UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS

ALAN BESBORODCO

**Genética de ceratocone:
Estudo genético e molecular de uma família brasileira**

**Genetics of keratoconus:
Genetical and molecular study of a Brazilian family**

São Paulo
2018

ALAN BESBORODCO

**Genética de ceratocone:
Estudo genético e molecular de uma família brasileira**

**Genetics of keratoconus:
Genetical and molecular study of a Brazilian family**

Versão Original

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências da
Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre
em Aconselhamento Genético e Genômica Humana.

Área de Concentração: Genética Humana

Orientador: Prof. Dr. Paulo Alberto Otto

São Paulo
2018

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Catálogo na publicação
Serviço de Biblioteca e Documentação
Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo

Ficha catalográfica elaborada pelo Serviço de Biblioteca do Instituto de Biociências da USP,
com os dados fornecidos pelo autor no formulário:
<http://www.ib.usp.br/biblioteca/ficha-catalografica/ficha.php>

Besborodco, Alan
Genética de ceratocone : Estudo genético e molecular
de uma família brasileira / Alan Besborodco ; orientador
Paulo Alberto Otto. -- São Paulo, 2018.

56 f.

Dissertação (Mestrado) - Instituto de Biociências da
Universidade de São Paulo, Departamento de Genética e
Biologia Evolutiva.

1. OFTALMOPATIAS. 2. PREDISPOSIÇÃO GENÉTICA PARA
DOENÇA. 3. córnea. 4. análise de ligação. 5. NGS. I. Otto,
Paulo Alberto, orient. II. Título.

Bibliotecária responsável pela estrutura da catalogação da publicação:
Elisabete da Cruz Neves - CRB - 8/6228

Nome: BESBORODCO, Alan

Título: Genética de ceratocone: Estudo genético e molecular de uma família brasileira

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Aconselhamento Genético e Genômica Humana.

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

Prof.Dr. _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

AGRADECIMENTOS

À Profa. Regina Célia Mingroni, que muito me orientou e ensinou, contribuindo para o meu crescimento científico e intelectual.

Ao Dr. Paulo A. Otto, pela atenção, orientação e apoio.

Ao Dr. Rossen M. Hazarbassanov, pela atenção, orientação e apoio.

Ao Instituto de Biociências, pela oportunidade de realização do curso de mestrado profissional.

Ao CEPID FAPESP Centro de Pesquisa e Estudos do Genoma Humano e Células Tronco (CEGH-CEL), pelo financiamento dos experimentos.

Ao Dr. Evandro Schapira e à Ophthal Hospital Especializado LTDA., pela oportunidade de realização da presente pesquisa.

Ao André Silva Bueno, que gentilmente me ensinou todas as técnicas de bancada que aprendi. E ao Vinícius Borges, que realizou as análises de bioinformática.

Aos professores e colaboradores que permitiram a realização dos estágios de observação, para completar a carga necessária para o depósito dessa dissertação, em especial a Dra. Rachel Honjo (do Instituto da Criança, Hospital das Clínicas-USP) e o Dr. Fernando Kok (do Departamento de Neurologia, FMUSP e CEGH-IBUSP).

Aos participantes voluntários do estudo.

À minha noiva Milena, aos meus pais, irmão e sogros.

RESUMO

O ceratocone é uma disfunção da córnea, que geralmente manifesta-se por meio de um astigmatismo irregular e de um alto grau de miopia. O estágio avançado da doença é a principal causa de indicação da cirurgia de transplante de córnea. Certamente, trata-se de uma condição complexa, com etiologia multifatorial: fatores genéticos e ambientais estão associados para a expressão fenotípica. A maioria dos casos vistos na prática clínica são não sindrômicos (cursam sem comorbidades) e isolados, mas há uma proporção considerável de casos familiares. Foi feito um levantamento bibliográfico das principais variantes associadas ou relacionadas à doença para auxiliar na investigação. O presente projeto teve por objetivo identificar uma possível variante causal, por meio de estudo de ligação de amplitude genômica (GWLS), de uma família brasileira com 15 afetados por ceratocone, após a extração de DNA e genotipagem das amostras por microarranjo de SNP. Também foi realizado o sequenciamento de exoma do probando, visando filtrar as variantes patogênicas candidatas a explicar a doença. Foram encontradas 123 variantes suspeitas no exoma do paciente avaliado por NGS. Adicionalmente, identificou-se 3 regiões com LOD Score >1 (1p35.2-p34.3; 2q32.3-q33.2; 3q23; 5q11.2-q13.2) e uma com LOD Score>2 (19p13.11-q12). A combinação das duas metodologias permitiu a identificação de três variantes, sendo uma delas provavelmente implicada na etiologia, ainda por validar. Duas outras variantes foram excluídas.

Palavras-chave: 1. Ceratocone 2. Genética médica 3. Córnea, ectasia de 4. Estudo de ligação 5. Brasileiros 6. Marcadores Molecular 7. NGS – Sequenciamento de Nova Geração

ABSTRACT

Keratoconus is a dysfunction of the cornea, which usually manifests itself through irregular astigmatism and a high degree of myopia. The advanced stage of the disease is the leading cause of indication for corneal transplant surgery. Certainly, it is a complex condition with a multifactorial etiology: genetic and environmental factors acts together to the phenotypic expression. Most of the cases seen in clinical practice are non-syndromic (with no comorbidities) and isolated, but there is a considerable proportion of familial cases. A bibliographic survey of the main variants associated or related to the disease was made to suport the investigation. The present project aimed to identify a possible causal variant by genomic amplitude binding study (GWLS) of a Brazilian family with 15 affected by keratoconus, after DNA extraction and genotyping of the samples by SNP microarray. It was also performed one exome sequencing, aiming to filter out the pathogenic candidate variants from the proband to explain the disease. 123 suspected variants were found in the patient's exams evaluated by NGS. In addition, 3 regions with LOD Score > 1 (1p35.2-p34.3; 2q32.3-q33.2; 3q23; 5q11.2-q13.2) and one with LOD Score > 2 (19p13.11 -q12). The combination of the two methodologies allowed the identification of three variants, one of them probably implicated in the etiology, yet to be validated. Two other variants were excluded.

Keywords: 1. Keratoconus 2. Medical Genetics 3. Cornea ectasy 4. Linkage study 5. Brazilian 6. Molecular biology 7. NGS

1. Introdução e revisão bibliográfica

O ceratocone é uma disfunção da córnea, tecido da região anterior do globo ocular. O defeito resulta de alterações estruturais progressivas que tornam essa região mais fina e que modificam a sua curvatura normal, conferindo-lhe um aspecto cônico. Daí o nome 'ceratocone', do grego 'keratos' (que significa córnea), e 'konos', palavra que indica um formato cônico.

Geralmente, o ceratocone manifesta-se por meio de um astigmatismo irregular e de um alto grau de miopia, podendo às vezes estar acompanhado da formação de cicatrizes na córnea.

Sua apresentação geralmente é bilateral e assimétrica, porque tende a evoluir de modo descompassado nos dois olhos. A correção do defeito normalmente é feita com óculos e lentes de contato.

Alguns casos mais graves são indicativos de intervenção cirúrgica, sendo as mais importantes a técnica de *cross link* (que estabiliza a progressão da doença) e o implante de anel intraestromal (que é capaz de reduzir a curvatura e melhorar a acuidade visual do paciente). Aproximadamente 20% dos casos precisam de transplante ortólogo de córnea, que ainda constitui a causa principal dessa cirurgia no Ocidente.

Apesar de interpretado por muito tempo como um defeito de origem não-inflamatória, mais recentemente descobriu-se que o ceratocone está relacionado à ação de enzimas proteolíticas, citocinas e radicais livres (GALVIS et al., 2015). Embora existam algumas incertezas sobre a sua etiologia e patogênese, alguns estudos indicam uma possível relação do defeito com a diminuição por apoptose do número de ceratócitos da massa celular da córnea, ocorrendo concomitantemente ao aumento do stress oxidativo e da quantidade de citocinas, provavelmente como manifestação de um desequilíbrio crônico da resposta inflamatória local (ROMERO-JIMÉNEZ, SANTODOMINGO-RUBIDO, WOLFFSOHN, 2010).

A incidência do defeito foi estimada entre 1 afetado a cada

500 a 2000 pessoas da população geral (ABU-AMERO, AL-MUAMMAR, KONDKAR, 2014). Essas frequências são muito variáveis entre populações diversas, indo de 0.0003% na Rússia a 2,3% na Índia.

O defeito se instala geralmente após a puberdade, entre as idades de 13 e 18 anos, tendendo a progredir durante 6 a 8 anos, até se estabilizar.

Inicialmente, os afetados queixam-se de visão borrada (NADERAN et al., 2015). Com a progressão da doença, a córnea desenvolve um formato cônico e o paciente apresenta astigmatismo irregular e alto grau de miopia, o que resulta em diminuição da acuidade visual, muitas vezes impossível de ser compensada apenas pelo uso de óculos (GRÜNAUER-KLOEVEKORN & DUNCKER, 2006). No começo, a doença compromete somente um dos globos oculares, mas em 20 a 50% dos casos ambos os olhos são acometidos pelo defeito após alguns anos (SMADJA et al. 2013). Acredita-se que homens e mulheres sejam afetados com igual frequência.

