similaridade pelo sistema Turnitin.



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
(State University of Campinas)
FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS
(Faculty of Medical Sciences)
BIBLIOTECA
(Library)

Campinas, 16 de março de 2020

PARECER Nº 85/2020

O documento "CROSS-LINKING CORNEANO – INDICAÇÃO PRECOZE E EFEITOS COLATERAIS NA RETINA" passou pela checagem de similaridade do sistema Turnitin. O resultado apontou **4%** de semelhança. Taxa de semelhança baixa, dentre os apontamentos do sistema, há trechos inerentes ao discurso científico que, obrigatoriamente, se repetem entre as produções e devem ser desconsiderados para avaliação de originalidade no Programa de Pós-Graduação da FCM-UNICAMP.

Orientador(a): CARLOS EDUARDO LEITE ARIETA

Aluno(a): Paulo Rodolfo Tagliari Barbisan

Bibliotecária Rosana Evangelista Poderoso
Doutora em Ciências da Saúde
Coordenadora do Serviço de Biblioteca FCM - UNICAMP

Itens	Apontamentos do Sistema Turnitin	Sugestão																																				
1.	A checagem da tese resultou em 4% de similaridade, considerada baixa.																																					
	<p>The screenshot shows the Turnitin report interface. At the top, it states 'A checagem da tese resultou em 4% de similaridade, considerada baixa.' Below this, there is a preview of the document content, including the title '1. INTRODUÇÃO' and a sub-section '1.1 CERATOCONE'. The text in the preview is partially highlighted in red. On the right side of the screenshot, there is a sidebar with a 'Visão geral das' section showing a large '4%' similarity score. Below this, there is a list of 11 sources, each with a similarity score of 1%.</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>Rank</th> <th>Source</th> <th>Similarity</th> </tr> </thead> <tbody> <tr><td>1</td><td>reportorio.unicamp.br</td><td>1%</td></tr> <tr><td>2</td><td>www.fafic.com.br</td><td><1%</td></tr> <tr><td>3</td><td>reportorio.unicamp.br</td><td><1%</td></tr> <tr><td>4</td><td>Adriana de Cavaliello</td><td><1%</td></tr> <tr><td>5</td><td>pesquisa.bvsalud.org</td><td><1%</td></tr> <tr><td>6</td><td>Enviado para Universid...</td><td><1%</td></tr> <tr><td>7</td><td>reportorio.ufscar.br</td><td><1%</td></tr> <tr><td>8</td><td>lsc.unij.com</td><td><1%</td></tr> <tr><td>9</td><td>www.dowexpress.com</td><td><1%</td></tr> <tr><td>10</td><td>lspcece.turmeil.ac.ir</td><td><1%</td></tr> <tr><td>11</td><td>www.scielo.br</td><td><1%</td></tr> </tbody> </table>		Rank	Source	Similarity	1	reportorio.unicamp.br	1%	2	www.fafic.com.br	<1%	3	reportorio.unicamp.br	<1%	4	Adriana de Cavaliello	<1%	5	pesquisa.bvsalud.org	<1%	6	Enviado para Universid...	<1%	7	reportorio.ufscar.br	<1%	8	lsc.unij.com	<1%	9	www.dowexpress.com	<1%	10	lspcece.turmeil.ac.ir	<1%	11	www.scielo.br	<1%
Rank	Source	Similarity																																				
1	reportorio.unicamp.br	1%																																				
2	www.fafic.com.br	<1%																																				
3	reportorio.unicamp.br	<1%																																				
4	Adriana de Cavaliello	<1%																																				
5	pesquisa.bvsalud.org	<1%																																				
6	Enviado para Universid...	<1%																																				
7	reportorio.ufscar.br	<1%																																				
8	lsc.unij.com	<1%																																				
9	www.dowexpress.com	<1%																																				
10	lspcece.turmeil.ac.ir	<1%																																				
11	www.scielo.br	<1%																																				

