

Análise da relação da ocorrência de polimorfismo de nucleotídeo único do gene *DOCK9* em ceratocone

Relation analysis of the occurrence of single nucleotide polymorphism of the DOCK9 gene in keratoconus

Leonardo Mariano Reis¹, Francisco W. Rodrigues¹, Rodrigo Egídio da Silva², Alexandre Chater Taleb³, Marcos Pereira de Ávila⁴

RESUMO

Objetivo: Avaliar a ocorrência de mutação em *locus* gênico candidato e sua relação com ceratocone em pacientes atendidos no Brasil comparados a voluntários saudáveis, através da análise de polimorfismo de nucleotídeo único no gene *DOCK9*. **Métodos:** Neste estudo clínico foram avaliados 108 indivíduos, sendo 46 pacientes com ceratocone e 62 voluntários saudáveis (controles). Amostras de DNA foram obtidas do sangue coletado de pacientes com ceratocone e controles para a realização de análise de genotipagem. O genótipo do polimorfismo de nucleotídeo único rs7995432 no gene *DOCK9* foi determinado através de reação em cadeia da polimerase em tempo real (qPCR). **Resultados:** A frequência do alelo mutante (C) foi de 4,8% para os pacientes e 7,6% para os controles. Para o alelo selvagem (T), as frequências foram de 95,2% para os pacientes e 92,4% para os controles. O genótipo heterozigótico esteve presente em 9,5% dos pacientes e 11% dos controles, enquanto o genótipo homozigótico para o alelo selvagem (TT) foi encontrado em 90,5% e 87% para os pacientes e controles, respectivamente. **Conclusão:** Não foram observadas diferenças significativas na frequência e discriminação dos alelos mutante e selvagem entre os pacientes com ceratocone e os controles. Portanto, não foi possível fazer uma associação destas mutações no gene *DOCK9* com a ocorrência do ceratocone para esta população.

Descritores: Ceratocone; Córnea; Mutação genética; Polimorfismo de nucleotídeo único

ABSTRACT

Objective: To evaluate the occurrence of a mutation in candidate genetic loci and its relation with keratoconus in patients treated in Brazil compared to healthy volunteers, through analysis of single nucleotide polymorphism in the *DOCK9* gene. **Methods:** In this clinical study, 108 participants were evaluated, including 46 keratoconus patients and 62 healthy volunteers (controls). DNA samples were extracted from collected blood from keratoconus patients and controls. The genotyping of the single nucleotide polymorphism rs7995432 in the *DOCK9* gene was determined through a real-time polymerase chain reaction (qPCR). **Results:** The frequency of the mutant allele (C) was 4.8% in patients and 7.6% in controls. For the wild allele (T), the frequencies were 95.2% in patients and 92.4% in controls. The heterozygous genotype was present in 9.5% of patients and 11% of controls, while the homozygous genotype for the wild allele (TT) was found in 90.5% and 87% for patients and controls, respectively. **Conclusion:** There were no significant differences in the frequency and discrimination of the mutant and wild alleles between patients and controls. Therefore, these results confirm no association of these mutations in the *DOCK9* gene and the occurrence of keratoconus for this population.

Keywords: Keratoconus; Cornea; Genetic mutation; Polymorphism, single nucleotide polymorphism

¹ Programa de Pós-graduação, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, GO, Brasil.

² Faculdade de Medicina, Pontifícia Universidade Católica de Goiás (PUC-GO), Goiânia, GO, Brasil

³ Faculdade de Medicina, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, GO, Brasil.

⁴ Centro de Referência em Oftalmologia, Faculdade de Medicina, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, GO, Brasil.

Pesquisa desenvolvida na Universidade Federal de Goiás, Goiânia, GO, Brasil.

Os autores declaram não haver conflitos de interesse.