A doença evolui segundo estágios estabelecidos por vários autores, os quais são determinados com certa precisão apenas por meio de exames oftalmológicos especiais. Por exemplo, os valores de ceratometria (medidas de curvatura inferidas a partir do comportamento de espelho convexo da córnea) variam significativamente entre esses estágios (NADERAN et al., 2015). A videoceratografia (que estuda a topografia de córnea) tem sido o método diagnóstico mais utilizado recentemente para a detecção do ceratocone e de outras anormalidades corneanas (CARVALHO, 2005). Outros sinais do defeito, como cicatrizes corneanas, anel de Fleischer, estrias de Vogt, sinal de Munson, deformação em formato de V, hidropsia, sinal de Rizzuti, etc, usados para caracterizar esses estágios, são avaliados por meio do exame de biomicroscopia. Tem se mostrado especialmente útil na detecção do defeito em suas fases iniciais pré-clínicas o exame Pentacam, que apresenta maior repetibilidade das medidas corneanas por ser independente da película lacrimal do paciente.

O ceratocone avançado é a principal causa de indicação de

transplante de córnea. Entre os tratamentos cirúrgicos disponíveis, destaca-se a cirurgia de "cross linking", que consiste na fotoestimulação com luz ultravioleta e na administração de riboflavina; essa modalidade terapêutica impede a progressão da doença em 70% dos casos (O'Brart, 2014). A inserção de "anel de Ferrara" (implante de material sintético) é importante para a correção da curvatura da córnea e diminuição do grau da miopia; trata-se de uma técnica que pode ser indicada simultaneamente ao "cross linking" (VEGA-ESTRADA & ALIO, 2016).

O ceratocone é certamente uma condição complexa, com etiologia multifatorial: fatores genéticos e ambientais estão associados com ceratocone. Evidências do componente genético incluem a segregação familiar e a comparação das taxas de concordância entre gêmeos monozigóticos e dizigóticos.

Entre as causas ambientais (ou comportamentais), destacam-se o ato de coçar os olhos, a comorbidade com atopia (eczemas, asma ou rinite), a exposição excessiva aos raios UV, a geografia do local de vida, e o uso inadequado de lentes de contato (GORDON-SHAAG et al., 2015). Curiosamente, o diabetes melito parece desempenhar um papel protetor quanto ao defeito, uma vez que diabéticos apresentam menos frequentemente ceratocone que não-diabéticos (redução da ordem de 20%), possivelmente devido à glicosilação do colágeno (WOODWARD, BLACHLEY, STEIN, 2016; KUO et al., 2005).

As primeiras evidências da participação de componente genético na causação ou gênese do defeito surgiram de observações relativamente simples sobre o histórico familiar de afetados. A literatura cita cifras de repetição da forma familiar da doença que variam de 3 a 28% dos casos. Essa ampla variação pode ser explicada, pelo menos em parte, por diferenças nas frequências gênicas entre as diferentes populações e etnias estudadas (GORDON-SHAAG et al., 2015). Estudos comparativos de pares de gêmeos monozigóticos e dizigóticos também sugerem a participação de fatores genéticos de monta na gênese do defeito (TUFT et al.,

2012). Mais modernamente, estudos de associação (GWAS) e de ligação (GWLS), em nível de amplitude genômica, confirmaram essas observações.

A maioria dos casos vistos na prática clínica são não síndrômicos (cursam sem comorbidades) e isolados (sem histórico familiar) (BYKHOVSKAYA et al., 2016). A taxa de casos com recorrência familiar variou de 6 a 23,5% nas diferentes estimativas (LI et al., 2006). Em média, 3,34% dos familiares de primeiro grau também apresentaram a doença. Em 90% dos casos com recorrência familiar, o padrão é compatível com o modelo de segregação autossômico dominante (Hughes et al., 2003 apud Gajecka, 2009) com penetrância praticamente completa e expressividade muito variável. Alguns dos estudos sobre transmissão em famílias inclui formas brandas ou sutis, como o ceratocone frustro e o astigmatismo irregular brando.

O defeito está relacionado a cerca de 40 síndromes sistêmicas, classificadas em 4 grupos: doenças com disfunção de tecido conjuntivo; doenças com disfunção retiniana associada a estimulação oculodigital; doenças associadas a atopia e a coçar os olhos; e doenças com deficiência intelectual. Destacam-se a associação do defeito com a síndrome Turner, com o prolapso de válvula mitral (RABBANIKHAH, 2011), com colagenoses em geral, com a retinite pigmentosa e com a síndrome de Marfan (GRÜNAUER-KLOEVEKORN & DUNCKER, 2006). Em pacientes com a síndrome de Down, a prevalência de ceratocone parece estar aumentada de 10 a 300 vezes, possivelmente devido à localização do gene *SOD1* (superóxido dismutase isoenzima1) no cromossomo 21 (DAVIDSON et al., 2014). A Tabela 1 lista algumas síndromes com as quais o defeito está associado.

Tabela 1. Ceratocone em síndromes sistêmicas

Síndrome	Região cromossômica	Síndrome	Região cromossômica
Alagille	20p12.2, 1p12	Laurence–Moon	19p13.2
Albers-Schönberg	11q13.2, 16p13.3	Marfan	15q21.1
Albinismo	várias	Prolapso de válvula mitral	vários
Angelman	15q11.2	Mulvihill–Smith	não mapeado
Apert-Crouzon	10q26.13	Unha-patela	9q33.3
Bardet–Biedl	várias	Angiomatose neurocutâneo	várias
Córnea frágil	4q27, 16q24.2	Neurofibromatose	17q11.2, 22q12.2
Luxação congênita do quadril	3p22.2, 13q22	Noonan	várias
Rubéola congênita		Osteogênese imperfeita	várias
Down	Trissomia do 21	Óculo-dento-digital	6q22.31
Ehlers–Danlos	várias	Pseudoxantoma elástico	16p12-13 e 17q21.33
Goltz–Gorlin	9q22.3, Xp11.23	Retinose pigmentar	várias
Hiper-IgE	17q21.2	Axenfeld-Rieger	várias
Hiperornitinemia	13q14.11	Rothmund-Thomson	8q24.3
Ictiose	Xp22.31	Tourette	11q23
Hipermobilidade articular	não mapeado	Turner	Monossomia do x
		Xeroderma pigmentoso	várias

Fonte: RABINOWITZ (1998); SUGAR e MACSAI (2012), modif.

Estudos realizados na Arábia Saudita mostraram que casamentos consanguíneos conferem à prole risco aumentado para ceratocone e que pares de gêmeos monozigóticos apresentam taxa de concordância para o fenótipo ceratocone superior à taxa de concordância observada entre pares de gêmeos dizigóticos. O estudo realizado com casais de primos indicou a presença de fatores genéticos autossômicos recessivos e o estudo com os gêmeos indicou a presença de componente genético compatível com mecanismo multifatorial.

O ceratocone, de modo similar a muitas doenças com mecanismo complexo, ocorre tanto de forma isolada como com taxas variáveis de recorrência familiar, o que sugere etiologia multifatorial. No entanto, como é o caso de outras doenças complexas, ocorrem famílias com excesso de indivíduos afetados, seguindo um padrão de segregação familiar compatível com herança mendeliana.

Para entender os processos biológicos subjacentes ao ceratocone, uma análise integrada de vários aspectos pode ser

necessária. A figura abaixo resume informações sobre várias áreas envolvidas, incluindo a sequência de DNA (genoma), modificações epigenéticas (epigenoma), transcritos de RNA (transcriptoma), proteínas (proteoma), metabólitos (metaboloma) e microrganismos (microbioma). Cada elemento na matriz contém exemplos de técnicas e tecnologias que podem ser usadas para estudar aspectos biológicos particulares.

Figura 1: Áreas envolvidas na análise integrada do ceratocone e suas técnicas

Fonte: Karolak e Gajecka (2017, traduzido). **Lista de abreviações:** Estudo de ligação de amplitude genômica (GWLS), Estudo de associação de amplitude genômica (GWAS), Sequenciamento de nova geração (NGS), Sequenciamento do genoma completo (WGS), Sequenciamento de exoma (WES), PCR de transcrição reversa (RT-PCR), Sequenciamento após imunoprecipitação da cromatina (ChIP-Seq), Sequenciamento de RNA (RNA-seq), Sequenciamento de todo o genoma após tratamento com bissulfito (WGB-seq), 2-D eletroforese em gel (2-DE), Ensaio imunoenzimático (ELISA), Ressonância magnética nuclear (NMR), Espectrometria

de massa (MS), Cromatografia gasosa (GC), Cromatografia líquida - espectrometria de massa (LC-MS).