<p>2.</p>	<p>1.1.1 PREVALÊNCIA</p> <p>A doença ocorre em todos os grupos raciais, afeta igualmente homens e mulheres; porém não está claro se a maior prevalência está em homens ou mulheres. A maioria dos estudos recentes indica uma preponderância de homens sobre mulheres.^{2,6} Isso evidencia que diferenças hormonais podem estar envolvidas, visto que o ceratocone se desenvolve mais cedo e progride mais rapidamente em homens do que em mulheres.⁶</p> <p>Os relatos de prevalência e incidência variam; mas, em um estudo recente, calculou-se uma incidência anual de 1:7500 (13,3 casos por 100.000), e uma prevalência estimada de 1:375 (26,5 casos por 100.000).⁷</p> <p>Tipicamente, seu início é na puberdade e progride até a terceira ou quarta décadas de vida, período em que geralmente cessa sua progressão, sendo a idade média de 22,4 anos de idade.⁶</p> <p>4</p> <p>avaliaram apenas um sintoma de atopia, como alergia, mas não incluíram asma ou eczema. Esses autores sugeriram que a atopia só foi associada indiretamente, pois o prurido induzido por ela, levou a esfregar os olhos. Ainda assim, Kaya et al¹⁰ mostraram que pessoas com ceratocone e atopia possuíam córneas mais finas e de maior curvatura, quando comparadas a pessoas de mesma idade e sexo com ceratocone, mas sem atopia. Alergia, induzida por pólen, poeira, antibióticos ou animais é, frequentemente, associada ao ceratocone, em comparação com controles ou a população em geral, sendo encontrada em cerca de um terço dos pacientes.^{3,11,16,41} Embora a alergia possa causar flicção nos olhos, não é o único fator provocativo, já que existe uma porcentagem muito maior de pacientes que esfregaram os olhos, do que a porcentagem de pacientes portadores de alergia.</p> <p>A luz ultravioleta (UV) é uma fonte de espécies reativas de oxigênio (ROS) e a exposição excessiva à luz solar leva a danos oxidativos nas córneas com ceratocone, as quais possuem uma quantidade reduzida de enzimas, incluindo ALDH3 e superóxido dismutase, necessárias</p> <p>14</p> <p>comparado com a "best fit sphere" (BFS), da irregularidade nas zonas centrais de 3 mm e 5 mm e da psiquimetria, foi padronizado útil para discriminar ceratocôncos suspeitos em indivíduos normais.¹⁷ O princípio de Scheimpflug foi explorado em tomógrafos de córnea, como o Pentacam (Oculus, Wetzlar, Alemanha), para fornecer o mapeamento tridimensional da córnea, incluindo medição direta da superfície anterior e posterior da córnea, psiquimetria e determinação do ângulo da câmara anterior (Figura 8).</p> <p>Figura 8. Imagem dos 4 mapas refrativos de Pentacam em paciente portador de ceratocone.</p> <p>Uma característica muito elogiada do Pentacam é o gráfico Belin/Ambrosio, que exclui uma zona de 4 mm, centralizada na parte mais fina da córnea, do cálculo de referência; e, assim, o "BFS aprimorado" resultante, torna elevações sutis mais pronunciadas, e possivelmente ajuda na detecção do ceratocone precoce ou subclínico. Vários índices em olhos normais, suspeitos de ceratocone, bem como o ceratocone estabelecido, foram medidos, porém a superioridade definitiva em relação a dispositivos anteriores ainda não foi comprovada.^{11,18} Recentemente, há o interesse na caracterização de perfis de aberrometria e no entendimento da biomecânica da córnea portadora de ceratocone, utilizando instrumentos como o <i>Ocular Response Analyzer</i> (Reichert Inc, Depew, NY, EUA). Comparado com os controles, verificou-se que os</p> <p>15</p>	<p>Trechos curtos que devem ser desconsiderados. Checar se é necessário modificar algum ou destacar do texto.</p>
-----------	--	---