Recebido para publicação em 24/02/2016 - Aceito para publicação em 07/04/2016

INTRODUÇÃO

Ceratocone é uma condição em que a córnea assume formato cônico resultante de afinamento não inflamatório do estroma corneano. Esse afinamento provoca astigmatismo irregular, miopia, prostrusão e baixa qualidade visual, que varia de leve a deficiência acentuada⁽¹⁾. É uma doença progressiva, que pode acometer ambos os olhos, embora, normalmente, apenas um seja afetado no início⁽²⁾. O ceratocone já foi relatado em trabalhos anteriores como o principal responsável pela indicação de transplantes de córnea nos Estados Unidos⁽³⁾ e no mundo ocidental⁽⁴⁾. Em outra revisão mais atualizada sobre patogênese do ceratocone, a doença é citada como a causa mais comum de ceratoplastia no mundo desenvolvido⁽⁵⁾. Baseado em um estudo epidemiológico com duração de 48 anos conduzido nos Estados Unidos, o ceratocone apresentou incidência média total de dois casos por 100.000 habitantes por ano⁽⁶⁾. Na população geral, o ceratocone apresenta uma prevalência de aproximadamente 1:2.000⁽³⁾.

O ceratocone pode ser classificado de acordo com Amsler-Krumeich considerando aspectos clínicos associados a dados topográficos e paquimétricos. No estágio 1, estão olhos com miopia e/ou astigmatismo de até 5,00 dioptrias e curvatura central menor do que 48,00 dioptrias. O estágio 2 corresponde a olhos com miopia e/ou astigmatismo entre 5,00 e 8,00 dioptrias, curvatura central menor do que 53,00 dioptrias, ausência de cicatriz corneana e espessura no ponto mais fino maior que 400 micrômetros. Para o estágio 3 os critérios são: miopia e/ou astigmatismo entre 8,00 e 10,00 dioptrias, curvatura central maior que 53,00 dioptrias, ausência de cicatriz e espessura mínima entre 300 e 400 micrômetros. Finalmente, o estágio 4 compreende olhos com cicatriz corneana, refração não mensurável, curvatura central maior que 55,00 dioptrias e espessura menor que 200 micrômetros⁽⁷⁾.

O ceratocone é mais comumente encontrado como doença isolada, apesar de relatos que descrevem uma associação com síndrome de Down, amaurose congênita de Leber e prolapso de válvula mitral⁽⁸⁾. Foi também associado a outras doenças genéticas sistêmicas⁽⁸⁾. Essas síndromes e doenças genéticas têm fatores que se unem quando são reclassificadas. A maioria das síndromes genéticas associadas ao ceratocone são classificadas em um dos seguintes quatro grupos: doenças do tecido conjuntivo com elasticidade anormal do colágeno; função retiniana anormal com estimulação oculodigital; associada com atopia ou eczema e coceira nos olhos; ou função mental reduzida associada com estimulação oculodigital⁽⁹⁾.

Herança autossômica dominante com expressão variável tem sido sugerida por vários autores como modo de transmissão do ceratocone^(10,11). Estudos de ligação baseados em famílias contribuíram para identificar *loci* gênicos candidatos que podem abrigar mutações patogênicas^(12,13). Esses estudos de ligação conduzidos em famílias afetadas com ceratocone identificaram pelo menos 17 *loci*, sugerindo heterogeneidade genética na epidemiologia do ceratocone. Isso significa que o ceratocone poderia ser causado por mutações em diferentes genes para cada família^(12,14). Em estudo genético para avaliar se a severidade da doença influencia na agregação familiar, os autores encontraram que a presença ou ausência de história familiar positiva não está associada com doença clínica mais avançada. Esses resultados sugerem que todos os pacientes com ceratocone podem ser recrutados para estudo genético, já que a gravidade da doença parece não influenciar na agregação familiar⁽¹⁵⁾.

Através da pesquisa genética extensiva em ceratocone nas últimas décadas, alguns genes foram relatados como prováveis candidatos: *VSX1* (*visual system homeobox 1*), *miR-184*, e *DOCK9* (*dedicator of cytokines 9*)⁽¹⁴⁾. Além destes, o *TGFBI* também mostra potencial para o desenvolvimento do ceratocone em pacientes predispostos⁽¹⁶⁾.