Em Kabza (2017), foram identificados por RNA-Seq (transcriptoma) as seguintes proteínas alteradas em córnea com ceratocene, relacionadas à formação das fibras de colágeno:

Síntese de colágeno						Estrutura da córnea	
Genes de colágenos	Hidroxilação	Glicosilação	Formação da tripla hélice	Conversão Proteolítica	Lisoxidação	Proteoglicanos	Estrutura corneana
↓ COL5A2	↓ P4HA2	↓ PLOD3	↓ PPIB	↓ ADAMTS1	↓ LOX	↓ LUM	↓ LAMA1
↓ COL6A1	↓ P4HB		↓ PPIC	↓ ADAMTS7	↓ LOXL1		↓ LAMA2
↓ COL6A2	↓ PLOD2			↓ ADAMTS10	↓ LOXL3		↓ LAMA4
↓ COL6A3	↓ PLOD3			↓ ADAM9			↓ LAMB3
↓ COL6A6				↓ ADAM12			↓ LAMC1
↓ COL7A1				↓ ADAM23			↓ NID1
↓ COL10A1				↓ ADAM33			↓ HSPG2
↓ COL12A1				↑ ADAMTS17			
↓ COL16A1							
↓ COL23A1							
↑ COL21A1							
↑ COL28A1							

Duas estratégias principais têm sido utilizadas com o objetivo de identificar os fatores etiológicos de natureza genética da doença: os estudos de ligação e os estudos de associação, sendo que cada uma dessas abordagens investiga

marcadores moleculares distribuídos em regiões cromossômicas específicas ou por todo o genoma.

1.1. Estudos de ligação

Ao longo de todo o genoma, encontram-se inúmeros marcadores genéticos: loci que foram mapeados com o propósito de indicar a posição relativa de fatores de susceptibilidade às doenças genéticas, ou de variantes de efeito patogênico. Para esse tipo de estudo, os marcadores utilizados são frequentemente os microssatélites ou os SNP (polimorfismos de base única, variação de um único nucleotídeo de uma sequência). Cada marcador SNP possui geralmente dois alelos, mas podem ocorrer mais.

Quando se estuda a segregação meiótica ou herança dos marcadores de dois loci diferentes numa família, verifica-se quais regiões próximas de um mesmo cromossomo são herdadas conjuntamente. Ou seja, se um parental apresenta os alelos **a** e **b** em loci vizinhos de um mesmo cromossomo (que por isso chamamos de alelos sintênicos), e possui no seu homólogo os alelos **A** e **B** nos mesmos loci, normalmente os gametas produzidos possuem a mesma combinação. Desta forma, será mais frequente que cada gameta seja **AB** ou **ab** para esses loci.

Alternativamente, quando duas das 4 cromátides dos cromossomos homólogos são quebradas e reagrupadas por meio do *crossing-over*, são produzidos gametas recombinantes: **Ab** ou **aB**.

Numa descendência familiar, quando um dos genitores é um heterozigoto duplo (**AB/ab** ou **Ab/aB**) para dois marcadores quaisquer, algumas vezes conseguimos verificar, na sua prole, quais descendentes são parentais e quais são recombinantes em relação aos genótipos parentais. Quando isso é possível, dizemos que ambos marcadores são informativos na família estudada.

Em outros casos, não é possível determinar a fase ou combinação dos alelos vizinhos que está presente em cada um dos 4 cromossomos homólogos dos genitores (2 do pai e 2 da mãe), ou distinguir na prole os genótipos parentais dos recombinantes.

Também é necessário que os alelos do pai não sejam os mesmos que os da mãe, para se possibilitar reconstruir a segregação dos marcadores entre as gerações até sua origem. Na ausência dos requisitos todos, chamamos aqueles marcadores de não-informativos, devendo ser desprezados para a análise, naquele cruzamento.

Marcadores próximos sofrem menos recombinação que marcadores mais distantes, porque é menos provável que o ponto de quebra na permutação ocorra dentro desse espaço limitado. Por outro lado, genes mais afastados apresentam maiores taxas de recombinação (θ), que são também as frequências relativas de filhos que herdaram a forma recombinada dos alelos de cada genitor, ou o complementar da frequência relativa dos que herdaram a combinação original. Essa medida é uma função da distância genética dos marcadores, estimativa teórica que supõe a distribuição aleatória dos pontos de recombinação, sendo definidas por diferentes funções de mapeamento.

Como a distribuição dos pontos de recombinação não é aleatória, podendo ocorrer preferencialmente em locais específicos (*hotspots*), uma mesma distância genética pode corresponder às vezes a diferentes distâncias físicas. Por isso, é imprescindível considerar para essa correspondência fatores como o sexo dos indivíduos mapeados (as mulheres têm taxas de recombinação maiores que os homens), e que as taxas de recombinação variam para cada localização cromossômica.

Quando dois marcadores estão em cromossomos diferentes, seus alelos segregam de maneira independente entre si, por isso a taxa de recombinação é 0,5, já que 50% da prole é recombinante e 50% da prole é parental. O mesmo acontece quando marcadores sintênicos estão muito distantes. Dois marcadores estão ligados quando a frequência de recombinação entre eles é significativamente menor do que 0,5, o que ocorre frequentemente dentro dos blocos delimitados pelos *hotspots*.

Para se determinar a localização de um marcador desconhecido,

em relação a outro marcador anteriormente mapeado, observa-se a frequência das classes genotípicas da prole de um casal. O genótipo pode ser diretamente determinado por meio de diversas técnicas moleculares, ou pode ser inferido a partir do fenótipo, em alguns casos especiais. Sendo um dos pais um duplo homozigoto, as duas classes mais frequentes correspondem às meioses parentais (que produz combinação de alelos nas mesmas fases que o genitor heterozigoto); enquanto as duas outras, às suas meioses recombinantes.

Dentro de uma genealogia, a segregação mendeliana (dominante, recessiva ou ligado ao X) de uma característica fenotípica sugere a existência de um alelo ou fator de predisposição, em algum local do genoma, que possua via de regra frequência maior entre os afetados do que entre os não-afetados (por aumentar a susceptibilidade à característica). Assim, a localização física do seu locus provavelmente corresponderá à região próxima (ou ligada) a marcadores com taxas de recombinação diferentes das esperadas para uma segregação independente, em relação ao locus em investigação.

Para uma doença de padrão autossômico dominante (com penetrância incompleta), espera-se que um conjunto de alelos de um mesmo bloco (ou haplótipo), proveniente do pai ou da mãe, produza o fenótipo dominante com mais frequência. Portanto, entre os afetados, haverá uma proporção maior do haplótipo supostamente ligado. É importante considerar ainda a possibilidade de existência na linhagem familiar de fenocópias (falsos afetados) ou de indivíduos não-penetrantes (falsos negativos), embora algoritmos específicos possam ser usados para excluir ou ajustar o status desses indivíduos para a análise computacional.

Para se decidir se um valor de θ significa a ligação ou não do marcador analisado com o gene cuja localização se pretende mapear, usa-se a estatística de LOD-score, que nada mais é do que o logaritmo da razão entre a probabilidade do marcador

segregar daquela forma supondo estarem ligados (o gene relacionado à doença e o locus do marcador), e a probabilidade de se obter a mesma distribuição genotípica sem que eles estejam ligados (por conta do acaso, somente). Isso se calcula como se segue:

$$Z = \text{Log} [(1-\theta)^r \cdot (\theta)^p / (0,5)^{r+p}]$$

Em que r é o número de meioses recombinantes e p é o número de meioses parentais para o marcador em estudo

Quando se obtém um LOD score maior que 3, isso significa que é 1000 vezes maior a probabilidade da distribuição ou segregação obtida ter sido ocasionada por uma ligação entre o seu marcador e o gene estudado, do que por uma segregação independente com desvios ao acaso. Por isso, se utiliza com o +3 o valor da significância para se afirmar que há ligação entre o gene mapeado e a região analisada. Contrariamente, -2 é o valor que mostra ser mais provável que a segregação independente explique a distribuição verificada.

Como a prole de um casal geralmente não é numerosa, é necessário utilizar um algoritmo computacional que obtém a taxa de recombinação para a região genômica a partir de 3 marcadores informativos: 2 adjacentes e um a plotar. Desta forma, essa taxa fica menos sujeita a casuísmos. Também há formas de se utilizar a informação da prole, mesmo quando não é possível determinar a fase dos cromossomos dos pais, ponderando-se as probabilidades de cada fase ser a recombinante.

Quando o teste de LOD-Score é repetido muitas vezes, para marcadores de todo o genoma, é correto realizar uma correção na probabilidade crítica do teste estatístico, uma vez que com tantos testes realizados, é maior a probabilidade de ocorrer ao acaso um LOD-Score maior que 3 (falso positivo). Por isso, indicações de ligação com LOD-Score abaixo de 5 devem ser

replicados, antes de serem consideradas definitivas.

A análise de LOD-Score padrão é adequada somente para a investigação de características mendelianas. Recebe o nome de paramétrica, porque necessita de um modelo de segregação preciso, detalhando o modo de herança, as frequências gênicas e a penetrância dos genótipos - o que é impossível de se determinar para as doenças com mecanismo complexo. Por serem doenças heterogêneas, muitas vezes ao segregar em famílias que já possuem muitos fatores, apresentam um equilíbrio pontuado pela herança mendeliana de apenas um dos muitos fatores de susceptibilidade. Por isso, deve-se considerar a possibilidade de que o padrão mendeliano seja espúrio.

Existem ainda análises não-paramétricas (NPL), que independem da definição de um modelo de segregação, mas que são menos poderosas por exigirem amostras com mais meioses.

Como vimos, estudos de ligação buscam mapear as regiões cromossômicas candidatas a conter o gene principal que causa a transmissão mendeliana da doença.

