

U. PORTO

FMUP FACULDADE DE MEDICINA
UNIVERSIDADE DO PORTO

MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA

2019/2020

Marta Fagulha Castanheira

Pathogenesis of Keratoconus: the
role of inflammation

Patogénese do Queratocone: o
papel da inflamação

Março, 2020

FMUP

Marta Fagulha Castanheira
Pathogenesis of Keratoconus: The
role of inflammation
Patogénese do Queratocone: o papel
da inflamação

Mestrado Integrado em Medicina

Área: Medicina Clínica
Tipologia: Artigo de Revisão Sistemática

Trabalho efetuado sob a Orientação de:
Dr. João Carlos Pinheiro Costa

Trabalho organizado de acordo com as normas da revista:
Acta Médica Portuguesa

MARÇO,
2020

FMUP

Eu, Marta Faguiha Castanheira, abaixo assinado, nº mecanográfico 201500400, estudante do 6º ano do Ciclo de Estudos Integrado em Medicina, na Faculdade de Medicina da Universidade do Porto, declaro ter atuado com absoluta integridade na elaboração deste projeto de opção.

Neste sentido, confirmo que **NÃO** incorri em plágio (ato pelo qual um indivíduo, mesmo por omissão, assume a autoria de um determinado trabalho intelectual, ou partes dele). Mais declaro que todas as frases que retirei de trabalhos anteriores pertencentes a outros autores, foram referenciadas, ou redigidas com novas palavras, tendo colocado, neste caso, a citação da fonte bibliográfica.

Faculdade de Medicina da Universidade do Porto, 12/03/2020

Assinatura conforme cartão de identificação:

Marta Faguiha Castanheira

NOME

Marta Faguiha Castanheira

NÚMERO DE ESTUDANTE

201500400

E-MAIL

martafaguiha.6@gmail.com

DESIGNAÇÃO DA ÁREA DO PROJECTO

Medicina Clínica

TÍTULO DISSERTAÇÃO/MONOGRAFIA (riscar o que não interessa)

Pathogenesis of Keratoconus: the role of inflammation

ORIENTADOR

Dr. João Carlos Pinheiro Costa

COORDINADOR (se aplicável)

ASSINALE APENAS UMA DAS OPÇÕES:

É AUTORIZADA A REPRODUÇÃO INTEGRAL DESTA TRABALHO APENAS PARA EFEITOS DE INVESTIGAÇÃO, MEDIANTE DECLARAÇÃO ESCRITA DO INTERESSADO, QUE A TAL SE COMPROMETE.	☒
É AUTORIZADA A REPRODUÇÃO PARCIAL DESTA TRABALHO (INDICAR, CASO TAL SEJA NECESSÁRIO, Nº MÁXIMO DE PÁGINAS, ILUSTRAÇÕES, GRÁFICOS, ETC.) APENAS PARA EFEITOS DE INVESTIGAÇÃO, MEDIANTE DECLARAÇÃO ESCRITA DO INTERESSADO, QUE A TAL SE COMPROMETE.	☐
DE ACORDO COM A LEGISLAÇÃO EM VIGOR, (INDICAR, CASO TAL SEJA NECESSÁRIO, Nº MÁXIMO DE PÁGINAS, ILUSTRAÇÕES, GRÁFICOS, ETC.) NÃO É PERMITIDA A REPRODUÇÃO DE QUALQUER PARTE DESTA TRABALHO.	☐

Faculdade de Medicina da Universidade do Porto, 12 / 03 / 2020

Assinatura conforme cartão de identificação: Marta Faguiha Castanheira

Pathogenesis of Keratoconus: the role of inflammation

Patogénese do Queratocone: o papel da inflamação

Marta Castanheira ¹, João Pinheiro-Costa^{2,3}

Correspondência:

Marta Fagulha Castanheira
Quinta da Romeira, 12, 3^oESQ.
3030-782
Coimbra, Portugal

martafagulha6@gmail.com

¹ Faculty of Medicine, University of Porto, Porto, Portugal

² Department of Ophthalmology, Centro Hospitalar Universitário São João, Porto, Portugal

³ Department of Biomedicine, Faculty of Medicine, University of Porto, Porto, Portugal

Pathogenesis of Keratoconus: the role of inflammation

Abstract

Purpose: Keratoconus is an ectatic disease characterized by corneal stroma thinning and protrusion, which results in visual impairment. Originally it was believed that keratoconus did not have an inflammatory component given the absence of inflammatory clinical signs. However, it has been shown that there is an underlying inflammatory mechanism in keratoconus pathogenesis. Since these mechanisms are not entirely understood, there is an increasingly amount of studies that focus on comprehending this subject. The aim of this article is to systematically review articles published in the last 5 years about the role of inflammation in the pathogenesis of keratoconus, discuss its results and contribution to profound the knowledge of the disease's mechanism.

Materials and Methods: We searched in Pubmed database, for articles published in the last 5 years related to the role of inflammation in keratoconus pathogenesis.

Results: We found 112 articles but repeated articles, review papers or articles that did not mention aspects related to inflammation in keratoconus were excluded, resulting in a total of 26 papers.

Conclusion: Additional evidence of increased oxidative status and the role of inflammation have been shown by various studies. These studies contributed to the advance knowledge of keratoconus pathogenesis and may be essential for designing new studies that may culminate on the formulation of new biomarkers to an earlier diagnosis and development of more effective and safe therapeutics.

Further randomized prospective studies with larger samples are essential to obtain stronger evidence and evaluate the relationship between these investigated molecules and keratoconus development and severity.

Key Words: keratoconus, inflammatory mediators, cytokines, matrix metalloproteinases, oxidative stress

Resumo

Introdução: O queratocone é uma doença ectática caracterizada por uma diminuição da espessura e protusão da córnea resultando numa diminuição da acuidade visual. Contrariamente ao que anteriormente se defendia, têm-se demonstrado que existe um componente inflamatório subjacente à sua patogénese. Uma vez que este mecanismo não é inteiramente conhecido, têm surgido vários estudos focados nesta temática. O objetivo deste artigo é realizar uma revisão sistemática dos artigos publicados nos últimos 5 anos que se focaram na compreensão do papel deste componente na patogénese do queratocone, bem como discutir os seus resultados e contribuição para o aprofundamento do conhecimento do mecanismo desta doença.

Materiais e métodos: Foi feita uma pesquisa na base de dados Pubmed de artigos publicados nos últimos 5 anos relacionados com o papel da inflamação na patogénese do queratocone.

Resultados: Foram encontrados 112 artigos e excluíram-se artigos repetidos, de revisão e artigos que não mencionavam aspetos relacionado com a inflamação no queratocone, sendo selecionados, no total, 26 estudos.

Conclusão: Vários estudos evidenciaram o papel da inflamação e o aumento do stress oxidativo no queratocone. Estes estudos contribuíram para o avanço do conhecimento da sua patogénese, sendo essenciais para a elaboração de novos estudos cujo objetivo poderá culminar na formulação de novos biomarcadores para um diagnóstico precoce e desenvolvimento de terapêuticas dirigidas mais eficazes e seguras.

Também, é essencial o desenvolvimento de estudos prospetivos randomizados com amostras maiores para obter evidencia adicional da relação entre as moléculas mencionadas nos vários estudos selecionados e o desenvolvimento e severidade do queratocone.

Palavras-chave: Queratocone, mediadores inflamatórios, citocinas, metaloproteinases da matriz, stress oxidativo

Introduction

Keratoconus (KC) is an ectatic disease characterized by a conical distortion of the cornea associated with thickness decrease of the cone resulting in visual impairment. It is the third cause for corneal transplantation worldwide ¹. It's a progressive disease that generally appears in puberty and stabilizes in adulthood. The data prevalence is not consistent across the literature but the most prominent value for the European mean is 54 per 100.000 being more common among the South Asia population than in Caucasian population ².

Although the etiology and pathogenesis of this disease is not completely understood, it is known that it has a multifactorial origin and it results from the combination of genetic and environmental factors ³. The "two-hit hypothesis", in which there is a genetic predisposition of the patient, and an environmental factor triggers this disease, is the most probable mechanism ⁴. It may arise as an isolated or with other systemic or ocular diseases such as: Down Syndrome, Leber congenital amaurosis, Ehlers-Danlos syndrome, osteogenesis imperfecta, mitral valve prolapse, among others ⁵. Traumatic factors such as chronic eye rubbing or hard contact lens wear may cause or worsen this disease in genetic predisposing individuals. Atopy is considered another important risk factor ³. The genetic component of this disease has been widely studied explaining why families with an affected biological relative have a higher prevalence of this disease. In addition, it is documented that there is a familial inheritance and a high correlation of keratoconus among monozygotic twins compared to dizygotic twins ⁶.

Originally it was believed that keratoconus did not have an inflammatory component given the absence of inflammatory clinical signs. However, over the years, a large number of studies have showed that there is a subacute inflammatory mechanism in KC pathogenesis ³. In fact, there is notorious imbalance between pro-inflammatory and anti-inflammatory molecules in tears fluids. Increased levels of inflammatory mediators, such as cytokines, chemokines, matrix metalloproteinases (MMP) have been consistently found in tears samples of KC patients

Cytokines are molecules secreted by immune cells responsible for immune responses which can have an anti-inflammatory or a pro-inflammatory role. One of these immune cells is T helper 1 cells which have an important role in cellular immunity stimulating macrophages activation and producing cytokines such IL-2, IL-12, IL-15, TNF and INF producing a pro-inflammatory response.

T helper 2 cells, release anti-inflammatory cytokines such as IL-4, IL-5, IL-9, IL-10, IL-13 integrating a humoral immune response in which antibodies are produced against intracellular pathogens and are associated with the promotion of IgE and eosinophilic responses in atopy. T

helper 17 cells produce IL-17 and CCL20 important in chronic tissue inflammation (8). Hence, a balance between Th1 and Th2 responses is crucial to maintain a stable and effective immune system. In fact, there is a notorious microenvironmental change and a dysregulation of cytokines signaling in keratoconus⁷.

The main group of proinflammatory cytokines are IL-1 family which comprises IL-1 receptor antagonist (IL-1Ra) and two proinflammatory cytokines (IL-1 α and IL-1 β). Produced by monocytes, fibroblast, macrophages and expressed in B lymphocytes, they are recognized as a key mediator of inflammation and fibrosis in multiple tissues including cornea. In fact, there is a study that concluded that the overexpression of IL-1 receptors in keratocytes of keratoconic eyes resulted in the activation of collagenases, metalloproteinases, keratinocyte growth factor and IL-6^{4,8}.

To comprehend the focus of some studies presented in the discussion chapter it is also noteworthy the role of lactoferrin in the inflammatory pathway. It is known that lactoferrin have anti-inflammatory effects since it inhibits IL-1, 2, 6 and TNF- α molecules. Since, low levels of this factor have been found in tears of KC patients it is widely accepted that lactoferrin influences the pathogenesis of keratoconus⁴. It is also known that lactoferrin acts via toll-like receptors (TLR) which are widely expressed in ocular surface. TLR acts as innate immune receptors since, at the time of pathogen recognition, they trigger an immune response leading to inflammation. More recently, it was discovered that these molecules play a relevant role in adaptative immune response, allergic and autoimmune diseases⁹.

Matrix metalloproteinases (MMP) family is a group of enzymes secreted by epithelial cells, stromal cells and neutrophils, which play an important role in various diseases since they are, among others, responsible for extracellular matrix proteins degradation, wound healing and inflammation. MMP activity is modulated by proinflammatory factors (mainly IL-6 and TNF- α), by cell adhesion molecules, and it is known that their levels result of a balance with tissue inhibitor of MMP (TIMP). In keratoconus, MMPs are upregulated and cause collagen degradation contributing to corneal thinning, which is a feature of this disease¹⁰. MMP-9 is one of the most studied enzymes and it has been implicated in corneal disorders and in degradation of collagen fibers⁴.