Em outro estudo, não associado a qualquer síndrome, 18 famílias equatorianas com ceratocone isolado foram analisadas. Essas famílias apresentaram um padrão de herança autossômica dominante com penetrância reduzida. A análise de ligação do genoma completo proveu evidências significativas para um novo *locus* no cromossomo 13 (13q32), incluído numa região genômica de 5,6Mb entre os polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs) rs9516572 e rs3825523⁽¹⁷⁾. Os polimorfismos de nucleotídeo único (SNP – *Single Nucleotide Polymorphism*) são uma forma muito comum de variação genética em sequências de DNA. Neste tipo de variação genética, uma única base nucleotídica é substituída ao longo de uma sequência de DNA. Os SNPs em regiões codificadoras são subclassificados em sinônimos e não-sinônimos. Os SNPs sinônimos (ou silenciosos) resultam em troca de bases que não alteram a sequência do aminoácido codificado⁽¹⁸⁾. Entretanto, mutações sinônimas podem influenciar na conformação da proteína, alterando assim a sua função dentro da célula podendo influenciar diretamente os traços fenotípicos de um indivíduo. Os SNPs não-sinônimos resultam em uma substituição de bases que altera a sequência de aminoácido e, conseqüentemente, podem afetar a função da proteína codificada (*missense*), ou gerar um códon de parada (*nonsense*)⁽¹⁹⁾. As maiores diferenças encontradas no *locus* 13q32 entre a família equatoriana (KTCN-014) e a população do Projeto 1.000 Genomas estavam presentes em duas variações de nucleotídeo único (SNVs): rs7995432 no *DOCK9* e rs145089138 no *IPO5*, segregadas com o fenótipo ceratocone na família. Isto sugere um forte envolvimento dessas sequências variantes na etiologia do ceratocone^(20,21).

O objetivo do presente trabalho foi avaliar a ocorrência de polimorfismos de nucleotídeo único em *locus* gênico candidato e sua relação com o desenvolvimento do ceratocone. Para isso, foram determinadas as frequências genotípicas e alélicas dos polimorfismos de nucleotídeo único para o gene *DOCK9* (rs7995432 c.720+43A>G) em pacientes com ceratocone e comparadas com uma população controle.

MÉTODOS

Foram incluídos na pesquisa 108 indivíduos de ambos os sexos e adultos, sendo 46 com o diagnóstico clínico de ceratocone e 62 indivíduos controles, que concordaram em participar da pesquisa assinando o termo de consentimento livre e esclarecido.

Todos os pacientes atendidos foram submetidos a exame oftalmológico completo: refração, acuidade visual com correção e sem correção, fundoscopia, biomicroscopia e aferição da pressão intraocular. Para a confirmação do diagnóstico de ceratocone, todos os indivíduos foram submetidos à topografia de córnea em ambos os olhos utilizando o Orbscan IIz (Bausch & Lomb, Orbtek Inc., Salt Lake City, UT, EUA).

Foram excluídos do estudo os pacientes que apresentaram outras doenças e/ou cirurgias oftalmológicas prévias; pacientes que não apresentaram condições clínicas para a realização dos exames ou com doenças sistêmicas associadas e os que se recusaram a participar.

Para o estudo, foi realizada a coleta de aproximadamente 5 mL de sangue periférico de cada paciente, em uma única tomada, em tubos a vácuo BD Vacutainer System® (Becton Dickinson, Basel, Suíça) contendo o anticoagulante K₃EDTA. Após a coleta, todas as amostras foram armazenadas em temperatura ambiente e encaminhadas ao Laboratório de Genética Molecular e Citogenética da Universidade Federal de Goiás para realização da extração do DNA genômico.