Essa metodologia tem sido amplamente utilizada no mapeamento de genes relacionados ao ceratocone em diferentes populações, mediante o estudo de famílias com múltiplos indivíduos afetados, preferencialmente em duas ou mais gerações, partindo-se da hipótese que os casos são atribuíveis a herança monogênica. Nesta estratégia, inicialmente todos os indivíduos da família são genotipados em relação a um conjunto de marcadores moleculares previamente mapeados e localizados em todas as regiões do genoma (GWLS ou *Genome Wide Linkage Study*). Através do estudo da transmissão dos alelos dos marcadores moleculares e dos haplótipos dos indivíduos afetados e não afetados, identificam-se as regiões cromossômicas candidatas.

A heterogeneidade genética (de lócus) acarreta dificuldade na análise de ligação, especialmente na investigação do ceratocone no Brasil, pois lócus diferentes podem explicar o quadro em cada família, o que impede que resultados de famílias

diferentes sejam reunidos. Assim, famílias grandes são necessárias para se obter uma evidência robusta de ligação.

Para ilustrar com um caso da literatura, uma região do cromossomo 5 onde se localiza o gene *CAST*, foi mapeada em dois estudos independentes (TANG et al., 2005; LI et al., 2006) apresentando ligação significativa com a doença. No estudo de Tang, uma família norte-americana com 27 indivíduos (12 afetados) foi investigada. No ano seguinte, 67 famílias (com 110 indivíduos afetados, ao total) foram recrutadas na mesma localidade e obtiveram um pico com LOD-Score 2,0, corroborando o primeiro achado.

O gene *CAST* codifica a proteína Calpastina, uma inibidora do calpaínas (proteases intracelulares não-lisossomais). Posteriormente, dois outros estudos vieram a confirmar o envolvimento de *CAST* na gênese da doença (LI et al., 2013; BYKHOVSKAYA et al., 2016), com coortes familiares aumentadas e simultaneamente, por meio de estudos de associação, com pares de indivíduos caso-controle.

1.2. Estudos de associação

A associação é um termo estatístico que descreve a co-ocorrência entre alelos de um polimorfismo e um fenótipo. O estudo de associação é eficiente para se detectar o efeito de variantes frequentes na população, com influência geralmente pequena na predisposição ao distúrbio em estudo, mas dependem de casuísticas grandes. Indivíduos afetados e não afetados pelo distúrbio são genotipados em relação a alguns marcadores moleculares em genes candidatos selecionados ou então a marcadores moleculares espalhados por todo o genoma (GWAS - *genome wide association study*). Com base na hipótese de "doença comum, variante comum", a maioria dos *microarrays* comerciais disponíveis atualmente para se realizar GWAS incluem polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs) com alelos frequentes na população geral. As frequências alélicas, são então

comparadas entre indivíduos afetados e não afetados. Essa estratégia permite geralmente identificar genes com efeitos modestos sobre o fenótipo, e que, portanto, explicam apenas parcialmente a herdabilidade da característica.

Somente alguns genes candidatos relacionados ao ceratocone por estudo de associação foram confirmados através de replicação em cortes independentes: *RAB3GAP1*, *HGF*, *LOX* e *COL5A1*.

O presente estudo não teve como objetivo utilizar a metodologia de estudo de associação, sendo que as informações levantadas nesse tópico servem apenas para fins comparativos e visam discutir as aplicações e limitações das duas principais estratégias de investigação.

A tabela 2 abaixo, aproveitada do trabalho de GORDON-SHAAG et al. (2015) e ampliada, sumariza os estudos moleculares realizados até o momento e que culminaram com a identificação de vários genes candidatos utilizando estudos de ligação, associação e outras metodologias.

Um levantamento recente realizado no banco de dados de variantes patogênicas (CLINVAR) revelou um total de 67 variantes fortemente indicadas como causa do ceratocone ou doenças associadas, divididas entre 39 SNV localizadas em apenas 4 genes (já incluídos na tabela 2); 21 grandes duplicações, todas no cromossomo 18; e 7 grandes deleções, nos cromossomos 18 e 16.

Até o momento, o maior estudo de GWAS envolvendo portadores de ceratocone contou com a participação de 3324 controles saudáveis e apenas 222 pacientes (LI et al. 2012), valor muito abaixo do necessário para alcançar o poder estatístico suficiente, sendo que as associações sugeridas não passaram pelas correções preconizadas.

Com isso, muitas das variantes listadas na Tabela 2 abaixo foram identificadas por meio da genotipagem e análise comparativa da espessura central da córnea (CCT) de indivíduos saudáveis; ou a de portadores de outras patologias oculares

relacionadas a espessura central e controles saudáveis. Como o ceratocone é sabidamente relacionado a essa medida altamente variável (STEELE et al., 2008), possivelmente funcionando como um cofator etiológico de predisposição, adota-se a convenção de apresenta-las conjuntamente. Apenas algumas destas variantes foram observadas em casuísticas específicas de pacientes com ceratocône, apresentando frequências relativas com diferenças sugestivas.

A título de exemplo, o gene VSX1, o mais estudado até o momento, está localizado em região de ligação para uma outra afecção ocular chamada distrofia corneana amorfa posterior (PPCD), que já foi associada ao ceratocone. Em 2002, mutações em VSX1 foram relatadas pela primeira vez num estudo com pacientes de PPCD e ceratocone, em que duas mutações (R166W e L159M) foram originalmente identificado em pacientes com ceratocone.

VSX1 codifica uma homeodomínio proteico que se liga ao núcleo da região de controle locus do gene do pigmento visual vermelho e verde cluster e pode regular a expressão dos genes da cone opsina durante o desenvolvimento embrionário. É expresso em vários tecidos oculares incluindo a retina. Entretanto, a expressão de VSX1 na córnea humana ou de rato permanece incerta, pois muitos estudos não confirmaram a mesma.

5 Discussão e conclusões

O ceratocone é uma doença complexa, que como tal apresenta grande heterogeneidade genética, podendo ser causada por vários genes em diferentes populações.

Na população brasileira, até o presente momento, pouco estudos moleculares investigaram as causas genéticas da doença. É provável que essas causas sejam ainda mais variadas, em função da ancestralidade múltipla que nos caracteriza sob o ponto de vista biológico, com destaque para os componentes indígenas e africanos de nossa herança genética, também pouco estudadas. Com isso, é possível que a região de ligação encontrada seja mesmo inédita na literatura.

O *LOD-score* obtido não é suficiente para se confirmar a região de ligação. No entanto, o valor de 2,99 é fortemente sugestivo de que o gene responsável esteja localizado na região mapeada do cromossomo 19. Por isso, as investigações moleculares da mesma merecem ter continuidade sem dúvida e podem ser fecundas para a implicação de um novo gene na patogênese da afecção de córnea ou na herdabilidade de um de seus cofatores de predisposição, como a espessura central da córnea ou o ângulo de curvatura corneano.

O fato de o *LOD Score* não ter atingido o LOD máximo, cálculo teórico que indica o potencial informativo da genealogia, pode indicar uma estimativa falha na frequência dos marcadores na população, entre outras possibilidades. Isso é bastante provável, porque a frequência adotada se baseou na média da casuística genotipada, dado a ausência de dados populacionais.

Supõe-se que haja uma fenocópia entre os afetados, seria plausível considerar a reavaliação clínica desses, porque o critério de diagnóstico utilizado pode ter sido excessivamente sensível. Até o momento, não há consenso sobre a definição precisa dos valores críticos e sobre as maneiras de se ponderar diferentes exames para o diagnóstico clínico. Uma estratégia para se definir qual seria o melhor indivíduo por reexaminar

seria a trabalhosa comparação dos haplótipos de todos os genotipados, utilizando pacotes computacionais específicos.

Os resultados obtidos até o momento são muito sugestivos da ligação de um haplótipo do cromossomo 19 com o fenótipo na família estudada, seja ele dentro de um gene ou em um locus intergênico. Nesse segundo caso, a busca pela variante causal pode requerer o sequenciamento completo da região candidata.

Ainda na tentativa de se sondar as regiões gênicas, o sequenciamento de exoma de um segundo familiar será em breve realizado, de modo que a filtragem conjunta dos arquivos de variante poderá vir a diminuir a lista das variantes suspeitas. Essa estratégia foi bem sucedida em Karolak et al. (2016b), que deu sequência num estudo da família equatoriana recrutada para estudo de ligação por Rosenfeld et al. (2011). Isso demonstra a conveniência de se combinar as duas metodologias, com abordagem cromossômica inicial, seguida de abordagem da sequência nucleotídica.

A variante ainda não identificada que segrega com a doença talvez seja especialmente rara, mesmo entre a população de pacientes de ceratocone, ou até única na população brasileira, devido ao seu grande impacto e penetrância, o que provavelmente pode contribuir para uma forte seleção negativa e uma baixíssima frequência de equilíbrio.

A depender de sua raridade, uma segunda família com um LOD-Score acima de 3 na mesma região poderia servir para confirmar a descoberta. No entanto, é mais provável que o achado só possa ser confirmado através da implicação de variantes mais comuns no mesmo gene, que conseqüentemente devem apresentar baixo impacto. Isso já seria razoável evidência da relação etiológica. E um estudo de associação com SNPs dessa região com indivíduos afetados sem histórico familiar parece ser mais viável, dado a dificuldade de se encontrar e de se recrutar casuísticas familiares com mais 10 afetados.

Alternativamente, estudos funcionais que fogem ao escopo do

presente trabalho, poderiam corroborar a variante investigada.