TNF- α is a proinflammatory cytokine which interacts with its receptors: tumor necrosis factor receptor 1 and 2 (TNFR1 and TNFR2) activating the caspase pathway and, consequently, a transcription factor, NF- κ B, which, therefore, activates IL-1, IL-6, IL-8, TNF- α itself, vascular adhesion molecule 1 (VCAM-1) and intracellular adhesion molecule 1 (ICAM-1), stimulating immune response and leukocytes to the site of inflammation. TNF- α also induces the release of

prostaglandin E2 (PGE2) which diminishes collagen synthesis and increase collagen degradation⁴.

The overexpression of ICAM-1, VCAM-1, IL-6 and MMP-9 in keratoconic patients confirms the existence of inflammation¹⁰. ICAM-1 has a known role in the inflammation as well as VCAM-1¹¹.

Oxidative stress (OS) is also one of the mechanisms described in the literature that integrate keratoconus pathogenesis. This occurs in corneal cells, particularly in mitochondria.

In fact, one of the main functions of the cornea is to neutralize the free radicals and oxidants species (reactive oxygen species - ROS and reactive nitrogen species - RNS) formed as a result of cellular metabolism and exposure to ultraviolet light. In order to maintain an environmental homeostasis in the cornea, it is important to maintain a balance between these molecules and antioxidants⁴.

This is an extremely important function since the accumulation of ROS/RNS and free radicals result in cell damage and, consequently, in decreased cellular defense. For this reason, cornea has various antioxidant enzymes such as: superoxide dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GPx), glutathione reductase, nicotinamide adenine dinucleotide phosphate and catalase. However, in some diseases this enzymatic environment may be altered, particularly when there is a decrease in antioxidant molecules levels, resulting in the accumulation of free radical and oxidants molecules and, consequently, in DNA damage, lipid peroxidation and proteins denaturation, accumulation of toxic byproducts inducing apoptosis of corneal cells¹².

Moreover, levels of proteases such as lysosomal enzymes like cathepsins B, G, K, S were found to be elevated in keratoconus cornea⁴.

It is important to refer that there is evidence of systemic relationship between OS and KC, suggesting that systemic oxidative stress may be involved in the origin of this condition¹³. In addition, Karaca *et al* established neutrophil-lymphocyte ratio (NLR) as a predictor of KC progression and of the increased systemic inflammatory response¹⁴.

Therefore, in addition to imbalance of pro and anti-inflammatory molecules and oxidative stress, the imbalance of enzymes and their inhibitors are also responsible for extracellular matrix degradation, as demonstrated. In fact, stromal degradation and its thinning are the most important sign of this disease. Most theories hypothesized that these aspects result from the increasing of proteolytic enzymes action and the reduction of its inhibitors on one hand, and from keratocytes apoptosis and collagenolytic activity leading to extracellular matrix loss and collagen fibrils redistribution on the other. It is known that highly organized collagen fibrils and

keratocytes are responsible to maintain the cornea's biomechanical strength, but this is altered in KC.

A complex interaction between all these pathophysiologic components is responsible for keratoconus development.

Methods: To conduct this systematic review, we made our research in Pubmed database, for articles published in the last 5 years related to the role of inflammation in keratoconus pathogenesis. The MeSH terms used were: "keratoconus", "corneal ectactic disease", "Keratoconus/diagnosis", "keratoconus/genetics", "keratoconus/pathology", "keratoconus/physiopathology", "keratoconus/etiology and pathogenesis" combined with "inflammatory mediators", "cytokines", "interleukins", "matrix metalloproteinases", "vitamin D" and "oxidative stress". There were no restrictions on the language or country of publication.

Results: We found 112 articles which were carefully reviewed in order to select those that matched our study goal. Repeated articles, review papers or articles that did not mention aspects related to inflammation in keratoconus were excluded. As a result, we selected a total of 26 papers. The analyzed studies, generally, show some limitations since they are retrospective studies with small samples. Moreover, only two studies had a follow-up period (see figure 1 and table 1).

Discussion and Conclusion

Although there were many studies focused on systemic oxidative stress markers study, little research has been made regarding these markers in tear fluids. The most recent selected article was published in 2020 by Balmus IM. *et al.* and its main goal was to study oxidative stress markers in tear fluids before and after one of the most used therapies for keratoconus, corneal cross-linking (CXL).

The activity of SOD and GPx and the concentration of malondialdeheyde (MDA) was measured in tear samples. In fact, MDA is a product of ROS-induced lipid peroxidation and one of the most relevant markers for toxic stress.

The results of this study show a significant decrease of SOD activity in keratoconus patients but an increase of GPx activity before the treatment, supporting the hypothesis that oxidative stress is an important component in the keratoconus pathogenesis being particularly present in tear fluids. The diminishing of SOD activity reflects the decrease of the antioxidant effect expected

in the cornea. Otherwise the increase of GPx activity seems paradoxical. However, this decrease is explained as a compensatory effect due to the local neuronal damage. The high levels of MDA show that there is an increase of lipidic peroxidation as a consequence of SOD activity decrease and of inflammatory process as Balmus, IM. *et al* explain. After CXL therapy SOD activity and MDA levels exhibit a tendency to normalize after 3 months since treatment. However, GPx activity increased after CXL procedure ¹⁵.

Since, oxidative stress occurs in mitochondria, some defects on mitochondrial DNA (mtDNA) may conduce to the increase of ROS contributing for KC pathogenesis. In fact, Hao XD. *et al*. in a case control study concluded that decreased integrity, content and increased level of mtDNA is associated with KC ¹⁶.

DNA damaged by oxidative stress molecules is repaired by some enzymes, such as human APEX nuclease 1 which is encoded by APEX1gene. The repair process is made by base excision repair pathway. Wojcik KA. *et al* established an association between genetic polymorphism in APEX1gene and KC development. G/T genotype of the c.-468T>G polymorphism was linked to a decreased progression of KC, while T/T genotype was associated to an increased KC occurrence ¹⁷.

Atilano SR. *et al* conducted a study whose main goal was to find the main elements involved in the balance of oxidative stress by comparing the levels of gene expression for enzymes implicated in production or elimination of ROS/RNS in normal human corneal cells (NL cells) with those in human corneal cells with keratoconus (KC cells) in vitro.

On one hand, enzymes involved in the production of ROS/RNS were measured. Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADPH) oxidase is the main enzyme responsible for superoxide and nitric oxide synthase which produces nitric oxide (NO). In fact, NO induces MMP-2 and downregulates TIMP-1 being implicated in the stromal thinning and loss of Bowman's layer, typical in keratoconus.

On the other hand, for the elimination pathway, Atilano SR. *et al*. assessed the expression levels of antioxidant enzymes as well as the principal ROS/RNS scavenger gene (SCARA3) and a transcription factor for antioxidant genes (FOXO1).

They concluded that the expression levels of NADPH oxidase subunits are similar between NL and KC fibroblasts. However, they found a significant decrease of SOD and of SCARA3 which could justify the increase levels of ROS/RNS and a decrease in FOXO1 gene. For these reasons,

they inferred that the oxidative stress imbalance results from alterations in the elimination pathway and not from the overproduction of ROS/RNS¹⁸.

Another important enzyme integrated in the oxidative stress mechanism is heme oxygenase (HO) having an important role as an antioxidant molecule. HO exists in two isoforms: HO-1 and HO-2. HO-2 is known to have a role as an antioxidant, anti-inflammatory, apoptotic and cytoprotective molecule. This anti-inflammatory effect is due to an inducing of IL-10 and a downregulation of pro-inflammatory cytokines. Caglayan M. *et al*, by immunohistochemistry, analyzed the levels of HO-2 in keratoconic and normal human corneal epithelium, observing that the levels of HO-2 were significantly lower in keratoconic than in normal corneal epithelium. They formulated two hypotheses to justify this result. On one hand it could be a result of a decrease synthesis of HO-2 or a decrease in the enzyme level in keratoconus corneas. On the other hand they hypothesized that the low levels of HO-2 may be the result of a disruption in enzyme structures due to increased ROS. Nevertheless, more studies are needed to achieve a better understanding of the role of HO-2 in keratoconus etiopathogenesis¹⁹

Still regarding studies focused on the role of oxidative stress in keratoconus, Yari D. *et al*'s research evaluated the effects of single nucleotide polymorphisms (SNP) in catalase and GPx gene on the risk of KC in an Iranian population sample. The conclusion of this study was that a SNP in CAT gene (rs 7943316) decrease the risk of KC and the polymorphism of GPX-1 gene increase the risk of KC²⁰.

Another antioxidant system present in oxidative stress mechanism is the homeostasis of thiol-disulfide, since this is a product of oxidation reaction of thiols. In fact, thiols are one of the main targets of ROS making them essential to oxidative stress defense. In fact, thiol-disulfid homeostasis is an indicator of localized and systemic oxidative stress. Various systemic and local diseases are associated to a disruption in thiol-disulfid homeostasis. Considering that this product has never been studied, Gulpamuk B. *et al* decided to measure the levels of thiol-disulfide in KC patients and in healthy subjects. Although these levels were measured in the blood, they should have been measured in the cornea which turns out to be a limitation of this study. The results showed a statistically significant difference between the two groups. They found that native thiol values, total thiol values, and native thiol–total thiol ratios were lower in KC patients' serum. Moreover, they found that disulfide levels, disulfide–native thiol ratios, and disulfide–total thiol ratios were higher in KC patients when compared with control subjects. These results suggest that

the decrease of systemic oxidation is correlated with KC development. Hence, they propose a long-term antioxidant therapy to improve the disease outcome ²¹.

In order to understand the sequence of molecular events that lead to this corneal ectasia, Shetty R. *et al* studied the role of autophagic lysosomal pathway under oxidative stress, in KC corneal epithelium and the healthy human corneal epithelium. Shetty R. *et al* propose that a malfunction in autophagic system may be involved in the pathogenesis and progression of KC. In fact, due to oxidative damage, they found an altered expression of proteins suggestive of autophagy effect ²².

In this systematic review, we found two studies that established an association between prolidase activity (PA) and oxidative stress. Prolidase is a cytosolic exopeptidase, catalyst of the final step of collagen degradation having, therefore, an important role in collagen metabolism. Moreover, this enzyme plays a significant role in collagen resynthesis from collagen destruction products. Therefore, a decrease in prolidase activity results in a defect on collagen production.

Göncü, T. *et al* concluded that, although serum PA levels were significant lower in keratoconus group than in the control group, the PA levels in tear film were also reduced in KC group, but this difference was not statistically significant. As Göncü T *et al*, Kiliç, R. *et al* also found a decreased in serum PA levels in KC patients compared with control subjects. Since, PA is closely related to oxidative stress, both studies aimed the study of oxidative stress markers in this disease. Although Kiliç, R. *et al* did not find a significant association between KC and serum total antioxidant capacity and total oxidant status, Göncü, T. *et al* found higher levels of serum oxidative stress markers ^{23 - 24}.

For the first time, a paper published by Akkaya S. *et al*, evaluated the association between Vitamin D and the presence and severity of Keratoconus. It is widely known that Vitamin D modulate the innate and adaptative immune response inhibiting Th1 and Th17 cell development. Moreover, this vitamin suppresses allergic pathways by the inhibition of dendritic cells maturation and migration, reducing IL-12 and IL-13 and inducing IL-10. As mentioned, KC results also from an misfunctioned immune response. Hence, Akkaya S. *et al* suggested an association between serum vitamin D levels and this disease. Their results revealed a statistically significant lower levels of serum vitamin D in KC patients when compared with control subjects suggesting a relation between these two variables. Despite the levels of vitamin D in patients

with severe KC being the lowest, distribution of vitamin D levels were not significantly different among KC groups (mild, moderate and severe) ²⁵.