	<p>1.1.8 TRATAMENTO</p> <p>O tratamento do ceratocone varia de acordo com o grau de acometimento visual e alterações corneanas. Nos estágios iniciais, o erro de refração pode ser gerenciado pelo uso de óculos. À medida que a doença avança, as alterações na forma da córnea e o consequente astigmatismo irregular resultam em qualidade visual subótima com óculos, necessitando do uso de lentes de contato. No início, lentes de contato, gelatinosas ou híbridas-gelatinosas, feitas de materiais como hidrogel ou silicone-hidrogel, podem proporcionar uma visão clara, possibilitando, com vantagens, bom conforto e menor custo. Porém, na maioria dos casos, é necessário lentes rígidas gás-permeáveis, sendo esse o tipo de lente de contato mais comumente usado. Em dois grandes estudos prospectivos e observacionais, realizados nos EUA e na Escócia, a prevalência do uso de lentes de contato rígidas gás-permeáveis foram de 65% e 91%, respectivamente.^{105,124} Vários desenhos de lentes (Super Cone, Rose K, piggyback e lentes híbridas) e opções de ajuste estão disponíveis, alcançando resultados satisfatórios. As lentes rígidas gás-permeáveis mascaram a anomalia subjacente do formato da córnea e proporcionam uma boa troca de lágrimas, mas podem apresentar desconforto durante o uso. O ceratocone moderado pode exigir o uso de lentes rígidas gás-permeáveis intralimbais ou lentes mini-esclerais, e casos muito avançados, com cones grandes e descentralizados, olho seco ou desconforto com lentes convencionais, podem ser corrigidos com o uso de lentes esclerais.^{105,125}</p> <p style="text-align: right;">19</p> <p>baixos em pacientes portadores de ceratocone e preservam melhorados após o CXL.¹⁶¹ Os efeitos do CXL nas várias estruturas do estroma corneano, foram estudados por várias técnicas de imagem, in vivo e ex vivo. A microscopia confocal revelou uma área altamente organizada de compactação das fibras das fibras de colágeno após o uso do CXL.¹⁶⁰ Estudos com microscópio de transmissão de elétrons mostraram que houve um aumento de 12% nos diâmetros das fibras de colágeno estruturas do estroma anterior, fornecendo evidências diretas de que as próprias fibras de colágeno estão envolvidas no processo de cross-linking.¹⁶⁰</p> <p>Uma grande preocupação, ao irradiar a córnea com UVA, são os aspectos de segurança associados e os possíveis efeitos colaterais do uso da radiação UVA nas estruturas oculares. A maioria dos estudos sobre segurança do procedimento abrangem a fototoxicidade na estrutura corneana, especificamente, no estroma e endotélio. Os estudos originais sobre os efeitos da irradiação nos queratócitos estromais, utilizados em cultivos celulares, tratadas com solução de riboflavina a 0,025% e diversos níveis de irradiação UVA, apresentaram nível citotóxico a 0,4mW/cm², porém quando a riboflavina não foi utilizada, a citotoxicidade se apresentou em níveis 10 vezes menor.¹⁷⁰ Estudos, in vitro, de cultura de células, demonstraram que a citotoxicidade endotelial ocorre no comprimento de onda de 370 nm, com nível de irradiação</p> <p style="text-align: right;">21</p> <p>A literatura carece de consenso sobre quando o tratamento com CXL deve ser indicado; as recomendações, geralmente, dependem de protocolos regionais. A maioria dos profissionais, no entanto, usa parâmetros de ocratometria e acuidade visual como critério. Baseado em estudos que demonstraram que pacientes com indicação de CXL, com uma ceratometria pré-operatória acima de 58 D, apresentam maior risco de progressão contínua do ceratocone, e que pacientes com idade superior a 35 anos, com acuidade visual corrigida no pré-operatório melhor que 20/25, possuem maior risco de complicações (perda de duas ou mais linhas de Snellen). Observou-se que, ao se restringirem os critérios de elegibilidade a pacientes com idade menor de 35 anos e com um limite máximo de leitura ceratométrica inferior a 58 D, a frequência de complicações e falhas poderão ser reduzidas a menos de 1%.¹⁶⁵ Como a progressão do ceratocone é mais frequente e mais rápida em pacientes com menos de 18 anos de idade do que em pacientes idosos, além de possuírem maior probabilidade de culminar na necessidade de um transplante de córnea; recomenda-se que o CXL seja a terapia de primeira escolha ao ceratocone progressivo, em pacientes com menos de 26 anos de idade, desde que se respeitem todos os critérios de indicação de segurança para o tratamento.^{109,100} Baseado nos estudos de Santiago MR,¹⁹⁴ a maioria dos centros especializados no Brasil realiza o tratamento com CXL, em pacientes portadores de ceratocone com progressão determinada,</p>	
--	---	--