Como a doença pode evoluir para o transplante de córnea, e em várias regiões do país não há disponibilidade de doadores falecidos, é possível que a extensão e complementação da metodologia desse estudo para outras famílias, a fim de agregar aos achados em investigação uma dimensão populacional, possa beneficiar outros afetados, além da família estudada (ainda que seja através da identificação de variantes mais comuns no mesmo gene ou via). Infelizmente, ainda não há informações no Brasil sobre a ocorrência de mutações que possam levar ao ceratocone. Contribuições como essa seriam importantes para um melhor planejamento do sistema de saúde na área de oftalmologia e para viabilizar a oferta de um possível tratamento precoce, já existente em outros países.

6 Bibliografia

ABU-AMERO, K. K.; AL-MUAMMAR, A. M.; KONDKAR, A. A. Genetics of keratoconus: where do we stand? **J Ophthalmol**, v. 2014, p. 641708, 2014. ISSN 2090-004X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25254113> >.

ABU-AMERO, K. K. et al. Case-control association between CCT-associated variants and keratoconus in a Saudi Arabian population. **J Negat Results Biomed**, v. 14, p. 10, Jun 4 2015. ISSN 1477-5751. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1186/s12952-015-0029-5> >.

ABU-AMERO, K. K.; KALANTAN, H.; AL-MUAMMAR, A. M. Analysis of the VSX1 gene in keratoconus patients from Saudi Arabia. **Mol Vis**, v. 17, p. 667-72, Mar 8 2011. ISSN 1090-0535.

ALDAVE, A. J. et al. Keratoconus is not associated with mutations in COL8A1 and COL8A2. **Cornea**, v. 26, n. 8, p. 963-5, Sep 2007. ISSN 0277-3740 (Print)0277-3740. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1097/ICO.0b013e31811dfaf7> >.

_____. No VSX1 gene mutations associated with keratoconus. **Invest Ophthalmol Vis Sci**, v. 47, n. 7, p. 2820-2, Jul 2006. ISSN 0146-0404 (Print)0146-0404. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1167/iovs.05-1530> >.

ALVES, V. L.; ALVES, M. R.; LANE, S. T. [The diagnostic communication of keratoconus and its influence on the social representation that the patient has of his/her illness]. **Arq Bras Oftalmol**, v. 70, n. 5, p. 790-6, Sep-Oct 2007. ISSN 0004-2749 (Print)0004-2749.

AL-MUAMMAR, A. M. et al. Analysis of the SOD1 Gene in Keratoconus Patients from Saudi Arabia. **Ophthalmic Genet**, v. 36, n. 4, p. 373-5, 2015. ISSN 1381-6810. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.3109/13816810.2014.889173> >.

ARNAL, E. et al. Oxidative stress in keratoconus? **Invest Ophthalmol Vis Sci**, v. 52, n. 12, p. 8592-7, Nov 4 2011. ISSN 0146-0404. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1167/iovs.11-7732> >.

BAE, H. A. et al. Replication and meta-analysis of candidate loci identified variation at RAB3GAP1 associated with keratoconus. **Invest Ophthalmol Vis Sci**, v. 54, n. 7, p. 5132-5, Jul 30 2013. ISSN 0146-0404. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1167/iovs.13-12377> >.

BARDAK, H. et al. Novel visual system homeobox 1 gene mutations in Turkish patients with keratoconus. **Genet Mol Res**, v. 15, n. 4, Nov 3 2016. ISSN 1676-5680. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.4238/gmr15049024> >.

BISCEGLIA, L. et al. VSX1 mutational analysis in a series of Italian patients affected by keratoconus: detection of a novel mutation. **Invest Ophthalmol Vis Sci**, v. 46, n. 1, p. 39-45, Jan 2005. ISSN 0146-0404 (Print)0146-0404. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1167/iovs.04-0533> >.

_____. Linkage analysis in keratoconus: replication of locus 5q21.2 and identification of other suggestive Loci. **Invest Ophthalmol Vis Sci**, v. 50, n. 3, p. 1081-6, Mar 2009. ISSN 0146-0404. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1167/iovs.08-2382> >.

BRANCATI, F. et al. A locus for autosomal dominant keratoconus maps to human chromosome 3p14-q13. **J Med Genet**, v. 41, n. 3, p. 188-92, Mar 2004. ISSN 0022-2593.

BURDON, K. P. et al. Investigation of eight candidate genes on chromosome 1p36 for autosomal dominant total congenital cataract. **Mol Vis**, v. 14, p. 1799-804, 2008. ISSN 1090-0535. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18843385> >.

_____. Association of polymorphisms in the hepatocyte growth factor gene promoter with keratoconus. **Invest Ophthalmol Vis Sci**, v. 52, n. 11, p. 8514-9, Oct 31 2011. ISSN 0146-0404. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1167/iovs.11-8261> >.

BURDON, K. P.; VINCENT, A. L. Insights into keratoconus from a genetic perspective. **Clin Exp Optom**, v. 96, n. 2, p. 146-54, Mar 2013. ISSN 0816-4622. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1111/cxo.12024> >.

BUSTAMANTE, M. et al. Overexpression of a mutant form of TGFBI/BIGH3 induces retinal degeneration in transgenic mice. **Mol Vis**, v. 14, p. 1129-37, Jun 13 2008. ISSN 1090-0535.

BYKHOVSKAYA, Y. et al. C.57 C > T Mutation in MIR 184 is Responsible for Congenital Cataracts and Corneal Abnormalities in a Five-generation Family from Galicia, Spain. **Ophthalmic Genet**, v. 36, n. 3, p. 244-7, 2015. ISSN 1381-6810. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.3109/13816810.2013.848908> >.

_____. Variation in the lysyl oxidase (LOX) gene is associated with keratoconus in family-based and case-control studies. **Invest Ophthalmol Vis Sci**, v. 53, n. 7, p. 4152-7, Jun 28 2012. ISSN 0146-0404. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1167/iovs.11-9268> >.

_____. Linkage Analysis of High-density SNPs Confirms Keratoconus Locus at 5q Chromosomal Region. **Ophthalmic Genet**, v. 37, n. 1, p. 109-10, 2016a. ISSN 1381-6810. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.3109/13816810.2014.889172> >.

BYKHOVSKAYA, Y.; MARGINES, B.; RABINOWITZ, Y. S. Genetics in Keratoconus: where are we? **Eye Vis (Lond)**, v. 3, p. 16, 2016b. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27350955> >.

CARVALHO, L. A. [Techniques for facilitating in vivo corneal topography diagnosis]. **Arq Bras Oftalmol**, v. 68, n. 2, p. 205-12, 2005 Mar-Apr 2005. ISSN 0004-2749. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15905942> >.

CUELLAR-PARTIDA, G. et al. WNT10A exonic variant increases the risk of keratoconus by decreasing corneal thickness. **Hum Mol Genet**, v. 24, n. 17, p. 5060-8, Sep 1 2015. ISSN 0964-6906. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1093/hmg/ddv211> >.

CZUGALA, M. et al. Novel mutation and three other sequence variants segregating with phenotype at keratoconus 13q32 susceptibility locus. **Eur J Hum Genet**, v. 20, n. 4, p. 389-97, Apr 2012. ISSN 1018-4813. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1038/ejhg.2011.203> >.

DASH, D. P.; SILVESTRI, G.; HUGHES, A. E. Fine mapping of the keratoconus with cataract locus on chromosome 15q and candidate gene analysis. **Mol Vis**, v. 12, p. 499-505, May 12 2006. ISSN 1090-0535.

DAVIDSON, A. E. et al. The pathogenesis of keratoconus. **Eye (Lond)**, v. 28, n. 2, p. 189-95, Feb 2014. ISSN 1476-5454. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24357835> >.

DE BONIS, P. et al. Mutational screening of VSX1, SPARC, SOD1, LOX, and TIMP3 in keratoconus. **Mol Vis**, v. 17, p. 2482-94, 2011. ISSN 1090-0535.

DEHKORDI, F. A. et al. Study of VSX1 mutations in patients with keratoconus in southwest Iran using PCR-single-strand conformation polymorphism/heteroduplex analysis and sequencing method. **Acta Cytol**, v. 57, n. 6, p. 646-51, 2013. ISSN 0001-5547 (Print)0001-5547. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1159/000353297> >.

DUDAKOVA, L. et al. Validation of rs2956540:G>C and rs3735520:G>A association with keratoconus in a population of European descent. In: (Ed.). **Eur J Hum Genet**, v.23, 2015. p.1581-3. ISBN 1018-4813 (Print)1476-5438 (Electronic).

ERAN, P. et al. The D144E substitution in the VSX1 gene: a non-pathogenic variant or a disease causing mutation? **Ophthalmic Genet**, v. 29, n. 2, p. 53-9, Jun 2008. ISSN 1381-6810. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1080/13816810802008242> >.

FARZADFARD, A. et al. Screening for MIR184 Mutations in Iranian Patients with Keratoconus. **J Ophthalmic Vis Res**, v. 11, n. 1, p. 3-7, Jan-Mar 2016. ISSN 2008-2010 (Print)2008-322x. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.4103/2008-322x.180715> >.

FULLERTON, J. et al. Identity-by-descent approach to gene localisation in eight individuals affected by keratoconus from north-west Tasmania, Australia. **Hum Genet**, v. 110, n. 5, p. 462-70, May 2002. ISSN 0340-6717 (Print)0340-6717. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1007/s00439-002-0705-7> >.