To validate the hypothesis that inflammation play a relevant role in KC pathogenesis, Shetty R. *et al* conducted a study in which the levels of inflammatory factors in tear samples of Indian KC patients were analyzed. Comparing the results of KC patients with the ones from healthy subjects, similarly to previous studies (some referred in introduction chapter), there is a significant increase of pro-inflammatory and a decrease in anti-inflammatory molecules ²⁶.

The imbalance between pro and anti-inflammatory molecules was, once more, examined in tears samples by Sorkhabi R. *et al* study. After examination of KC tear samples, it was found a significant increase of pro-inflammatory factors as IL-1 β , IL-6 and IFN-gama. However, anti-inflammatory molecule, IL-10, was statistically significant decreased in KC patients. As previous results, these suggest that there are complex chronic inflammatory events underlying KC development ²⁷.

Previous studies demonstrated that polymorphisms in IL-1 β gene were related to keratoconus predisposition in Korean and in Japanese patients ⁴. Similarly, Nabil, KM. *et al*. concluded that IL-1 β promotor polymorphisms were also associated with keratoconus in Egyptian population and, therefore, relevant to keratoconus development ²⁸. Moreover, Wang Y. *et al*., also established an association of IL-1 altered gene (IL-1 α and IL-1 β) and KC risk in Chinese Han population ²⁹.

In 2019, a single center retrospective study was performed by Katipoğlu, Z. *et al*. aiming to evaluate the monocyte/HDL cholesterol ratio (MHR) and the Neutrophil/Lymphocyte ratio (NLR) as indicators of inflammation and oxidative stress in patients with keratoconus. On one hand, the inflammatory role of monocytes is already known, as well as the contribution of HDL-c molecules in the increase of vasodilatation and vascular endothelial nitric oxide, acting as an anti-inflammatory and antioxidant molecule. On the other hand, NLR is already widely used as an indicator of systemic inflammation. Considering that NRL and MHR are increased when systemic inflammation is present, patients with other inflammatory diseases were excluded from the study. These results support those previously reported by Karaca, EE. *et al* in 2014 ¹⁴.

Levels of NRL and MHR in the blood of keratoconus patients were evaluated and found to be statistically significantly increased in keratoconus patients ³⁰.

An interesting pilot study was conducted by Mandathara, PS. *et al.* in 2018, to find an association between Langerhans cells and keratoconus focusing on the density and morphology of these cells in the cornea. Since Langerhans cells have a significant role presenting and processing antigens, they are an important component of inflammatory responses. In healthy persons, these mature cells are mostly present in peripheral cornea whereas immature cells are present in both peripheral and central corneas. This study shows that in KC mature Langerhans cells are localized in central cornea which contributes to the increase of local inflammation. In addition, an interplay between the immune and nervous system has been hypothesized, and this study found an association between increased Langerhans cells and reduced nerve fiber density in keratoconus. Unfortunately, Mandathara, PS. *et al.* were not capable of demonstrating a significant association between keratoconus disease severity and the frequency and density of Langerhans cells ³¹.

Levels of two inflammatory regulatory proteins, galectin-1 and galectin-3, were evaluated by Andrade, FEC. *et al.* in KC patients before and after CXL treatment, to propose them as biomarkers in keratoconus. These proteins regulate the inflammatory response antagonizing it. Galectin levels were detected in KC conjunctival epithelial cells, suggesting that these cells may be a source of galectins. Furthermore, when compared with control subjects, an increase in galectin levels were demonstrated. However, no changes were detected in tears of KC patients and control subjects. *In vitro* assays showed a marked increase in Gal-1 levels in keratocytes after CXL treatment as well as decrease in IL-6, IL-8, MMP-2 and MMP-9 levels. In summary, KC is associated with increased levels of Gal-1, Gal-3 and MMP. Moreover, CXL has an immunosuppressive and anti-inflammatory role on keratinocytes by increasing Gal-1 and reducing proinflammatory cytokines and MMP ³².

Although the use of contact lenses is one of the most used treatments for the correction of astigmatism and refractive errors caused by keratoconus, it is known to reduce oxygen availability that reaches the cornea. McKay, TB. *et al.* tested if fibroblasts from KC cornea were more susceptible to hypoxia-induced oxidative stress than normal corneas. As a result of this investigation, they realized that in hypoxia-induced environment, there was a reduction of collagen fibers type I secretion and an increase of MMP-1 and 3 levels. They suggest that the upregulation of MMP may have an important contribution to enzymatic degradation of KC stroma

Shetty, R. *et al.* conducted a study in order to comprehend the role of inflammatory cytokines from keratoconic epithelial cells and the response to cyclosporine A (CyA) treatment. Since MMP-9 is modulated by IL-6 and TNF- α , Shetty, R. *et al* also evaluated these proinflammatory factors in tear samples and corneal epithelium. They found increased levels of MMP-9 in KC tears and increased expression levels of MMP-9, IL-6 and TNF- α in corneal epithelial cells and tears of KC patients. It was found a relation between MMP-9 and IL-6 levels and KC severity, but not the same with TNF- α . Inflammation and cytokine expression are upregulated in dry eye disease, and CyA is an approved drug to treat this disease. In this study, Shetty, R. *et al* used this medicine to inhibit the inflammatory response stimulated by a recombinant factor activator of inflammatory pathway (hTNFa). It was demonstrated that long-term treatment with CyA suppressed cytokines stimulated by hTNFa (IL-6 and TNFa). Hence, they considered that CyA could be a viable choice to KC treatment. Considering this, researchers performed a pilot study of CyA treatment in 20 patients with KC. A follow-up of 6 months was done, and MMP-9 levels were found to be significantly reduced. Although there are some study limitations, such as small sample size, short follow-up and inadequate comparators, these results show some initial evidence for a new treatment option with CyA.³⁴

Although many studies have focused on the influence of MMP-9 activity in KC, few examined the importance of MMP-1 activity. It is widely accepted that, as MMP-9, MMP-1 destabilizes corneal structure as it acts on the degradation of type I and III collagen fibers. For this reason, Du G. *et al* investigated the effect of TNF- α and IL-6 on MMP-1 expression and the role of IL-6 on TNF- α mediated regulation of MMP-1 in fibroblasts. This study concluded that TNF- α and IL-6 have the ability to upregulate MMP-1 expression in a synergistic and dose-dependent manner. Moreover, the cultured fibroblasts showed an overexpression of IL-6 and TNF- α reflecting a chronic inflammation environment. Additionally, IL-6 antibody (IL-6 Ab) was used as a treatment that led to a decrease in TNF- α inhibition, inducing a more pronounced decrease in MMP-1 levels. Furthermore, several IL-6 blocking agents have been developed and tested in clinical trials successfully³⁵.

A larger number of studies have focused on the contribution of genetics to KC etiopathogenesis. The genetic role of TNF- α SNP in KC development and its effect on the expression of molecules of the inflammatory pathway was the subject of Arbab, M. *et al* study. A strong correlation of polymorphisms in TNF- α gene and a predisposition to keratoconus disease

was established. Therefore, this study proves, once again, the influence of inflammatory mechanism in this disease ³⁶.

Innate and adaptative immune response is also regulated by lactoferrin via toll-like receptors (TLR). TLR-4 is expressed in corneal epithelial cells and fibroblast of corneal stroma. TLR-2 is expressed in corneal epithelial cells. Sobrino T. *et al.* found a higher expression of TLR-2 and TLR-4 in monocytes and neutrophils of KC patients, with a stronger correlation in relation to TLR-2. Also, a strong correlation between these TLRs and serum levels of proinflammatory factors (IL-1 β , IL-6, TNF- α , MMP-9, NF-k β) was established. Hence, Sobrino T. *et al.* suggest that the inflammatory response could be a consequence of TLR activation ³⁷. In fact, previous studies showed a significant decrease of IL-6 and TNF- α in fibroblasts after neutralizing TLR-2 antibodies treatment. Hence, as it was previously suggested, TLR could become a therapeutic target for keratoconus treatment ⁹.

A study conducted by McKay TB. *et al* was designed to evaluate the impact of altered systemic metabolism on the pro-inflammatory response in KC. They also aimed to establish an association between cytokines and growth factors, with systematic inflammation and KC severity. Hormone levels were also examined. In fact, the long-term goal of McKay TB. *et al* was to identify KC biomarkers for early diagnosis and new therapeutic targets. These analyses were done in saliva samples of KC patients and were compared to the saliva of healthy subjects. McKay TB. *et al* did not find an obvious correlation between hormone concentration and KC severity, leading to the believe that hormone levels may modulate other systemic factors that can affect the stromal microenvironment, such as cellular metabolism and inflammatory factor, promoting KC progression. However, researchers found a correlation between the elevated levels of dehydroepiandrosterone sulfate (DHEA) with increased IL-16 and stem cell factor corresponding to a more severe KC. An upregulation of metabolites, as myoinositol and 1-methyl-histidine, were associated with pro-inflammatory processes. Hence, these metabolites could be considered as biomarkers of KC. In summary, it is suggested that altered hormone levels modulate metabolism, cytokine, and growth factor expression causing an increase in disease severity ³⁸.

Hepatocyte growth factor (HGF) is a molecule related to inflammation which is associated with an increased susceptibility for KC development. HGF binds to its receptor mesenchymal-epithelial transition factor (c-Met/Met) and it has been associated to the promotion of endothelial and epithelial corneal cells. However, the role of HGF/c-Met was never studied. You J. *et al.*

analyzed the expression of HGF protein in severe KC corneas. They noticed that the localization of HGF/c-Met levels were different: high levels of HGF and c-Met were found in basal epithelium adjacent to KC corneas, whereas these levels were found in the stroma of healthy corneas. However, it was not possible to conclude about the sequence of events, that is, if HGF/c-Met changes are directly involved in KC pathogenesis or if it is just a secondary event. Therefore, HGF/c-Met pathway is another mechanism that could be underlying KC development ³⁹.