O protocolo do procedimento de CXL padrão (standard), descrito para o tratamento do ceratocone, envolve anestésiar o olho (por exemplo, com gotas de 0,5% de cloridrato de proclitacaina) sob condições estéreis e remover a parte central de 7 a 9 mm do epitélio. Uma solução de riboflavina (riboflavina-5-fosfato a 0,01% com dextrano T-500 a 20%) é então aplicada à superfície da córnea a cada 5 minutos, por 30 minutos, antes da irradiação; e a intervalos de 5 minutos, durante a exposição de 30 minutos, a 370 nm de radiação UVA, calibrada antes da cirurgia com um medidor de luz UV a 3mW/cm². O comprimento de onda de 370 nm foi determinado, porque corresponde ao pico de absorção da riboflavina, e a irradiância de 3 mW/cm² foi selecionada para evitar possível o dano de UV.^{27,185} O objetivo da remoção do epitélio é permitir a penetração da riboflavina que, caso contrário, seria impedida pelas junções estreitas das células epiteliais.²⁸ Após o tratamento, são aplicados colírios antibióticos e adicionada lente de contato terapêutica, com boa permeabilidade de oxigênio, para diminuir a dor, sem impedir o processo de re-epitelização do epitélio remanescente.¹⁸¹ A aplicação de antibióticos tópicos é necessária, por 1 semana, após a operação, associados ou não a esteróides leves. A regressão total do desconforto ocular ocorre dentro de 5 a 7 dias quando a lente de contato é removida.¹⁸² Os pacientes são tipicamente, revisados nos dias 1 e 5 e novamente nos meses 1, 6 e 12 após a cirurgia.¹⁸⁷

26

4. METODOLOGIA

4.1 Metodologia do primeiro estudo

Este estudo avaliou 17 olhos de 17 pacientes, com 16 anos de idade ou mais, diagnosticados com ceratocone e indicação de tratamento com CXL em, pelo menos, um olho. Todos os sujeitos foram avaliados no Departamento de Oftalmologia do Hospital das Clínicas da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), em Campinas, São Paulo, Brasil. O mesmo olho serviu como seu próprio controle (antes do CXL vs. depois de CXL). Os olhos foram avaliados, em termos de MAVC, erro refracional, pressão intra-ocular, biomicroscopia com lâmpada de fenda, oftalmoscopia indireta, grade de Amsler, registro de imagem do fundo de olho (retinografia), FA, AF e SD-OCT, antes do CXL, 7 e 30 dias após o procedimento. A densitometria multifocal (mfERG) foi registrada antes e 7 dias após o CXL. Foram

opacidade de córnea que impedisse a visão clara da retina ou que explicasse uma perda de acuidade visual. Todos os participantes forneceram consentimento livre e esclarecido informado por escrito antes da participação; pais ou responsável legal assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido quando os indivíduos apresentavam idade menor que 18 anos. Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP) e aderiu à Declaração de Helsinque.