GAJECKA, M. et al. Localization of a gene for keratoconus to a 5.6-Mb interval on 13q32. **Invest Ophthalmol Vis Sci**, v. 50, n. 4, p. 1531-9, Apr 2009. ISSN 1552-5783. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19011015> >.

GALVIS, V. et al. Keratoconus: an inflammatory disorder? **Eye (Lond)**, v. 29, n. 7, p. 843-59, Jul 2015. ISSN 1476-5454. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25931166> >.

GAO, X. et al. A genome-wide association study of central corneal thickness in Latinos. **Invest Ophthalmol Vis Sci**, v. 54, n. 4, p. 2435-43, Apr 1 2013. ISSN 0146-0404. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1167/iovs.13-11692> >.

_____. Genome-wide association study identifies WNT7B as a novel locus for central corneal thickness in Latinos. **Hum Mol Genet**, v. 25, n. 22, p. 5035-5045, Nov 15 2016. ISSN 0964-6906. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1093/hmg/ddw319> >.

GIBSON, J. et al. Genome-wide association study of primary open angle glaucoma risk and quantitative traits. **Mol Vis**, v. 18, p. 1083-92, 2012. ISSN 1090-0535.

GOGARTEN, S. M. et al. GWASTools: an R/Bioconductor package for quality control and analysis of genome-wide association studies. **Bioinformatics**, v. 28, n. 24, p. 3329-31, Dec 15 2012. ISSN 1367-4803. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1093/bioinformatics/bts610> >.

GORDON-SHAAG, A. et al. The genetic and environmental factors for keratoconus. **Biomed Res Int**, v. 2015, p. 795738, 2015. ISSN 2314-

6141. Disponível em:

< <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26075261> >.

GRÜNAUER-KLOEVEKORN, C.; DUNCKER, G. I. [Keratoconus: epidemiology, risk factors and diagnosis]. **Klin Monbl Augenheilkd**, v. 223, n. 6, p. 493-502, Jun 2006. ISSN 0023-2165. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16804819> >.

GUAN, T. et al. The point mutation and polymorphism in keratoconus candidate gene TGFBI in Chinese population. **Gene**, v. 503, n. 1, p. 137-9, Jul 15 2012. ISSN 0378-1119. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.gene.2012.04.061> >.

HAMEED, A. et al. A novel locus for Leber congenital amaurosis (LCA4) with anterior keratoconus mapping to chromosome 17p13. **Invest Ophthalmol Vis Sci**, v. 41, n. 3, p. 629-33, Mar 2000. ISSN 0146-0404 (Print)0146-0404.

HAO, X. D. et al. Evaluating the Association between Keratoconus and Reported Genetic Loci in a Han Chinese Population. **Ophthalmic Genet**, v. 36, n. 2, p. 132-6, Jun 2015. ISSN 1381-6810. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.3109/13816810.2015.1005317> >.

_____. De novo mutations of TUBA3D are associated with keratoconus. **Sci Rep**, v. 7, n. 1, p. 13570, Oct 19 2017. ISSN 2045-2322. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1038/s41598-017-13162-0> >.

HASANIAN-LANGROUDI, F. et al. Association of Lysyl oxidase (LOX) Polymorphisms with the Risk of Keratoconus in an Iranian Population. **Ophthalmic Genet**, v. 36, n. 4, p. 309-14, 2015. ISSN 1381-6810. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.3109/13816810.2014.881507> >.

HEON, E. et al. VSX1: a gene for posterior polymorphous dystrophy and keratoconus. **Hum Mol Genet**, v. 11, n. 9, p. 1029-36, May 1 2002. ISSN 0964-6906 (Print)0964-6906.

HOEHN, R. et al. Population-based meta-analysis in Caucasians confirms association with COL5A1 and ZNF469 but not COL8A2 with central corneal thickness. **Hum Genet**, v. 131, n. 11, p. 1783-93, Nov 2012. ISSN 0340-6717. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1007/s00439-012-1201-3> >.

HUGHES, A. E. et al. Familial keratoconus with cataract: linkage to the long arm of chromosome 15 and exclusion of candidate genes. **Invest Ophthalmol Vis Sci**, v. 44, n. 12, p. 5063-6, Dec 2003. ISSN 0146-0404 (Print)0146-0404.

_____. Mutation altering the miR-184 seed region causes familial keratoconus with cataract. **Am J Hum Genet**, v. 89, n. 5, p. 628-33, Nov 11 2011. ISSN 0002-9297. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.ajhg.2011.09.014> >.

HUTCHINGS, H. et al. Identification of a new locus for isolated familial keratoconus at 2p24. In: (Ed.). **J Med Genet**. England, v.42, 2005. p.88-94. ISBN 1468-6244 (Electronic)0022-2593 (Linking).

IGLESIAS, A. I. et al. Cross-ancestry genome-wide association analysis of corneal thickness strengthens link between complex and Mendelian eye diseases. In: (Ed.). **Nat Commun**, v.9, 2018. ISBN 2041-1723 (Electronic).

JEOUNG, J. W. et al. VSX1 gene and keratoconus: genetic analysis in Korean patients. **Cornea**, v. 31, n. 7, p. 746-50, Jul 2012. ISSN 0277-3740. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1097/ICO.0b013e3181e16dd0> >.

KABZA, M. et al. Collagen synthesis disruption and downregulation of core elements of TGF-beta, Hippo, and Wnt pathways in keratoconus corneas. **Eur J Hum Genet**, Feb 01 2017. ISSN 1018-4813. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1038/ejhg.2017.4> >.

KANNABIRAN, C. Genetics of corneal endothelial dystrophies. **J Genet**, v. 88, n. 4, p. 487-94, Dec 2009. ISSN 0022-1333.

KAROLAK, J. A.; GAJECKA, M. Genomic strategies to understand causes of keratoconus. **Mol Genet Genomics**, Dec 28 2016a. ISSN 1617-4623. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1007/s00438-016-1283-z> >.

KAROLAK, J. A. et al. Variants in SKP1, PROB1, and IL17B genes at keratoconus 5q31.1-q35.3 susceptibility locus identified by whole-exome sequencing. **Eur J Hum Genet**, v. 25, n. 1, p. 73-78, Jan 2016b. ISSN 1018-4813. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1038/ejhg.2016.130> >.

_____. Molecular Screening of Keratoconus Susceptibility Sequence Variants in VSX1, TGFBI, DOCK9, STK24, and IPO5 Genes in Polish Patients and Novel TGFBI Variant Identification. **Ophthalmic Genet**, v. 37, n. 1, p. 37-43, 2016c. ISSN 1381-6810. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.3109/13816810.2014.926375> >.

KIM, S. H. et al. Association of -31T>C and -511 C>T polymorphisms in the interleukin 1 beta (IL1B) promoter in Korean keratoconus patients. **Mol Vis**, v. 14, p. 2109-16, 2008. ISSN 1090-0535. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2588426/> >.

KOKOLAKIS, N. S. et al. Polymorphism analysis of COL4A3 and COL4A4 genes in Greek patients with keratoconus. **Ophthalmic Genet**, v. 35, n. 4, p. 226-8, Dec 2014. ISSN 1381-6810. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.3109/13816810.2014.946055> >.

KUO, I. C. et al. Is there an association between diabetes and keratoconus? **Ophthalmology**, v. 113, n. 2, p. 184-90, Feb 2006. ISSN 1549-4713. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16368147> >.

LECHNER, J. et al. Mutational spectrum of the ZEB1 gene in corneal dystrophies supports a genotype-phenotype correlation. **Invest Ophthalmol Vis Sci**, v. 54, n. 5, p. 3215-23, May 3 2013b. ISSN 0146-0404. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1167/iovs.13-11781> >.

_____. Mutational spectrum of the ZEB1 gene in corneal dystrophies supports a genotype-phenotype correlation. **Invest Ophthalmol Vis Sci**, v. 54, n. 5, p. 3215-23, May 3 2013a. ISSN 0146-0404. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1167/iovs.13-11781> >.

LI, X. et al. A genome-wide association study identifies a potential novel gene locus for keratoconus, one of the commonest causes for corneal transplantation in developed countries. **Hum Mol Genet**, v. 21, n. 2, p. 421-9, Jan 15 2012. ISSN 0964-6906. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1093/hmg/ddr460> >.

_____. An association between the calpastatin (CAST) gene and keratoconus. **Cornea**, v. 32, n. 5, p. 696-701, May 2013. ISSN 0277-3740. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1097/ICO.0b013e3182821c1c> >.

_____. Two-stage genome-wide linkage scan in keratoconus sib pair families. **Invest Ophthalmol Vis Sci**, v. 47, n. 9, p. 3791-5, Sep 2006. ISSN 0146-0404 (Print)0146-0404. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1167/iovs.06-0214> >.

LI, H.; DURBIN, R. Fast and accurate short read alignment with Burrows-Wheeler transform. **Bioinformatics**, v. 25, n. 14, p. 1754-60, Jul 15 2009. ISSN 1367-4803. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1093/bioinformatics/btp324> >.