Sanyal S. *et al* study focused on the impact of chronic pesticide exposure on the cornea in mice establishing a relation with consequential keratectasia and neovascularization. This is an issue of growing concern since agriculture is practiced on a large scale in many countries where pesticides are being increasingly used. The conclusion of this study was that prolonged exposure to pesticides may damage corneal layers leading to ocular disorders as keratectasia and corneal neovascularization. Inflammatory markers (TNF- α , ICAM, VCAM) were detected in the cornea suggesting an inflammatory environment post exposure to pesticides. When compared to controls, an increased expression of angiogenesis markers as well as of hypoxia induced factor-1a was found. This corroborate the existence of neovascularization which could be caused by an hypoxic microenvironment in the cornea. ⁴⁰

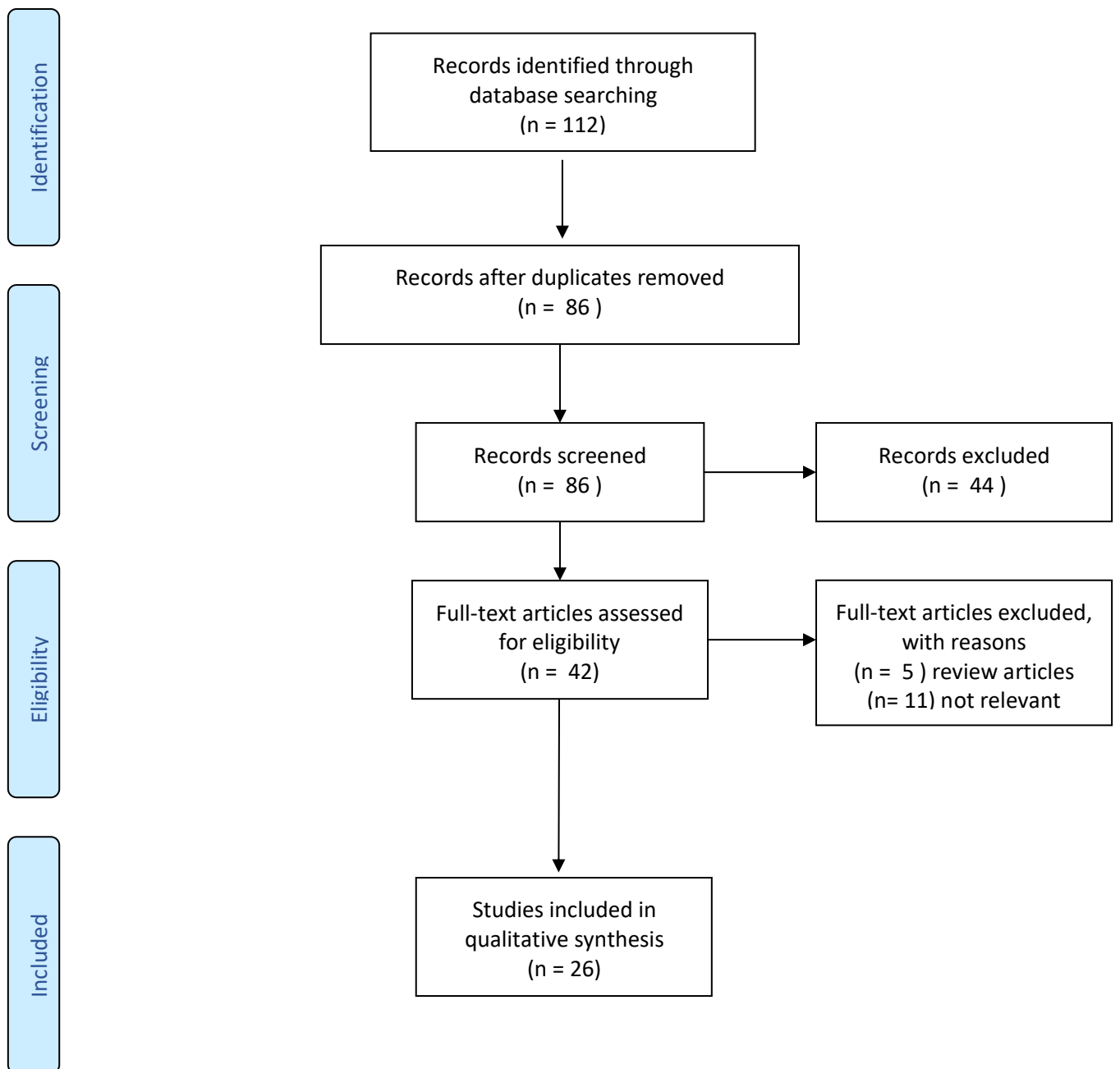


Figure 1. Diagram flow for the selection of articles.

Table 1. Data of selected studies

Reference	Authors	Country	Ano	Title	Aim	Sample size	Materials
27	Sorkhabi, R. <i>et al</i>	Iran	2015	Tear film inflammatory mediators in patients with keratoconus	Measure cytokines levels including Interleukin 6,10,1b and Interferon- γ	42 KC patients and 30 control subjects	Tear fluid
34	Shetty, R. <i>et al</i>	India	2015	Elevated expression of matrix metalloproteinase-9 and inflammatory cytokines in keratoconus patients is inhibited by cyclosporine A	Study the role of inflammatory cytokines secreted by corneal epithelial cells in keratoconus and the response to treatment with cyclosporine A	129 KC patients and 20 control subjects	Tear fluid
29	Wang, Y. <i>et al</i>	China	2015	Association of Interleukin-1 gene single nucleotide polymorphisms with Keratoconus in Chinese Han Population	Investigate the association between IL-1 α and IL-1 β polymorphisms and keratoconus in unrelated Chinese patients.	115 KC patients and 101 control subjects	Blood
17	Wojcik, KA. <i>et al</i>	Poland	2015	Polymorphism of the APEX nuclease 1 gene in keratoconus and Fuchs endothelial corneal dystrophy	Determine the relationship between the genotypes of the c.444 T>G (rs1130409) and c.-468 T>G (rs1760944) polymorphisms in the APEX1 gene and the occurrence of two oxidative stress-related eye diseases: keratoconus and Fuchs endothelial corneal dystrophy	250 KC patients and 350 control subjects	Blood
23	Göncü, T. <i>et al</i>	Turkey	2015	Tear film and serum prolidase activity and oxidative stress in patients with keratoconus	Determine and compare the serum and tear film prolidase activity between patients with keratoconus and healthy subjects. To evaluate the serum oxidative stress level and the correlation with serum PA in patients with keratoconus	31 KC patients and 33 control subjects	Blood and tear fluids
24	Kiliç, R. <i>et al</i>	Turkey	2015	Systemic prolidase activity and oxidative stress in keratoconus	Evaluate the serum prolidase activity, total antioxidant capacity and total oxidant status in patients with keratoconus	69 KC patients and 72 control subjects	Blood
38	McKay, TB. <i>et al</i>	USA	2016	Endocrine and metabolic pathways linked to keratoconus: Implications for the role of hormones in the stromal microenvironment.	Study the role of hormones and inflammation in keratoconus patients.	64 KC patients and 14 control subjects	Saliva
39	You, J. <i>et al</i>	Australia	2016	Expression of HGF and c-Met proteins in Human Keratoconus Corneas	Assess the role of HGF protein and its receptor in keratoconus	10 corneal buttons and 6 controls	Cornea
35	Du G. <i>et al</i>	China	2016	Induction of matrix metalloproteinase-1 by tumor necrosis factor- α is mediated by interleukin-6 in cultured fibroblasts of keratoconus	Investigate the effect of TNF- α and IL-6 on MMP-1 expression. Study the role of IL-6 on TNF- α mediated regulation of MMP-1 in fibroblasts of normal cornea and keratoconus.	3 KC corneas and 3 normal corneas	Cornea
16	Hao, XD. <i>et al</i>	China	2016	Decreased integrity, content, and increased transcript level of mitochondrial DNA are associated with keratoconus	Establish a relationship between keratoconus and mtDNA integrity, content and transcription	198 KC corneas and 106 normal corneas	Cornea
26	Shetty, R. <i>et al</i>	India	2017	Altered tear inflammatory profile in Indian keratoconus patients - The 2015 Col Rangachari Award paper	Analyze the levels of inflammatory factors in the tear fluid of Indian KC patients.	11 KC patients and 6 control subjects	Tear fluid
37	Sobrino, T. <i>et al</i>	Spain	2017	Higher Expression of Toll-Like Receptors 2 and 4 in Blood Cells of Keratoconus Patients.	Mesure the levels of TLR2 and TLR4 in monocytes and neutrophils from keratoconus patients. Analyze the correlation between TLR2/TLR4 expression and serum levels of proinflammatory markers.	40 KC patients and 20 control subjects	Blood
36	Arbab, M. <i>et al</i>	Pakistan	2017	TNF- α genetic predisposition and higher expression of inflammatory pathway components in keratoconus	Understand the role of a promoter region polymorphism rs1800629 in the inflammatory pathway component TNF- α and its effects on the expression of TNF- α and TNFR1 and TNFR2, RELA, and IL-6 in keratoconus development	257 KC patients and 253 healthy subjects	Blood and cornea

Reference	Authors	Country	Ano	Title	Aim	Sample size	Materials
22	Shetty, R. <i>et al</i>	India	2017	Oxidative stress induces dysregulated autophagy in corneal epithelium of keratoconus patients	Study the role of the autophagic lysosomal pathway in the oxidative damage of keratoconus corneal epithelium and the human corneal epithelial cell line	78 KC patients (which 18 with normal corneal topography used as control subjects)	Cornea
21	Gulpamuk, B. <i>et al</i>	Turkey	2017	Novel assay assessment of oxidative stress biomarkers in patients with keratoconus: Thiol–disulfide homeostasis	Investigate systemic oxidative stress by evaluating thiol–disulfide homeostasis in keratoconus patients	28 KC patients and 30 control subjects	Blood
33	McKay, TB. <i>et al</i>	USA	2017	Acute hypoxia influences collagen and matrix metalloproteinase expression by human keratoconus cells in vitro	Analyze the effects of hypoxia on extracellular matrix secretion, assembly, and MMP expression in human corneal fibroblasts from healthy controls and KC patients <i>in vitro</i>		Cornea
40	Sanyal, S. <i>et al</i>	India	2017	Chronic pesticide exposure and consequential keratectasia & corneal neovascularisation	Identify the consequences of chronic pesticide exposure in the cornea	20 adult mice	Cornea
31	Mandathara, PS. <i>et al</i>	Australia	2018	A pilot study on corneal Langerhans cells in keratoconus.	Find an association between Langerhans cells and keratoconus disease	21 KC patients	Cornea
32	Andrade, FEC. <i>et al</i>	Brasil	2018	Evaluation of galectin-1 and galectin-3 as prospective biomarkers in keratoconus	Evaluate the expression of Gal-1 and Gal-3 in patients with KC and CXL treatment <i>in vitro</i>	20 KC patients and 10 control subjects 6 KC corneal buttons and 6 control corneal buttons	Tear fluid and cornea
20	Yari, D. <i>et al</i>	Iran	2018	Genetic polymorphisms of catalase and glutathione peroxidase-1 in keratoconus	Evaluate the effects of single nucleotide polymorphisms in CAT, GPX-1 on the risk of keratoconus	140 KC patients and 150 control subjects	Blood
30	Katipoğlu, Z. <i>et al</i>	Turkey	2019	May Monocyte/HDL Cholesterol Ratio (MHR) and Neutrophil/Lymphocyte Ratio (NLR) Be an Indicator of Inflammation and Oxidative Stress in Patients with Keratoconus?	Evaluate MHR and NLR in patients with KC	31 KC patients and 31 control subjects	Blood
28	Nabil, KM. <i>et al</i>	Egypt	2019	The association between Interleukin 1 Beta promoter polymorphisms and keratoconus incidence and severity in an Egyptian population	Establish na association between IL-1 β promoter polymorphisms and the development and severity of keratoconus	95 KC patients and 126 healthy controls	Blood
18	Atilano, SR. <i>et al</i>	USA	2019	Corneal oxidative damage in keratoconus cells due to decreased oxidant elimination from modified expression levels of SOD enzymes, PRDX6, SCARA3, CPSF3 and FOXM1	Analyze the levels of gene expression for enzymes involved in production and elimination of reactive oxygen/nitrogen species in normal and keratoconus human corneal cells <i>in vitro</i>	5 KC corneas and 6 control corneas	Cornea
19	Caglayan, M. <i>et al</i>	Turkey	2019	Investigation of Heme oxygenase 2 enzyme protein expression in keratoconus and normal human corneal epithelium: An immunohistochemical study	Compare heme oxygenase 2 enzyme levels in the cornea epithelium obtained from keratoconus patients and normal subjects	69 KC patients and 52 control subjects	Cornea
25	Akkaya, S. <i>et al</i>	Turkey	2019	Serum Vitamin D levels in patients with keratoconus	To evaluate serum 25-hydroxyvitamin D levels in patients with keratoconus and its association with disease severity. Compare vitamin D levels with those of age- and sex-matched healthy individual	100 KC patients and 100 healthy subjects	Blood
15	Balmus, IM. <i>et al</i>	Romania	2020	Oxidative stress markers dynamics in keratoconus patients' tears before and after corneal collagen crosslinking procedure	Study the evidence of systemic oxidative stress in keratoconus patients by evaluating three oxidative stress markers in the tears of keratoconus patients before and after CXL procedure	20 KC patients and 20 control subjects	Tear samples