4.1.1 Procedimento de CXL

A fonte UVA utilizada foi um dispositivo de estado sólido (Sistema de Cross-Linking Corneano X-Link, Opto®, Brasil), consistindo em diâmetro de spot UVA, de 9 mm, com um regulador de tensão potenciométrica. Os parâmetros utilizados foram o comprimento de onda 370 nm e potência de 3 mW/cm² ou 5,4 J/cm² quando a 1,5 cm da córnea. Após a aplicação do blefarostato, um marcador (9 mm de diâmetro), foi utilizada uma espátula para remover o epitélio da córnea, em um círculo central. Uma solução fotossensibilizante (riboflavina a 0,1% - 400 MOSM, Ophthalmos®, Brasil) foi aplicada a cada 5 minutos, durante um período de 30 minutos. Logo em seguida, a riboflavina foi aplicada a cada 5 minutos, durante os 30 minutos de exposição ultravioleta. Todos os cirurgiões que realizaram o procedimento estavam no mesmo nível de habilidade. Após o tratamento, os pacientes foram medicados com antibiótico

4.1.3 Retinografia, Angiografia Fluoresceínica e Autofluorescência

Para analisar o status vascular da retina, da mácula e do pólo posterior, foram obtidas imagens de retinografia, FA e AF utilizando um dispositivo de imagem de fundo (Vistum® NMFA; Carl Zeiss Meditec AG; Alemanha). A pupila foi dilatada com colírio de tropicamida a 1% e de fenilefrina a 10%; uma solução de fluoresceína sódica a 10% foi administrada por via intravenosa, em bolus, na dose de 7,7 mg/kg, obtendo-se fotografias seriadas da retina durante 15 minutos.

4.1.4 ERG multifocal

O sistema Roland RE-11-port/scan 21 system® (Roland Consult, Alemanha) foi utilizado para medir o mfERG de acordo com o protocolo da Sociedade Internacional de Eletrofisiologia Clínica da Visão (ISCEV). A pupila foi dilatada com colírio de tropicamida 1% e de

4.1.5 Análise Estatística

Os dados foram analisados usando o software GraphPad Prism, versão 7.0a. Foi realizada análise estatística descritiva e as distribuições foram resumidas utilizando-se proporções e médias ± desvio padrão. O teste omnibus D'Agostino-Pearson foi usado para confirmar a normalidade dos dados. Os dados sobre as características clínicas dos pacientes foram

29

analisados utilizando-se o teste t pareado. O teste t pareado também foi utilizado nos dados de amplitude e latência de P1 antes e depois da CXL. A análise de correlação e regressão também foi realizada com base na latência de P1. Um nível de significância de p < 0,05 foi estabelecido para todas as análises.

4.2 Metodologia do segundo estudo

Este estudo retrospectivo inclui dados de 105 olhos, de 94 pacientes diagnosticados com ceratocone, entre 2016 e 2018, nos quais o tratamento com CXL havia sido indicado para, pelo menos, um olho. Todos os sujeitos foram avaliados no Departamento de Oftalmologia do Hospital das Clínicas da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), no Brasil. Os pacientes foram divididos por idade, em dois grupos: o Grupo 1 (16 anos ou menos de idade) foi classificado como intervenção precoce, e o Grupo 2 (17 anos ou mais de idade) classificado como intervenção tardia. Os olhos foram avaliados em termos de MAVC, erro de refração, densidade celular endotelial da córnea (DCE), topometria (espessura central da córnea, ECC), além de biomicroscopia com lâmpada de fenda, topometria de Goldmann, topografia (parâmetros Kmax, Ksteep e Kflat), antes do CXL e depois de um, três, seis e doze meses.

Os critérios de exclusão utilizados foram: qualquer doença oftalmológica diferente do ceratocone; história de cirurgia oftalmológica (incluindo CXL anterior), gravidez ou lactação e falta de cooperação do paciente durante o procedimento. Todos os participantes assinaram um termo de consentimento livre e esclarecido antes da participação. Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos, da Universidade Estadual de Campinas e aderiu à Declaração de Helsinque.