LISKOVA, P. et al. Evidence for keratoconus susceptibility locus on chromosome 14: a genome-wide linkage screen using single-nucleotide polymorphism markers. **Arch Ophthalmol**, v. 128, n. 9, p. 1191-5, Sep 2010. ISSN 0003-9950. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1001/archophthalmol.2010.200> >.

_____. Molecular analysis of the VSX1 gene in familial keratoconus. **Mol Vis**, v. 13, p. 1887-91, Oct 4 2007. ISSN 1090-0535.

LU, Y. et al. Common genetic variants near the Brittle Cornea Syndrome locus ZNF469 influence the blinding disease risk factor central corneal thickness. **PLoS Genet**, v. 6, n. 5, p. e1000947, May 13 2010. ISSN 1553-7390. Disponível em:
< <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pgen.1000947> >

_____. Genome-wide association analyses identify multiple loci associated with central corneal thickness and keratoconus. **Nat Genet**, v. 45, n. 2, p. 155-63, Feb 2013. ISSN 1061-4036. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1038/ng.2506> >.

MACARTHUR, J. et al. The new NHGRI-EBI Catalog of published genome-wide association studies (GWAS Catalog). **Nucleic Acids Res**, v. 45, n. D1, p. D896-d901, Jan 4 2017. ISSN 0305-1048. Disponível em:
< <http://dx.doi.org/10.1093/nar/gkw1133> >.

MATTHEWS, F. J. et al. Changes in the balance of the tissue inhibitor of matrix metalloproteinases (TIMPs)-1 and -3 may promote keratocyte apoptosis in keratoconus. **Exp Eye Res**, v. 84, n. 6, p. 1125-34, Jun 2007. ISSN 0014-4835 (Print)0014-4835. Disponível em:
< <http://dx.doi.org/10.1016/j.exer.2007.02.013> >.

MAZZOTTA, C. et al. First Identification of a Triple Corneal Dystrophy Association: Keratoconus, Epithelial Basement Membrane Corneal Dystrophy and Fuchs' Endothelial Corneal Dystrophy. In: (Ed.). **Case Rep Ophthalmol**, v.5, 2014. p.281-8. ISBN 1663-2699 (Electronic).

MIKAMI, T. et al. Interleukin 1 beta promoter polymorphism is associated with keratoconus in a Japanese population. **Mol Vis**, v. 19, p. 845-51, 2013. ISSN 1090-0535. Disponível em:
< <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3626376/> >.

MOREIRA, L. B. et al. [Psychological and social aspects of patients with keratoconus]. **Arq Bras Oftalmol**, v. 70, n. 2, p. 317-22, Mar-Apr 2007. ISSN 0004-2749 (Print)0004-2749.

MOSCHOS, M. M. et al. Polymorphism Analysis of VSX1 and SOD1 Genes in Greek Patients with Keratoconus. **Ophthalmic Genet**, v. 36, n. 3, p. 213-7, 2015. ISSN 1381-6810. Disponível em:
< <http://dx.doi.org/10.3109/13816810.2013.843712> >.

MOK, J. W.; BAEK, S. J.; JOO, C. K. VSX1 gene variants are associated with keratoconus in unrelated Korean patients. **J Hum Genet**, v. 53, n. 9, p. 842-9, 2008. ISSN 1434-5161 (Print)1434-5161. Disponível em:
< <http://dx.doi.org/10.1007/s10038-008-0319-6> >.

NADERAN, M. et al. Characteristics and associations of keratoconus patients. **Cont Lens Anterior Eye**, v. 38, n. 3, p. 199-205, Jun 2015. ISSN 1476-5411. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25707930> >.

NAMKUNG, J. H. et al. Association of single nucleotide polymorphisms in the IL-12 (IL-12A and B) and IL-12 receptor (IL-12Rbeta1 and beta2) genes and gene-gene interactions with atopic dermatitis in Koreans. **J Dermatol Sci**, v. 57, n. 3, p. 199-206, Mar 2010. ISSN 0923-1811. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.jdermsci.2009.12.003> >.

NASLAVSKY, M. S. et al. Exomic variants of an elderly cohort of Brazilians in the ABraOM database. **Hum Mutat**, v. 38, n. 7, p. 751-763, Jul 2017. ISSN 1059-7794. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1002/humu.23220> >.

NOWAK D. M., PITARQUE J., MOLINARI A. et al. Linkage analysis as an approach for disease-related loci identification. **Comput Methods Sci Technol**, v. 18, p. 95-101, 2012. ISSN 1505-0602 e 2353-9453. Disponível em: < <http://lib.psnc.pl/dlibra/doccontent?id=415> >.

NOWAK, D. M. et al. Substitution at IL1RN and deletion at SLC4A11 segregating with phenotype in familial keratoconus. **Invest Ophthalmol Vis Sci**, v. 54, n. 3, p. 2207-15, Mar 1 2013. ISSN 0146-0404. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1167/iovs.13-11592> >.

O'BRART, D. P. Corneal collagen cross-linking: A review. In: (Ed.). **J Optom**, v.7, 2014. p.113-24. ISBN 1888-4296 (Print)1989-1342 (Electronic).

OTTO, P. A.; HORIMOTO, A. R. Penetrance rate estimation in autosomal dominant conditions. **Genet Mol Biol**, v. 35, n. 3, p. 583-8, Jul 2012. ISSN 1678-4685. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23055795> >.

OTTO, P. A.; MAESTRELLI, S. R. Heterozygosity probabilities for normal relatives of isolated cases affected by incompletely penetrant conditions and the calculation of recurrence risks for their offspring. I. Autosomal dominant genes. **Am J Med Genet**, v. 95, n. 1, p. 43-8, Nov 06 2000. ISSN 0148-7299 (Print)0148-7299.

PALIWAL, P. et al. A novel VSX1 mutation identified in an individual with keratoconus in India. **Mol Vis**, v. 15, p. 2475-9, Nov 28 2009. ISSN 1090-0535.

_____. Familial segregation of a VSX1 mutation adds a new dimension to its role in the causation of keratoconus. **Mol Vis**, v. 17, p. 481-5, Feb 15 2011. ISSN 1090-0535.

PURCELL, S. et al. PLINK: a tool set for whole-genome association and population-based linkage analyses. **Am J Hum Genet**, v. 81, n. 3, p. 559-75, Sep 2007. ISSN 0002-9297 (Print)0002-9297. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1086/519795> >.

RABBANIKHAH, Z. et al. Association between acute corneal hydrops in patients with keratoconus and mitral valve prolapse. **Cornea**, v. 30, n. 2, p. 154-7, Feb 2011. ISSN 1536-4798. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21045676> >.

RABINOWITZ, Y. S. Keratoconus. **Surv Ophthalmol**, v. 42, n. 4, p. 297-319, 1998 Jan-Feb 1998. ISSN 0039-6257. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9493273> >.

RABINOWITZ, Y. S.; DONG, L.; WISTOW, G. Gene expression profile studies of human keratoconus cornea for NEIBank: a novel cornea-expressed gene and the absence of transcripts for aquaporin 5. **Invest Ophthalmol Vis Sci**, v. 46, n. 4, p. 1239-46, Apr 2005. ISSN 0146-0404 (Print)0146-0404. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1167/iovs.04-1148> >.

RABINOWITZ, Y. S. et al. Gene Expression Profile Studies of Human Keratoconus Cornea for NEIBank: A Novel Cornea-Expressed Gene and the Absence of Transcripts for Aquaporin 5. **Investigative Ophthalmology & Visual Science**, v. 46, n. 4, p. 1239-1246, 2018. ISSN 1552-5783. Disponível em: < <https://iovs.arvojournals.org/data/journals/iovs/932933/z7g00405001239.pdf> >.

RODRIGUES, F. W. **Polimorfismo genético em pacientes portadores de ceratocone**. 2016. (Doutorado em Ciências da Saúde). Faculdade de Medicina - FM, Universidade Federal de Goiás

ROMERO-JIMÉNEZ, M.; SANTODOMINGO-RUBIDO, J.; WOLFFSOHN, J. S. Keratoconus: a review. **Cont Lens Anterior Eye**, v. 33, n. 4, p. 157-66; quiz 205, Aug 2010. ISSN 1476-5411. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20537579> >.

ROSENFELD, J. A. et al. Deletions and duplications of developmental pathway genes in 5q31 contribute to abnormal phenotypes. **Am J Med Genet A**, v. 155a, n. 8, p. 1906-16, Aug 2011. ISSN 1552-4825. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1002/ajmg.a.34100> >.

SAHEBJADA, S. et al. Association of the Hepatocyte Growth Factor Gene with Keratoconus in an Australian Population. In: (Ed.). **PLoS One**, v.9, 2014. ISBN 1932-6203 (Electronic).

_____. Evaluating the association between keratoconus and the corneal thickness genes in an independent Australian population. **Invest Ophthalmol Vis Sci**, v. 54, n. 13, p. 8224-8, Dec 17 2013. ISSN 0146-0404. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1167/iovs.13-12982> >.

SAEE-RAD, S. et al. Mutation analysis of VSX1 and SOD1 in Iranian patients with keratoconus. **Mol Vis**, v. 17, p. 3128-36, 2011. ISSN 1090-0535.

SARAVANI, R. et al. Evaluation of possible relationship between COL4A4 gene polymorphisms and risk of keratoconus. **Cornea**, v. 34, n. 3, p. 318-22, Mar 2015. ISSN 0277-3740. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1097/ico.0000000000000356> >.