References

1. Gain P, Jullienne R, He Z, et al. Global survey of corneal transplantation and eye banking. *JAMA Ophthalmol.* 2016;134(2):167-173.
doi:10.1001/jamaophthalmol.2015.4776
2. Mas Tur V, MacGregor C, Jayaswal R, O'Brart D, Maycock N. A review of keratoconus: Diagnosis, pathophysiology, and genetics. *Surv Ophthalmol.* 2017;62(6):770-783.
doi:10.1016/j.survophthal.2017.06.009
3. Pinheiro-Costa J, Viana Pinto J, Perestrelo S, et al. Increased Choroidal Thickness in Keratoconus Patients: Perspectives in the Disease Pathophysiology. *J Ophthalmol.* 2019;2019. doi:10.1155/2019/2453931
4. Galvis V, Sherwin T, Tello A, Merayo J, Barrera R, Acera A. Keratoconus: An inflammatory disorder? *Eye.* 2015;29(7):843-859. doi:10.1038/eye.2015.63
5. Kenney MC, Brown DJ. The cascade hypothesis of keratoconus. *Contact Lens Anterior Eye.* 2003;26(3):139-146. doi:10.1016/S1367-0484(03)00022-5
6. Moussa S, Grabner G, Ruckhofer J, Dietrich M, Reitsamer H. Genetics in Keratoconus – What is New? *Open Ophthalmol J.* 2017;11(1):201-210.
doi:10.2174/1874364101711010201
7. Wisse RPL, Kuiper JJW, Gans R, Imhof S, Radstake TRDJ, Van Der Lelij A. Cytokine Expression in Keratoconus and its Corneal Microenvironment: A Systematic Review. *Ocul Surf.* 2015;13(4):272-283. doi:10.1016/j.jtos.2015.04.006
8. Ionescu C, Corbu CG, Tanase C, et al. Inflammatory Biomarkers Profile as Microenvironmental Expression in Keratoconus. *Dis Markers.* 2016;2016.
doi:10.1155/2016/1243819
9. Lambiase A, Micera A, Sacchetti M, Mantelli F, Bonini S. Toll-like receptors in ocular surface diseases: Overview and new findings. *Clin Sci.* 2011;120(10):441-450.
doi:10.1042/CS20100425
10. Lema I, Sobrino T, Durán JA, Brea D, Díez-Feijoo E. Subclinical keratoconus and inflammatory molecules from tears. *Br J Ophthalmol.* 2009;93(6):820-824.
doi:10.1136/bjo.2008.144253
11. Frank PG, Lisanti MP. ICAM-1: Role in inflammation and in the regulation of vascular permeability. *Am J Physiol - Hear Circ Physiol.* 2008;295(3):926-927.
doi:10.1152/ajpheart.00779.2008
12. Wojcik KA, Kaminska A, Blasiak J, Szaflik J, Szaflik JP. Oxidative stress in the

- pathogenesis of keratoconus and Fuchs endothelial corneal dystrophy. *Int J Mol Sci*. 2013;14(9):19294-19308. doi:10.3390/ijms140919294
13. Toprak I, Kucukatay V, Yildirim C, Kilic-Toprak E, Kilic-Erkek O. Increased systemic oxidative stress in patients with keratoconus. *Eye*. 2014;28(3):285-289. doi:10.1038/eye.2013.262
 14. Karaca EE, Özmen MC, Ekici F, Yüksel E, Türkoğlu Z. Neutrophil-to-lymphocyte ratio may predict progression in patients with keratoconus. *Cornea*. 2014;33(11):1168-1173. doi:10.1097/ICO.0000000000000260
 15. Balmus IM, Alexa AI, Ciuntu RE, et al. Oxidative stress markers dynamics in keratoconus patients' tears before and after corneal collagen crosslinking procedure. *Exp Eye Res*. 2020;190(December 2019):107897. doi:10.1016/j.exer.2019.107897
 16. Hao XD, Chen ZL, Qu ML, Zhao XW, Li SX, Chen PC. Decreased integrity, content, and increased transcript level of mitochondrial DNA are associated with keratoconus. *PLoS One*. 2016;11(10):1-14. doi:10.1371/journal.pone.0165580
 17. Wojcik KA, Synowiec E, Kaminska A, et al. Polymorphism of the APEX nuclease 1 gene in keratoconus and Fuchs endothelial corneal dystrophy. *Cell Mol Biol Lett*. 2015;20(1):48-65. doi:10.1515/cmble-2015-0001
 18. Atilano SR, Lee DH, Fukuhara PS, Chwa M, Nesburn AB, Udar N KM. Corneal Oxidative Damage in Keratoconus Cells due to Decreased Oxidant Elimination from Modified Expression Levels of SOD Enzymes, PRDX6, SCARA3, CPSF3, and FOXM1. *J Ophthalmic Vis Res*. 2019;14(1):62-70.
 19. Caglayan M, Kocamis SI, Sarac O, et al. Investigation of Heme Oxygenase 2 Enzyme Protein Expression in Keratoconus and Normal Human Corneal Epithelium: An Immunohistochemical Study. *Curr Eye Res*. 2019;44(1):25-29. doi:10.1080/02713683.2018.1521980
 20. Yari D, Saravani R, Saravani S, Ebrahimian K, Galavi HR. Genetic polymorphisms of catalase and glutathione peroxidase-1 in keratoconus. *Iran J Public Health*. 2018;47(10):1567-1574.
 21. Gulpamuk B, Koç M, Karatepe MS, et al. Novel Assay Assessment of Oxidative Stress Biomarkers in Patients with Keratoconus: Thiol–Disulfide Homeostasis. *Curr Eye Res*. 2017;42(9):1215-1219. doi:10.1080/02713683.2017.1302592
 22. Shetty R, Sharma A, Pahuja N, et al. Oxidative stress induces dysregulated autophagy in corneal epithelium of keratoconus patients. *PLoS One*. 2017;12(9):1-20. doi:10.1371/journal.pone.0184628
 23. Göncü T, Akal A, Adibelli FM, Çakmak S, Sezen H, Yilmaz ÖF. Tear Film and Serum

- Prolidase Activity and Oxidative Stress in Patients with Keratoconus. *Cornea*. 2015;34(9):1019-1023. doi:10.1097/ICO.0000000000000510
24. Kiliç R, Cumurcu T, Sancaktar E, Evliyaoğlu O, Sezer H. Systemic prolidase activity and oxidative stress in keratoconus. *Curr Eye Res*. 2016;41(1):28-33. doi:10.3109/02713683.2015.1004717
 25. Akkaya S, Ulusoy DM. Serum Vitamin D Levels in Patients with Keratoconus. *Ocul Immunol Inflamm*. 2019;0(0):1-6. doi:10.1080/09273948.2019.1604002
 26. Shetty R, Deshmukh R, Ghosh A, Sethu S, Jayadev C. Altered tear inflammatory profile in Indian keratoconus patients - The 2015 Col Rangachari Award paper. *Indian J Ophthalmol*. 2017;65(11):1105-1108. doi:10.4103/ijo.IJO_233_17
 27. Sorkhabi R, Ghorbanhaghjo A, Taheri N, Ahoor MH. Tear film inflammatory mediators in patients with keratoconus. *Int Ophthalmol*. 2015;35(4):467-472. doi:10.1007/s10792-014-9971-3
 28. Nabil KM, Elhady GM, Morsy H. The association between interleukin 1 beta promoter polymorphisms and keratoconus incidence and severity in an Egyptian population. *Clin Ophthalmol*. 2019;13:2217-2223. doi:10.2147/OPTH.S220723
 29. Wang Y, Wei W, Zhang C, et al. Association of Interleukin-1 Gene Single Nucleotide Polymorphisms with Keratoconus in Chinese Han Population. *Curr Eye Res*. 2016;41(5):630-635. doi:10.3109/02713683.2015.1045083
 30. Katipoğlu Z, Mirza E, Oltulu R, Katipoglu B. May Monocyte/HDL Cholesterol Ratio (MHR) and Neutrophil/Lymphocyte Ratio (NLR) Be an Indicator of Inflammation and Oxidative Stress in Patients with Keratoconus? *Ocul Immunol Inflamm*. 2019;00(00):1-5. doi:10.1080/09273948.2019.1611876
 31. Mandathara PS, Stapleton FJ, Kokkinakis J, Willcox MDP. A pilot study on corneal Langerhans cells in keratoconus. *Contact Lens Anterior Eye*. 2018;41(2):219-223. doi:10.1016/j.clae.2017.10.005
 32. Andrade FEC, Covre JL, Ramos L, et al. Evaluation of galectin-1 and galectin-3 as prospective biomarkers in keratoconus. *Br J Ophthalmol*. 2018;102(5):700-707. doi:10.1136/bjophthalmol-2017-311495
 33. McKay TB, Hjortdal J, Priyadarsini S, Karamichos D. Acute hypoxia influences collagen and matrix metalloproteinase expression by human keratoconus cells in vitro. *PLoS One*. 2017;12(4):1-13. doi:10.1371/journal.pone.0176017
 34. Shetty R, Ghosh A, Lim RR, et al. Elevated expression of matrix metalloproteinase-9 and inflammatory cytokines in keratoconus patients is inhibited by cyclosporine A. *Investig Ophthalmol Vis Sci*. 2015;56(2):738-750. doi:10.1167/iovs.14-14831

35. Du G, Liu C, Li X, et al. Induction of matrix metalloproteinase-1 by tumor necrosis factor- α is mediated by interleukin-6 in cultured fibroblasts of keratoconus. *Exp Biol Med*. 2016;241(18):2033-2041. doi:10.1177/1535370216650940
36. Arbab M, Tahir S, Niazi MK, et al. TNF- α genetic predisposition and higher expression of inflammatory pathway components in keratoconus. *Investig Ophthalmol Vis Sci*. 2017;58(9):3481-3487. doi:10.1167/iovs.16-21400
37. Sobrino T, Regueiro U, Malfeito M, et al. Higher Expression of Toll-Like Receptors 2 and 4 in Blood Cells of Keratoconus Patients. *Sci Rep*. 2017;7(1):1-7. doi:10.1038/s41598-017-13525-7
38. McKay TB, Hjortdal J, Sejersen H, Asara JM, Wu J, Karamichos D. Endocrine and Metabolic Pathways Linked to Keratoconus: Implications for the Role of Hormones in the Stromal Microenvironment. *Sci Rep*. 2016;6(May):1-12. doi:10.1038/srep25534
39. You J, Wen L, Roufas A, Hodge C, Sutton G, Madigan MC. Expression of HGF and c-met proteins in human keratoconus corneas. *J Ophthalmol*. 2015;2015. doi:10.1155/2015/852986
40. Sanyal S, Law A, Law S. Chronic pesticide exposure and consequential keratectasia & corneal neovascularisation. *Exp Eye Res*. 2017;164:1-7. doi:10.1016/j.exer.2017.08.002

Appendix

The paper was written following the guidelines of Acta Médica Portuguesa journal



Normas de Publicação da Acta Médica Portuguesa
Acta Medica Portuguesa's Publishing Guidelines
Conselho Editorial ACTA MÉDICA PORTUGUESA
Acta Med Port 2016, 30 dezembro 2016

1. MISSÃO

Publicar trabalhos científicos originais e de revisão na área biomédica da mais elevada qualidade, abrangendo várias áreas do conhecimento médico, e ajudar os médicos a tomar melhores decisões.

Para atingir estes objectivos a Acta Médica Portuguesa publica artigos originais, artigos de revisão, casos clínicos, editoriais, entre outros, comentando sobre os factores clínicos, científicos, sociais, políticos e económicos que afectam a saúde. A Acta Médica Portuguesa pode considerar artigos para publicação de autores de qualquer país.