30

4.2.3 Análise Estatística

Os dados foram analisados utilizando o software GraphPad Prism, versão 7.0a. Foi realizada análise estatística descritiva e as distribuições foram resumidas usando proporções e médias ± desvio padrão. Usamos o teste omnibus D'Agostino-Pearson para confirmar a normalidade dos dados. Os dados clínicos do paciente foram analisados pelo teste t pareado. Os valores de risco do teste t pareado foram utilizados para comparar os dados pré e pós-CXL (mediados com doze meses de intervalo). O nível de significância foi estabelecido em p < 0,05 para todas as análises.

31

	<p style="text-align: right;">36</p> <p style="text-align: center;">5. RESULTADOS</p> <p>Os resultados desta tese são apresentados em dois artigos, que se encontram transcritos a seguir:</p> <p>Artigo 1 – “Macular Photostability after Corneal Cross-Linking.” Publicado no periódico “Clinical Ophthalmology” (Setembro de 2018, Volume 12, Páginas 1801–1807) – Qualis B2.</p> <p>Artigo 2 – “Corneal Cross-Linking in Young Patients for Progressive Keratoconus.” Publicado no periódico “Cornea” (Fevereiro de 2020, Volume 39, Serie 2, Páginas 186–191) – Qualis B1.</p> <p>com solução de riboflavina a 0,025%, e diversos níveis de irradiâncias UVA, determinaram o exposicionamento de onda de 370 nm e profundidade corneana de 400µm como margens de segurança contra a fototoxicidade corneana.^{170,171}</p> <p>Sabê-se que o UVA e outros comprimentos de onda do luz podem produzir maculopatia fototóxica¹⁷⁸ e, dessa maneira, a exposição à luz do UVA, durante o procedimento CXL, levanta a preocupação de um potencial dano à retina. Embora estudos, <i>in vitro</i>, tenham mostrado que o efeito protetor da riboflavina limitou a transmissão radiante às estruturas oculares internas; poucos estudos, <i>in vivo</i>, anteriores, foram realizados para avaliar alterações morfológicas da retina após o CXL, e icalham estudo histológico funcional ao tecido da retina.^{178,183-87}</p> <p>No primeiro estudo (artigo 1), dezessete olhos foram avaliados para detectar alterações na MAVC, na estrutura macular (SD-OCT, AF), status vascular (FA) e função (eletrofisiologia com ERG multifocal) da retina, especificamente, a região macular, antes e depois da exposição regular ao UVA, durante o procedimento de CXL. Todos os pacientes foram submetidos a exame oftalmológico completo, pela limpada de lenda, antes de coletar os dados, para garantir que não houvesse opacidades nas estruturas oculares (edema da córnea, cicatrizes ou integridade superficial anormal) que pudessem justificar anormalidades. Os resultados desse estudo mostraram uma ligeira diminuição na MAVC e na visão de perto, após 7 dias do procedimento, sendo que a visão foi recuperada após trinta dias do CXL. As</p> <p>anos) com um grupo mais velho (idade média de 21,5 anos). Nosso grupo mais jovem possuía uma idade média menor do que a utilizada em estudos de comparação semelhantes.⁸⁹</p> <p>objetivo deste estudo foi analisar as características e a presença de progressão do ceratocone um ano após o CXL, a fim de determinar se uma das faixas etárias apresenta mais benefícios com o procedimento que a outra. Os resultados apresentados refletem a eficácia do tratamento nos dois grupos, corroborando a importância de se induzir o CXL, como tratamento para pacientes pediátricos, principalmente nos casos mais graves, observados nessa população, pois pode proporcionar os benefícios da estabilização precoce da doença e melhorar sua evolução em termos de MAVC e ceratometria.</p> <p style="text-align: right;">38</p>	
<p>3.</p>	<p>1.1 CERATOCONO</p> <p>Ceratocone é uma doença corneana classificada no grupo das ectasias de córnea. Esta é caracterizada, por definição, como qualquer alteração na curvatura da córnea, sendo o afinamento de sua espessura uma das principais características. Dentre as de origem primária, além do ceratocone, que é o mais comum, ainda existem a degeneração marginal periférica e o coratoglobo.²</p> <p>Ceratocone, um termo, que vem do grego <i>keras</i> (córnea) e <i>konos</i> (cone), foi descrito pela primeira vez na literatura, em 1854 (Nottingham). É um termo clínico usado para descrever uma condição em que a córnea assume a forma cônica, definida como uma doença corneana degenerativa, bilateral e assintétrica (não havendo diferença significativa na incidência entre os olhos direito e esquerdo), progressiva, levando às inúmeras alterações na superfície da córnea. Caracteriza-se pelo afinamento central, protusão apical e estigmatismo irregular, com vários graus de cicatrização, o que ocasiona redução da acuidade visual. A córnea adquire forma cônica devido ao seu afinamento e protusão, não havendo infiltração celular ou vascularização. O ceratocone pode ser classificado em redondo ou oval, podendo localizar-se próximo ao eixo visual, superior ou inferior.³</p>	<p>Apesar dos trechos estarem adequadamente referenciados, checar em quais deve-se usar aspas para destacar que o texto é do autor, ou reescrever.</p>