SHETTY, R. et al. Two novel missense substitutions in the VSX1 gene: clinical and genetic analysis of families with Keratoconus from India. **BMC Med Genet**, v. 16, p. 33, May 12 2015. ISSN 1471-2350. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1186/s12881-015-0178-x> >.

SMADJA, D. et al. Detection of subclinical keratoconus using an automated decision tree classification. **Am J Ophthalmol**, v. 156, n. 2, p. 237-246.e1, Aug 2013. ISSN 1879-1891. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23746611> >.

STABUC-SILIH, M. et al. Polymorphisms in COL4A3 and COL4A4 genes associated with keratoconus. **Mol Vis**, v. 15, p. 2848-60, Dec 20 2009. ISSN 1090-0535.

_____. Absence of pathogenic mutations in VSX1 and SOD1 genes in patients with keratoconus. **Cornea**, v. 29, n. 2, p. 172-6, Feb 2010. ISSN 0277-3740. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1097/ICO.0b013e3181aebf7a> >.

STEELE, T. M. et al. Prevalence of Orbscan II corneal abnormalities in relatives of patients with keratoconus. **Clin Exp Ophthalmol**, v. 36, n. 9, p. 824-30, Dec 2008. ISSN 1442-6404. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1111/j.1442-9071.2009.01908.x> >.

SU, M.; THOMPSON, E. A. Computationally efficient multipoint linkage analysis on extended pedigrees for trait models with two contributing major Loci. **Genet Epidemiol**, v. 36, n. 6, p. 602-11, Sep 2012. ISSN 0741-0395. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1002/gepi.21653> >.

SUGAR, J.; MACSAI, M. S. What causes keratoconus? **Cornea**, v. 31, n. 6, p. 716-9, Jun 2012. ISSN 1536-4798. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22406940> >.

SYNOWIEC, E. et al. Polymorphisms of the homologous recombination gene RAD51 in keratoconus and Fuchs endothelial corneal dystrophy. **Dis Markers**, v. 35, n. 5, p. 353-62, 2013. ISSN 0278-0240. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1155/2013/851817> >.

_____. Polymorphism of the LIG3 gene in keratoconus and Fuchs endothelial corneal dystrophy. **Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)**, v. 61, n. 1, p. 56-63, Mar 28 2015. ISSN 0145-5680.

_____. Polymorphisms of the apoptosis-related FAS and FAS ligand genes in keratoconus and Fuchs endothelial corneal dystrophy. **Tohoku J Exp Med**, v. 234, n. 1, p. 17-27, Sep 2014. ISSN 0040-8727.

SZCZESNIAK, M. W. et al. KTCNIncDB-a first platform to investigate lncRNAs expressed in human keratoconus and non-keratoconus corneas. **Database (Oxford)**, v. 2017, 2017. ISSN 1758-0463. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1093/database/baw168> >.

TAI, T. Y. et al. Keratoconus associated with corneal stromal amyloid deposition containing TGFBIp. **Cornea**, v. 28, n. 5, p. 589-93, Jun 2009. ISSN 0277-3740. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1097/ICO.0b013e31818c9003> >.

TANG, Y. G. et al. Three VSX1 gene mutations, L159M, R166W, and H244R, are not associated with keratoconus. **Cornea**, v. 27, n. 2, p. 189-92, Feb 2008. ISSN 0277-3740 (Print)0277-3740. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1097/ICO.0b013e31815a50e7> >.

_____. Genomewide linkage scan in a multigeneration Caucasian pedigree identifies a novel locus for keratoconus on chromosome 5q14.3-q21.1. **Genet Med**, v. 7, n. 6, p. 397-405, 2005 Jul-Aug 2005. ISSN 1098-3600. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16024971> >.

TANWAR, M. et al. VSX1 gene analysis in keratoconus. **Mol Vis**, v. 16, p. 2395-401, Nov 16 2010. ISSN 1090-0535.

TUFT, S. J. et al. Keratoconus in 18 pairs of twins. **Acta Ophthalmol**, v. 90, n. 6, p. e482-6, Sep 2012. ISSN 1755-375x. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1111/j.1755-3768.2012.02448.x> >.

TYYNISMAA, H. et al. A locus for autosomal dominant keratoconus: linkage to 16q22.3-q23.1 in Finnish families. **Invest Ophthalmol Vis Sci**, v. 43, n. 10, p. 3160-4, Oct 2002. ISSN 0146-0404 (Print)0146-0404.

UDAR, N. et al. Keratoconus--no association with the transforming growth factor beta-induced gene in a cohort of American

patients. **Cornea**, v. 23, n. 1, p. 13-7, Jan 2004. ISSN 0277-3740 (Print)0277-3740.

_____. SOD1: a candidate gene for keratoconus. **Invest Ophthalmol Vis Sci**, v. 47, n. 8, p. 3345-51, Aug 2006. ISSN 0146-0404 (Print)0146-0404. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1167/iovs.05-1500>>.

VALGAEREN, H.; KOPPEN, C.; VAN CAMP, G. A new perspective on the genetics of keratoconus: why have we not been more successful? **Ophthalmic Genet**, v. 39, n. 2, p. 158-174, Apr 2018. ISSN 1744-5094. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29111844> >.

VEGA-ESTRADA, A.; ALIO, J. L. The use of intracorneal ring segments in keratoconus. **Eye Vis (Lond)**, v. 3, p. 8, 2016. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26981548> >.

VERMA, A. et al. Investigation of VSX1 sequence variants in South Indian patients with sporadic cases of keratoconus. **BMC Res Notes**, v. 6, p. 103, Mar 18 2013. ISSN 1756-0500. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1186/1756-0500-6-103> >.

VINCENT, A. L. et al. Screening the visual system homeobox 1 gene in keratoconus and posterior polymorphous dystrophy cohorts identifies a novel variant. **Mol Vis**, v. 19, p. 852-60, 2013. ISSN 1090-0535.

VITART, V. et al. New loci associated with central cornea thickness include COL5A1, AKAP13 and AVGR8. **Hum Mol Genet**, v. 19, n. 21, p. 4304-11, Nov 1 2010. ISSN 0964-6906. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1093/hmg/ddq349> >.

VITHANA, E. N. et al. Collagen-related genes influence the glaucoma risk factor, central corneal thickness. **Hum Mol Genet**, v. 20, n. 4, p. 649-58, Feb 15 2011. ISSN 0964-6906. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1093/hmg/ddq511> >.

WANG, Y. et al. Association of Interleukin-1 Gene Single Nucleotide Polymorphisms with Keratoconus in Chinese Han Population. **Curr Eye Res**, v. 41, n. 5, p. 630-5, May 2016. ISSN 0271-3683. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.3109/02713683.2015.1045083> >.

_____. Common single nucleotide polymorphisms and keratoconus in the Han Chinese population. **Ophthalmic Genet**, v. 34, n. 3, p. 160-6, Sep 2013. ISSN 1381-6810. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.3109/13816810.2012.743569> >.

WANG, K.; LI, M.; HAKONARSON, H. ANNOVAR: functional annotation of genetic variants from high-throughput sequencing data. **Nucleic Acids Res**, v. 38, n. 16, p. e164, Sep 2010. ISSN 0305-1048. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1093/nar/gkq603> >.

WHEELER, J. et al. The Genetics of Keratoconus: A Review. **Reprod Syst Sex Disord**, n. Suppl 6, Jun 2012. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23795306> >.

WOJCIK, K. A. et al. Polymorphism of the transferrin gene in eye diseases: keratoconus and Fuchs endothelial corneal dystrophy. **Biomed Res Int**, v. 2013, p. 247438, 2013. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1155/2013/247438> >.

_____. Polymorphism of the APEX nuclease 1 gene in keratoconus and Fuchs endothelial corneal dystrophy. **Cell Mol Biol Lett**, v. 20, n. 1, p. 48-65, Mar 2015. ISSN 1425-8153. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1515/cmb-2015-0001> >.

_____. Polymorphism of the flap endonuclease 1 gene in keratoconus and Fuchs endothelial corneal dystrophy. **Int J Mol Sci**, v. 15, n. 8, p. 14786-802, Aug 22 2014b. ISSN 1422-0067. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.3390/ijms150814786> >.

_____. Polymorphism of the DNA base excision repair genes in keratoconus. **Int J Mol Sci**, v. 15, n. 11, p. 19682-99, Oct 29 2014a. ISSN 1422-0067. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.3390/ijms151119682> >.

WOODWARD, M. A.; BLACHLEY, T. S.; STEIN, J. D. The Association Between Sociodemographic Factors, Common Systemic Diseases, and Keratoconus: An Analysis of a Nationwide Health Care Claims Database. **Ophthalmology**, v. 123, n. 3, p. 457-65.e2, Mar 2016. ISSN 1549-4713. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26707415> >.

YOU, J. et al. RNA-Seq analysis and comparison of corneal epithelium in keratoconus and myopia patients. **Sci Rep**, v. 8, n. 1, p. 389, Jan 2018. ISSN 2045-2322. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29321650> >.

ZHENG, X. et al. A high-performance computing toolset for relatedness and principal component analysis of SNP data. **Bioinformatics**, v. 28, n. 24, p. 3326-8, Dec 15 2012. ISSN 1367-4803. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1093/bioinformatics/bts606> >.