2. VALORES

Promover a qualidade científica.
Promover o conhecimento e actualidade científica.
Independência e imparcialidade editorial.
Ética e respeito pela dignidade humana.
Responsabilidade social.

3. VISÃO

Ser reconhecida como uma revista médica portuguesa de grande impacto internacional.

Promover a publicação científica da mais elevada qualidade privilegiando o trabalho original de investigação (clínico, epidemiológico, multicêntrico, ciência básica).

Constituir o fórum de publicação de normas de orientação.

Ampliar a divulgação internacional.

Lema: "Primum non nocere, primeiro a Acta Médica Portuguesa"

4. INFORMAÇÃO GERAL

A Acta Médica Portuguesa é a revista científica com revisão pelos pares (*peer-review*) da Ordem dos Médicos. É publicada continuamente desde 1979, estando indexada na PubMed / Medline desde o primeiro número. Desde 2010 tem Factor de Impacto atribuído pelo Journal Citation Reports - Thomson Reuters.

A Acta Médica Portuguesa segue a política do livre acesso. Todos os seus artigos estão disponíveis de forma integral, aberta e gratuita desde 1999 no seu site www.actamedicaportuguesa.com e através da Medline com interface PubMed.

A Acta Médica Portuguesa não cobra quaisquer taxas

relativamente ao processamento ou à submissão de artigos.

A taxa de aceitação da Acta Médica Portuguesa, em 2014, foi de aproximadamente de 20% dos mais de 700 manuscritos recebidos anualmente.

Os manuscritos devem ser submetidos *online* via "Submissões Online" <http://www.actamedicaportuguesa.com/revista/index.php/amp/about/submissions#onlineSubmissions>.

A Acta Médica Portuguesa rege-se de acordo com as boas normas de edição biomédica do International Committee of Medical Journal Editors (ICMJE), do Committee on Publication Ethics (COPE), e do EQUATOR Network Resource Centre Guidance on Good Research Report (desenho de estudos).

A política editorial da Revista incorpora no processo de revisão e publicação as Recomendações de Política Editorial (*Editorial Policy Statements*) emitidas pelo Conselho de Editores Científicos (Council of Science Editors), disponíveis em <http://www.councilscienceeditors.org/i4a/pages/index.cfm?pageid=3331>, que cobre responsabilidades e direitos dos editores das revistas com arbitragem científica. Os artigos propostos não podem ter sido objecto de qualquer outro tipo de publicação. As opiniões expressas são da inteira responsabilidade dos autores. Os artigos publicados ficarão propriedade conjunta da Acta Médica Portuguesa e dos autores.

A Acta Médica Portuguesa reserva-se o direito de comercialização do artigo enquanto parte integrante da revista (na elaboração de separatas, por exemplo). O autor deverá acompanhar a carta de submissão com a declaração de cedência de direitos de autor para fins comerciais.

Relativamente à utilização por terceiros a Acta Médica Portuguesa rege-se pelos termos da licença *Creative Commons* 'Atribuição – Uso Não-Comercial – Proibição de Realização de Obras Derivadas (by-nc-nd)'.

Após publicação na Acta Médica Portuguesa, os autores ficam autorizados a disponibilizar os seus artigos em repositórios das suas instituições de origem, desde que mencionem sempre onde foram publicados.

5. CRITÉRIO DE AUTORIA

A revista segue os critérios de autoria do "International

Committee of Medical Journal Editors" (ICMJE).

Todos designados como autores devem ter participado significativamente no trabalho para tomar responsabilidade pública sobre o conteúdo e o crédito da autoria.

Autores são todos que:

1. Têm uma contribuição intelectual substancial, directa, no desenho e elaboração do artigo
2. Participam na análise e interpretação dos dados
3. Participam na escrita do manuscrito, revendo os rascunhos; ou na revisão crítica do conteúdo; ou na aprovação da versão final
4. Concordam que são responsáveis pela exactidão e integridade de todo o trabalho

As condições 1, 2, 3 e 4 têm de ser reunidas.

Autoria requer uma contribuição substancial para o manuscrito, sendo pois necessário especificar em carta de apresentação o contributo de cada autor para o trabalho.

Ser listado como autor, quando não cumpre os critérios de elegibilidade, é considerado fraude.

Todos os que contribuíram para o artigo, mas que não encaixam nos critérios de autoria, devem ser listados nos agradecimentos.

Todos os autores, (isto é, o autor correspondente e cada um dos autores) terão de preencher e assinar o "Formulário de Autoria" com a responsabilidade da autoria, critérios e contribuições; conflitos de interesse e financiamento e transferência de direitos autorais / *copyright* (modelo disponível em http://www.actamedicaportuguesa.com/info/AMP_template-Declaracao-Responsabilidade-Autoral.doc).

O autor Correspondente deve ser o intermediário em nome de todos os co-autores em todos os contactos com a Acta Médica Portuguesa, durante todo o processo de submissão e de revisão. O autor correspondente é responsável por garantir que todos os potenciais conflitos de interesse mencionados são correctos. O autor correspondente deve atestar, ainda, em nome de todos os co-autores, a originalidade do trabalho e obter a permissão escrita de cada pessoa mencionada na secção "Agradecimentos".

6. COPYRIGHT / DIREITOS AUTORAIS

Quando o artigo é aceite para publicação é mandatório o carregamento na plataforma electrónica de documento digitalizado, assinado por todos os Autores, com a partilha dos direitos de autor entre autores e a Acta Médica Portuguesa.

O(s) Autor(es) deve(m) assinar uma cópia de partilha dos direitos de autor entre autores e a Acta Médica Portuguesa quando submetem o manuscrito, conforme minuta publicada em anexo:

Nota: Este documento assinado só deverá ser enviado quando o manuscrito for aceite para publicação.

Editor da Acta Médica Portuguesa

O(s) Autor(es) certifica(m) que o manuscrito intitulado:

_____ (ref. AMP _____) é original, que todas as afirmações apresentadas como factos são baseados na investigação do(s)

Autor(es), que o manuscrito, quer em parte quer no todo, não infringe nenhum *copyright* e não viola nenhum direito da privacidade, que não foi publicado em parte ou no todo e que não foi submetido para publicação, no todo ou em parte, noutra revista, e que os Autores têm o direito ao *copyright*.

Todos os Autores declaram ainda que participaram no trabalho, se responsabilizam por ele e que não existe, da parte de qualquer dos Autores conflito de interesses nas afirmações proferidas no trabalho.

Os Autores, ao submeterem o trabalho para publicação, partilham com a Acta Médica Portuguesa todos os direitos a interesses do *copyright* do artigo.

Todos os Autores devem assinar

Data: _____

Nome (maiúsculas): _____

Assinatura: _____

7. CONFLITOS DE INTERESSE

O rigor e a exactidão dos conteúdos, assim como as opiniões expressas são da exclusiva responsabilidade dos Autores. Os Autores devem declarar potenciais conflitos de interesse. Os autores são obrigados a divulgar todas as relações financeiras e pessoais que possam enviesar o trabalho.

Para prevenir ambiguidade, os autores têm que explicitamente mencionar se existe ou não conflitos de interesse.

Essa informação não influenciará a decisão editorial mas antes da submissão do manuscrito, os autores têm que assegurar todas as autorizações necessárias para a publicação do material submetido.

Se os autores têm dúvidas sobre o que constitui um relevante interesse financeiro ou pessoal, devem contactar o editor.

8. CONSENTIMENTO INFORMADO e APROVAÇÃO ÉTICA

Todos os doentes (ou seus representantes legais) que possam ser identificados nas descrições escritas, fotografias e vídeos deverão assinar um formulário de consentimento informado para descrição de doentes, fotografia e vídeos. Estes formulários devem ser submetidos com o manuscrito (modelo disponível em http://www.actamedicaportuguesa.com/info/consentimento_informado_do_doente.doc).

A Acta Médica Portuguesa considera aceitável a omissão de dados ou a apresentação de dados menos específicos para identificação dos doentes. Contudo, não aceitaremos a alteração de quaisquer dados.

Os autores devem informar se o trabalho foi aprovado pela Comissão de Ética da instituição de acordo com a declaração de Helsínquia.

9. LÍNGUA

Os artigos devem ser redigidos em português ou em inglês. Os títulos e os resumos têm de ser sempre em português e em inglês.

10. PROCESSO EDITORIAL

O autor correspondente receberá notificação da recepção do manuscrito e decisões editoriais por *email*.

Todos os manuscritos submetidos são inicialmente revistos pelo editor da Acta Médica Portuguesa. Os manuscritos são avaliados de acordo com os seguintes critérios: originalidade, actualidade, clareza de escrita, método de estudo apropriado, dados válidos, conclusões adequadas e apoiadas pelos dados, importância, com significância e contribuição científica para o conhecimento da área, e não tenham sido publicados, na íntegra ou em parte, nem submetidos para publicação noutros locais.

A Acta Médica Portuguesa segue um rigoroso processo cego (*single-blind*) de revisão por pares (*peer-review*, externos à revista). Os manuscritos recebidos serão enviados a peritos das diversas áreas, os quais deverão fazer os seus comentários, incluindo a sugestão de aceitação, aceitação condicionada a pequenas ou grandes modificações ou rejeição. Na avaliação, os artigos poderão ser:

- a) aceites sem alterações;
- b) aceites após modificações propostas pelos consultores científicos;
- c) recusados.

Estipula-se para esse processo o seguinte plano temporal:

- Após a recepção do artigo, o Editor-Chefe, ou um dos Editores Associados, enviará o manuscrito a, no mínimo, dois revisores, caso esteja de acordo com as normas de publicação e se enquadre na política editorial. Poderá ser recusado nesta fase, sem envio a revisores.

- Quando receberem a comunicação de aceitação, os Autores devem remeter de imediato, por correio electrónico, o formulário de partilha de direitos que se encontra no *site* da Acta Médica Portuguesa, devidamente preenchido e assinado por todos os Autores.

- No prazo máximo de quatro semanas, o revisor deverá responder ao editor indicando os seus comentários relativos ao manuscrito sujeito a revisão, e a sua sugestão de quanto à aceitação ou rejeição do trabalho. O Conselho Editorial tomará, num prazo de 15 dias, uma primeira decisão que poderá incluir a aceitação do artigo sem modificações, o envio dos comentários dos revisores para que os Autores procedam de acordo com o indicado, ou a rejeição do artigo.

Os Autores dispõem de 20 dias para submeter a nova versão revista do manuscrito, contemplando as modificações recomendadas pelos peritos e pelo Conselho Editorial. Quando são propostas alterações, o autor deverá no prazo máximo de vinte dias, carregar na plataforma electrónica da Acta Médica Portuguesa uma versão revista do artigo, com as alterações inseridas destacadas com cor diferente, bem como um novo Documento Suplementar respondendo a todas as questões colocadas.

- O Editor-Chefe dispõe de 15 dias para tomar a decisão sobre a nova versão: rejeitar ou aceitar o artigo na nova versão, ou submetê-lo a um ou mais revisores externos cujo parecer poderá, ou não, coincidir com os resultantes

da primeira revisão.

- Caso o manuscrito seja reenviado para revisão externa, os peritos dispõem de quatro semanas para o envio dos seus comentários e da sua sugestão quanto à aceitação ou recusa para publicação do mesmo.

- Atendendo às sugestões dos revisores, o Editor-Chefe poderá aceitar o artigo nesta nova versão, rejeitá-lo ou voltar a solicitar modificações. Neste último caso, os Autores dispõem de um mês para submeter uma versão revista, a qual poderá, caso o Editor-Chefe assim o determine, voltar a passar por um processo de revisão por peritos externos.