	<p>1.1.6 SINAIS E SINTOMAS</p> <p>A sintomatologia relacionada ao ceratocone varia dependendo do estágio e da idade de acometimento. Os pacientes podem ser assintomáticos ou, de início, apresentarem maior sensibilidade à luz, visualização de halos em torno de objetos, fadiga ocular, irritação, alergia, dor, prurido e baixa acuidade visual.^{19,28} Os sintomas variam de leve a grave, podendo apresentar miopia, astigmatismo irregular e, frequentemente, cicatrizes na córnea.³¹ Um paciente típico com ceratocone apresenta-se, na adolescência, com queixas de embaçamento ou distorção na visão, necessitando de troca frequente dos óculos devido a mudanças na refração. Tal fato é consequência direta da deformidade da superfície anterior da córnea. Os raios luminosos, que seriam refratados de modo harmônico, atingem uma área de curvatura muito elevada, e são refratados irregularmente, criando imagens retinianas desfocadas, que não são passíveis de focalização por um sistema óptico convencional, do tipo óculos. Há, portanto, a determinação de um astigmatismo irregular, com miopia geralmente associada.³⁶ A retinoscopia mostra astigmatismo miópico irregular e sinais como reflexo em tesoura e em "gota de óleo" (sinal de Charleux; Figura 1), altamente sugestivos de ceratocone.</p>	
4.	<p>1.1.2 ETIOLOGIA</p> <p>Apesar de a etiologia permanecer indeterminada, existem várias associações, incluindo Doença Atópica, Retardo Mental, Síndrome de Down, Amaroze Congênita de Leber, Trauma Ocular por lente de contato e doenças sistêmicas do colágeno (Síndrome de Ehlers-Danlos, Síndrome de Marfan, Osteogênese Imperfeita). Diversas vias bioquímicas, físicas e genéticas diferentes foram implicadas, sendo a ceratocone uma via comum, final, de várias doenças que causam alterações estruturais na córnea levando ao afinamento e ao desenvolvimento de uma ectasia corneana. Além disso, parece que fatores ambientais podem ser essenciais para atuar como gatilho da condição, em indivíduos geneticamente predispostos, como esfregar os olhos, atopia e exposição a UV; embora a contribuição relativa de desses fatores ainda seja desconhecida.²⁷ Um excesso de qualquer um desses fatores ambientais causa danos oxidativos em córneas com ceratocone, devido à incapacidade dessas córneas em processar espécies reativas de oxigênio (ROS), secundário à falta de enzimas, como aldeído desidrogenase classe 3 (ALDH3), catalase e/ou superóxido dismutase,</p>	<p>Checar se estes trechos devem ser referenciados para diferenciar da fonte similar.</p>