- No caso da aceitação, em qualquer das fases anteriores, a mesma será comunicada ao Autor principal. Num prazo inferior a um mês, o Conselho Editorial enviará o artigo para revisão dos Autores já com a formatação final, mas sem a numeração definitiva. Os Autores dispõem de cinco dias para a revisão do texto e comunicação de quaisquer erros tipográficos. Nesta fase, os Autores não podem fazer qualquer modificação de fundo ao artigo, para além das correcções de erros tipográficos e/ou ortográficos de pequenos erros. Não são permitidas, nomeadamente, alterações a dados de tabelas ou gráficos, alterações de fundo do texto, etc.

- Após a resposta dos Autores, ou na ausência de resposta, após o decurso dos cinco dias, o artigo considera-se concluído.

- Na fase de revisão de provas tipográficas, alterações de fundo aos artigos não serão aceites e poderão implicar a sua rejeição posterior por decisão do Editor-Chefe.

Chama-se a atenção que a transcrição de imagens, quadros ou gráficos de outras publicações deverá ter a prévia autorização dos respectivos autores para dar cumprimento às normas que regem os direitos de autor.

11. PUBLICAÇÃO FAST-TRACK

A Acta Médica Portuguesa dispõe do sistema de publicação *Fast-Track* para manuscritos urgentes e importantes desde que cumpram os requisitos da Acta Médica Portuguesa para o *Fast-Track*.

- a) Os autores para requererem a publicação *fast-track* devem submeter o seu manuscrito em <http://www.actamedicaportuguesa.com/> “submeter artigo” indicando claramente porque consideram que o manuscrito é adequado para a publicação rápida. O Conselho Editorial tomará a decisão sobre se o manuscrito é adequado para uma via rápida (*fast-track*) ou para submissão regular;

- b) Verifique se o manuscrito cumpre as normas aos autores da Acta Médica Portuguesa e que contém as informações necessárias em todos os manuscritos da Acta Médica Portuguesa.

- c) O Gabinete Editorial irá comunicar, dentro de 48 horas, se o manuscrito é apropriado para avaliação *fast-track*. Se o Editor-Chefe decidir não aceitar a avaliação *fast-track*, o manuscrito pode ser considerado para o processo de revisão normal. Os autores também terão a oportunidade de retirar a sua submissão.

- d) Para manuscritos que são aceites para avaliação

NORMAS PUBLICAÇÃO

fast-track, a decisão Editorial será feita no prazo de 5 dias úteis.

e) Se o manuscrito for aceite para publicação, o objectivo será publicá-lo, online, no prazo máximo de 3 semanas após a aceitação.

12. REGRAS DE OURO ACTA MÉDICA PORTUGUESA

a) O editor é responsável por garantir a qualidade da revista e que o que publica é ético, actual e relevante para os leitores.

b) A gestão de reclamações passa obrigatoriamente pelo editor-chefe e não pelo bastonário.

c) O peer review deve envolver a avaliação de revisores externos.

d) A submissão do manuscrito e todos os detalhes associados são mantidos confidenciais pelo corpo editorial e por todas as pessoas envolvidas no processo de peer-review.

e) A identidade dos revisores é confidencial.

f) Os revisores aconselham e fazem recomendações; o editor toma decisões.

g) O editor-chefe tem total independência editorial.

h) A Ordem dos Médicos não interfere directamente na avaliação, selecção e edição de artigos específicos, nem directamente nem por influência indirecta nas decisões editoriais.

i) As decisões editoriais são baseadas no mérito do trabalho submetido e adequação à revista.

j) As decisões do editor-chefe não são influenciadas pela origem do manuscrito nem determinadas por agentes exteriores.

k) As razões para rejeição imediata sem peer review externo são: falta de originalidade; interesse limitado para os leitores da Acta Médica Portuguesa; conter graves falhas científicas ou metodológicas; o tópico não é coberto com a profundidade necessária; é preliminar de mais e/ou especulativo; informação desactualizada.

l) Todos os elementos envolvidos no processo de peer review devem actuar de acordo com os mais elevados padrões éticos.

m) Todas as partes envolvidas no processo de peer review devem declarar qualquer potencial conflito de interesses e solicitar escusa de rever manuscritos que sintam que não conseguirão rever objectivamente.

13. NORMAS GERAIS

ESTILO

Todos os manuscritos devem ser preparados de acordo com o "AMA Manual of Style", 10th ed. e/ou "Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical Journals".

Escreva num estilo claro, directo e activo. Geralmente, escreva usando a primeira pessoa, voz activa, por exemplo, "Analisámos dados", e não "Os dados foram analisados". Os agradecimentos são as excepções a essa directriz, e deve ser escrito na terceira pessoa, voz activa; "Os autores gostariam de agradecer". Palavras em latim ou noutra língua que não seja a do texto deverão ser colocadas em itálico.

Os componentes do manuscrito são: Página de Título, Resumo, Texto, Referências, e se apropriado, legendas de figuras. Inicie cada uma dessas secções em uma nova página, numeradas consecutivamente, começando com a página de título.

Os formatos de arquivo dos manuscritos autorizados incluem o *Word* e o *WordPerfect*. Não submeta o manuscrito em formato PDF.

SUBMISSÃO

Os manuscritos devem ser submetidos online, via "Submissão Online" da Acta Médica Portuguesa <http://www.actamedicaportuguesa.com/revista/index.php/amp/about/submissions#onlineSubmissions>.

Todos os campos solicitados no sistema de submissão online terão de ser respondidos.

Após submissão do manuscrito o autor receberá a confirmação de recepção e um número para o manuscrito.

Na primeira página/ página de título:

a) Título em **português e inglês**, conciso e descritivo

b) Na linha da autoria, liste o Nome de todos os Autores (primeiro e último nome) com os títulos académicos e/ou profissionais e respectiva afiliação (departamento, instituição, cidade, país)

c) Subsídio(s) ou bolsa(s) que contribuíram para a realização do trabalho

d) Morada e *e-mail* do Autor responsável pela correspondência relativa ao manuscrito

e) Título breve para cabeçalho

Na segunda página

a) Título (sem autores)

b) Resumo em **português e inglês**. Nenhuma informação que não conste no manuscrito pode ser mencionada no resumo. Os resumos não podem remeter para o texto, não podendo conter citações nem referências a figuras.

c) Palavras-chave (*Keywords*). Um máximo de 5 *Keywords* em inglês utilizando a terminologia que consta no Medical Subject Headings (MeSH), <http://www.nlm.nih.gov/mesh/MBrowser.html>, devem seguir-se ao resumo.

Na terceira página e seguintes:

■ Editoriais:

Os Editoriais serão apenas submetidos por convite do Editor. Serão comentários sobre tópicos actuais. Não devem exceder as 1.200 palavras nem conter tabelas/figuras e terão um máximo de 5 referências bibliográficas. Não precisam de resumo.

■ Perspectiva:

Artigos elaborados apenas por convite do Conselho Editorial. Podem cobrir grande diversidade de temas com interesse nos cuidados de saúde: problemas actuais ou emergentes, gestão e política de saúde, história da medicina, ligação à sociedade, epidemiologia, etc.

Um Autor que deseje propor um artigo desta categoria

deverá remeter previamente ao Editor-Chefe o respectivo resumo, indicação dos autores e título do artigo para avaliação.

Deve conter no máximo 1200 palavras (excluindo as referências e as legendas) e até 10 referências bibliográficas. Só pode conter uma tabela ou uma figura. Não precisa de resumo.

■ Artigos Originais:

O texto deve ser apresentado com as seguintes secções: Introdução (incluindo Objectivos), Material e Métodos, Resultados, Discussão, Conclusão, Agradecimentos (se aplicável), Referências, Tabelas e Figuras.

Os Artigos Originais não deverão exceder as 4.000 palavras, excluindo referências e ilustrações. Deve ser acompanhado de ilustrações, com um máximo de 6 figuras/tabelas e 60 referências bibliográficas.

O resumo dos artigos originais não deve exceder as 250 palavras e serão estruturados (com cabeçalhos: Introdução, Materiais e Métodos, Resultados, Discussão e Conclusão).

A Acta Médica Portuguesa, como membro do ICMJE, exige como condição para publicação, o registo de todos os ensaios num registo público de ensaios aceite pelo ICMJE (ou seja, propriedade de uma instituição sem fins lucrativos e publicamente acessível, por ex. clinicaltrials.gov). Todos os manuscritos reportando ensaios clínicos têm de seguir o CONSORT Statement <http://www.consort-statement.org/>.

Numa revisão sistemática ou meta-análise siga as PRISMA *guidelines*.

Numa meta-análise de estudos observacionais, siga as MOOSE *guidelines* e apresente como um ficheiro complementar o protocolo do estudo, se houver um.

Num estudo de precisão de diagnóstico, siga as STARD *guidelines*.

Num estudo observacional, siga as STROBE *guidelines*.

Num *Guideline* clínico incentivamos os autores a seguir a GRADE *guidance* para classificar a evidência.

■ Artigos de Revisão:

Destinam-se a abordar de forma aprofundada, o estado actual do conhecimento referente a temas de importância. Estes artigos serão elaborados a convite da equipa editorial, contudo, a título excepcional, será possível a submissão, por autores não convidados (com ampla experiência no tema) de projectos de artigo de revisão que, julgados relevantes e aprovados pelo editor, poderão ser desenvolvidos e submetidos às normas de publicação.

Comprimento máximo: 3500 palavras de texto (não incluindo resumo, legendas e referências). Não pode ter mais do que um total de 4 tabelas e / ou figuras, e não mais de 50-75 referências.

O resumo dos artigos de revisão não deve exceder as 250 palavras e serão estruturados (com cabeçalhos: Introdução, Materiais e Métodos, Resultados, Discussão, Conclusão).

■ Caso Clínico:

O relato de um caso clínico com justificada razão de publicação (raridade, aspectos inusitados, evoluções atípicas, inovações terapêuticas e de diagnóstico, entre outras). As secções serão: Introdução, Caso Clínico, Discussão, Referências.

A linha de autoria deste tipo de artigos não deverá exceder quatro autores. Outros contributos poderão ser reconhecidos no final do texto, sob o parágrafo "Agradecimentos".

O texto não deve exceder as 1.000 palavras e 15 referências bibliográficas. Deve ser acompanhado de figuras ilustrativas. O número de tabelas/figuras não deve ser superior a 5.

Inclua um resumo não estruturado que não exceda 150 palavras, que sumarie o objectivo, pontos principais e conclusões do artigo.

■ Imagens em Medicina (Imagem Médica):

A Imagem em Medicina é um contributo importante da aprendizagem e da prática médica. Poderão ser aceites imagens clínicas, de imagiologia, histopatologia, cirurgia, etc. Podem ser enviadas até duas imagens por caso.

Deve incluir um título com um máximo de oito palavras e um texto com um máximo de 150 palavras onde se dê informação clínica relevante, incluindo um breve resumo do historial do doente, dados laboratoriais, terapêutica e condição actual. Não pode ter mais do que três autores e cinco referências bibliográficas. Não precisa de resumo.

Só são aceites fotografias originais, de alta qualidade, que não tenham sido submetidas a prévia publicação. Para informação sobre o envio de imagens digitais, consulte as «Normas técnicas para a submissão de figuras, tabelas ou fotografias».

■ Guidelines / Normas de orientação:

As sociedades médicas, os colégios das especialidades, as entidades oficiais e / ou grupos de médicos que desejem publicar na Acta Médica Portuguesa recomendações de prática clínica, deverão contactar previamente o Conselho Editorial e submeter o texto completo e a versão para ser publicada. O Editor-Chefe poderá colocar como exigência a publicação exclusiva das recomendações na Acta Médica Portuguesa.

Poderá ser acordada a publicação de uma versão resumida na edição impressa cumulativamente à publicação da versão completa no *site* da Acta Médica Portuguesa.

■ Cartas ao Editor:

Devem constituir um comentário a um artigo da Acta Med Port ou uma pequena nota sobre um tema ou caso clínico. Não devem exceder as 400 palavras, nem conter mais de uma ilustração e ter um máximo de 5 referências bibliográficas. Não precisam de resumo.

Deve seguir a seguinte estrutura geral: Identificar o artigo (torna-se a referência 1); Dizer porque está a escrever; fornecer evidência (a partir da literatura ou a partir de uma

experiência pessoal) fornecer uma súmula; citar referências.

A(s) resposta(s) do(s) Autor(es) devem observar as mesmas características.

Uma Carta ao editor discutindo um artigo recente da Acta Med Port terá maior probabilidade de aceitação se for submetida quatro semanas após a publicação do artigo.

Abreviaturas: Não use abreviaturas ou acrónimos no título nem no resumo, e limite o seu uso no texto. O uso de acrónimos deve ser evitado, assim como o uso excessivo e desnecessário de abreviaturas. Se for imprescindível recorrer a abreviaturas não consagradas, devem ser definidas na primeira utilização, por extenso, logo seguido pela abreviatura entre parênteses. Não coloque pontos finais nas abreviaturas.

Unidades de Medida: As medidas de comprimento, altura, peso e volume devem ser expressas em unidades do sistema métrico (metro, quilograma ou litro) ou seus múltiplos decimais.

As temperaturas devem ser dadas em graus Celsius (°C) e a pressão arterial em milímetros de mercúrio (mm Hg).

Para mais informação consulte a tabela de conversão “Units of Measure” no *website* da AMA Manual Style.

Nomes de Medicamentos, Dispositivos ou outros Produtos: Use o nome não comercial de medicamentos, dispositivos ou de outros produtos, a menos que o nome comercial seja essencial para a discussão.

IMAGENS

Numere todas as imagens (figuras, gráficos, tabelas, fotografias, ilustrações) pela ordem de citação no texto.

Inclua um título/legenda para cada imagem (uma frase breve, de preferência com não mais do que 10 a 15 palavras).

A publicação de imagens a cores é gratuita.

No manuscrito, são aceitáveis os seguintes formatos: BMP, EPS, JPG, PDF e TIF, com 300 dpi de resolução, pelo menos 1200 *pixels* de largura e altura proporcional.

As Tabelas/Figuras devem ser numeradas na ordem em que são citadas no texto e assinaladas em numeração árabe e com identificação, figura/tabela. Tabelas e figuras devem ter numeração árabe e legenda. Cada Figura e Tabela incluídas no trabalho têm de ser referidas no texto, da forma que passamos a exemplificar:

Estes são alguns exemplos de como uma resposta imunitária anormal pode estar na origem dos sintomas da doença de Behçet (Fig. 4).

Esta associa-se a outras duas lesões cutâneas (Tabela 1).

Figura: Quando referida no texto é abreviada para Fig., enquanto a palavra Tabela não é abreviada. Nas legendas ambas as palavras são escritas por extenso.

Figuras e tabelas serão numeradas com numeração árabe independentemente e na sequência em que são referidas no texto.

Exemplo: Fig. 1, Fig. 2, Tabela 1

Legendas: Após as referências bibliográficas, ainda no ficheiro de texto do manuscrito, deverá ser enviada legenda detalhada (sem abreviaturas) para cada imagem. A imagem tem que ser referenciada no texto e indicada a sua localização aproximada com o comentário “Inserir Figura nº 1... aqui”.

Tabelas: É obrigatório o envio das tabelas a preto e branco no final do ficheiro. As tabelas devem ser elaboradas e submetidas em documento *word*, em formato de tabela simples (*simple grid*), sem utilização de tabuladores, nem modificações tipográficas. Todas as tabelas devem ser mencionadas no texto do artigo e numeradas pela ordem que surgem no texto. Indique a sua localização aproximada no corpo do texto com o comentário “Inserir Tabela nº 1... aqui”. Neste caso os autores autorizam uma reorganização das tabelas caso seja necessário.

Quaisquer tabelas submetidas que sejam mais longas/largas do que duas páginas A4 serão publicadas como Apêndice ao artigo.

As tabelas devem ser acompanhadas da respectiva legenda/título, elaborada de forma sucinta e clara.

Legendas devem ser auto-explicativas (sem necessidade de recorrer ao texto) – é uma declaração descritiva.

Legenda/Título das Tabelas: Colocada por cima do corpo da tabela e justificada à esquerda. Tabelas são lidas de cima para baixo. Na parte inferior serão colocadas todas as notas informativas – notas de rodapé (abreviaturas, significado estatístico, etc.) As notas de rodapé para conteúdo que não caiba no título ou nas células de dados devem conter estes símbolos *, †, ‡, §, ||, ¶, **, ††, ‡‡, §§, ||||, ¶¶.

Figuras: Os ficheiros «figura» podem ser tantos quantas imagens tiver o artigo. Cada um destes elementos deverá ser submetido em ficheiro separado, obrigatoriamente em versão electrónica, pronto para publicação. As figuras (fotografias, desenhos e gráficos) não são aceites em ficheiros *word*.

Em formato TIF, JPG, BMP, EPS e PDF com 300 *dpi* de resolução, pelo menos 1200 *pixels* de largura e altura proporcional.

As legendas têm que ser colocadas no ficheiro de texto do manuscrito.

Caso a figura esteja sujeita a direitos de autor, é responsabilidade dos autores do artigo adquirir esses direitos antes do envio do ficheiro à Acta Médica Portuguesa.

Legenda das Figuras: Colocada por baixo da figura, gráfico e justificada à esquerda. Gráficos e outras figuras são habitualmente lidos de baixo para cima.

Só são aceites imagens de doentes quando necessárias para a compreensão do artigo. Se for usada uma figura em que o doente seja identificável deve ser obtida e remetida à Acta Médica Portuguesa a devida autorização. Se a fotografia permitir de forma óbvia a identificação do doente, esta poderá não ser aceite. Em caso de dúvida, a decisão final será do Editor-Chefe.

- **Fotografias:** Em formato TIF, JPG, BMP e PDF com 300 *dpis* de resolução, pelo menos 1200 *pixels* de largura e altura proporcional.

- **Desenhos e gráficos:** Os desenhos e gráficos devem ser enviados em formato vectorial (AI, EPS) ou em ficheiro bitmap com uma resolução mínima de 600 dpi. A fonte a utilizar em desenhos e gráficos será obrigatoriamente Arial. As imagens devem ser apresentadas em ficheiros separados submetidos como documentos suplementares, em condições de reprodução, de acordo com a ordem em que são discutidas no texto. As imagens devem ser fornecidas independentemente do texto.

AGRADECIMENTOS (facultativo)

Devem vir após o texto, tendo como objectivo agradecer a todos os que contribuíram para o estudo mas não têm peso de autoria. Nesta secção é possível agradecer a todas as fontes de apoio, quer financeiro, quer tecnológico ou de consultoria, assim como contribuições individuais. Cada pessoa citada nesta secção de agradecimentos deve enviar uma carta autorizando a inclusão do seu nome.

REFERÊNCIAS

Os autores são responsáveis pela exactidão e rigor das suas referências e pela sua correcta citação no texto.

As referências bibliográficas devem ser citadas numericamente (algarismos árabes formatados sobrescritos) por ordem de entrada no texto e ser identificadas no texto com algarismos árabes. **Exemplo:** “Dimethylfumarate has also been a systemic therapeutic option in moderate to severe psoriasis since 1994¹³ and in multiple sclerosis.¹⁴”

Se forem citados mais de duas referências em sequência, apenas a primeira e a última devem ser indicadas, sendo separadas por traço.⁵⁻⁹

Em caso de citação alternada, todas as referências devem ser digitadas, separadas por vírgula.^{12,15,18}

As referências são alinhadas à esquerda.

Não deverão ser incluídos na lista de referências quaisquer artigos ainda em preparação ou observações não publicadas, comunicações pessoais, etc. Tais inclusões só são permitidas no corpo do manuscrito (ex: P. Andrade, comunicação pessoal).

As abreviaturas usadas na nomeação das revistas devem ser as utilizadas pelo National Library of Medicine (NLM) *Title Journals Abbreviations* <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nlmcatalog/journals>

Notas: Não indicar mês da publicação.

Nas referências com 6 ou menos Autores devem ser nomeados todos. Nas referências com 7 ou mais autores devem ser nomeados os 6 primeiros seguidos de “et al”.

Seguem-se alguns exemplos de como devem constar os vários tipos de referências.

Artigo:

Apelido Iniciais do(s) Autor(es). Título do artigo. Título das revistas [abreviado]. Ano de publicação; Volume: página-

nas.

1. Com menos de 6 autores

Miguel C, Mediavilla MJ. Abordagem actual da gota. *Acta Med Port.* 2011;24:791-8.

2. Com mais de 6 autores

Norte A, Santos C, Gamboa F, Ferreira AJ, Marques A, Leite C, et al. Pneumonia Necrotizante: uma complicação rara. *Acta Med Port.* 2012;25:51-5.

Monografia:

Autor/Editor AA. Título: completo. Edição (se não for a primeira). Vol.(se for trabalho em vários volumes). Local de publicação: Editor comercial; ano.

1. Com Autores:

Moore, K. *Essential Clinical Anatomy*. 4th ed. Philadelphia: Wolters Kluwer Lippincott Williams & Wilkins; 2011.

2. Com editor:

Gilstrap LC 3rd, Cunningham FG, VanDorsten JP, editors. *Operative obstetrics*. 2nd ed. New York: McGraw-Hill; 2002.

Capítulo de monografia:

Meltzer PS, Kallioniemi A, Trent JM. Chromosome alterations in human solid tumors. In: Vogelstein B, Kinzler KW, editors. *The genetic basis of human cancer*. New York: McGraw-Hill; 2002. p. 93-113.

Relatório Científico/Técnico:

Lugg DJ. Physiological adaptation and health of an expedition in Antarctica: with comment on behavioural adaptation. Canberra: A.G.P.S.; 1977. Australian Government Department of Science, Antarctic Division. ANARE scientific reports. Series B(4), Medical science No. 0126

Documento electrónico:

1. CD-ROM

Anderson SC, Poulsen KB. *Anderson's electronic atlas of hematology* [CD-ROM]. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2002.

2. Monografia da Internet

Van Belle G, Fisher LD, Heagerty PJ, Lumley TS. *Biostatistics: a methodology for the health sciences* [e-book]. 2nd ed. Somerset: Wiley InterScience; 2003 [consultado 2005 Jun 30]. Disponível em: Wiley InterScience electronic collection

3. Homepage/Website

Cancer-Pain.org [homepage na Internet]. New York: Association of Cancer Online Resources, Inc.; c2000-01; [consultado 2002 Jul 9]. Disponível em: <http://www.cancer-pain.org/>.

PROVAS TIPOGRÁFICAS

Serão da responsabilidade do Conselho Editorial, se os Autores não indicarem o contrário. Neste caso elas deverão ser feitas no prazo determinado pelo Conselho Editorial, em função das necessidades editoriais da Revista. Os autores receberão as provas para publicação em formato PDF para correcção e deverão devolvê-las num prazo de 48 horas.

ERRATA E RETRACÇÕES

A Acta Médica Portuguesa publica alterações, emendas ou retracções a um artigo anteriormente publicado. Alterações posteriores à publicação assumirão a forma de errata.

NOTA FINAL

Para um mais completo esclarecimento sobre este assunto aconselha-se a leitura do *Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical Journals* do International Committee of Medical Journal Editors), disponível em <http://www.ICMJE.org>.