Para a extração de DNA, uma alíquota de 200 µL de sangue total foi submetida utilizando o Kit de extração *Pure Link* (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA) de acordo com o protocolo sugerido pelo próprio fabricante. Ao final do processo de extração, as amostras de DNA dos pacientes com ceratocone e indivíduos controles foram acondicionadas em microtubos de 1,5 mL, etiquetados e armazenados em freezer a -20°C. A qualidade e concentração do DNA foram avaliadas por espectrofotometria em equipamento *Nanodrop* (Thermo Scientific, Wilmington, DE, EUA), com leitura da absorbância nos comprimentos de ondas A260 e A280. As amostras permaneceram estocadas em freezer a -20°C até a análise, sem qualquer prejuízo ou interferência no seu resultado.

A genotipagem dos polimorfismos foi realizada através da técnica de qPCR (PCR em tempo real) utilizando-se ensaios validados *TaqMan® Predesigned SNP Genotyping Assays* (Applied Biosystems Inc., Foster City, CA, EUA) para o gene *DOCK9* (rs7995432; assay IDs: C_25610905_10).

Os ensaios *TaqMan genotyping* para os respectivos SNPs em estudo incluem dois iniciadores (*primers forward* e *reverse*) para a amplificação das regiões de interesse e duas sondas para detecção dos alelos. As sondas possuem: um corante *reporter* fluorescente na extremidade 5' [VIC para o alelo mutante com citosina (C) e FAM para o alelo selvagem com timina (T)]; um *minor groove binder* (MGB) que aumenta a temperatura de anelamento da sonda sem aumentar o seu comprimento, permitindo uma discriminação mais precisa dos alelos; um *quencher* não fluorescente (NFQ) na terminação 3' da sonda.

Para as reações de qPCR foram utilizados 12,5 µL de *master Mix Taqman* (2X), 0,5 µL *TaqMan SNP Genotyping Assay* (40X), 20 ng de DNA extraído dos indivíduos do estudo e 8 µL de água ultrapura. As amostras foram amplificadas em equipamento *Step One Plus* (Applied Biosystems Inc., Foster City, CA, EUA) de acordo com a seguinte ciclagem: ativação da enzima *AmpliTaq Gold* a 95°C durante 10 minutos seguidos de 40 ciclos a 95°C por 15 segundos (desnaturação) e 60°C por 1 minuto (anelamento/extensão). A discriminação e plotagem dos genótipos foram realizadas pelo *TaqMan® Genotyper Software* (Applied Biosystems Inc., Foster City, CA, EUA).

As diferenças entre a frequência dos alelos selvagem e mutante foram analisadas através do teste do qui-quadrado (*Pearson's chi-square*) com significância determinada a $p < 0,05$. Para validação do estudo, o SNP foi avaliado de acordo com o equilíbrio de Hardy-Weinberg utilizando-se dos valores de p calculados no teste qui-quadrado. Os testes estatísticos foram realizados com o uso do software IBM SPSS (SPSS Inc., Chicago, IL, EUA) versão 20.

RESULTADOS

Pelos valores de p calculados no teste qui-quadrado, foi comprovado que os genótipos do SNP 7995432 nos Grupos Estudo e Controle estão em equilíbrio.

No grupo estudo, 25 eram do sexo masculino e 21 do sexo feminino. No grupo controle, havia 24 homens e 38 mulheres. Do total de indivíduos, portanto, aproximadamente 55% eram do sexo feminino e 45% do sexo masculino, sendo que no grupo estudo, a porcentagem de homens com relação a mulheres foi maior do que no grupo controle (54,35% e 38,71% respectivamente). Por outro lado, a porcentagem de mulheres pacientes (45,65%) foi menor do que as selecionadas para controle (61,29%) comparando com o número de indivíduos masculinos (Tabela 1).

Tabela 1
Distribuição dos Grupos Estudo e Controle de acordo com o gênero

Sexo	Grupo Estudo		Grupo Controle		Total	
	n	%	n	%	n	%
Masculino	25	54,35	24	38,71	49	45,37
Feminino	21	45,65	38	61,29	59	54,63
Total	46	100	62	100	108	100

Com relação à idade dos indivíduos, a média entre os pacientes foi de 53,43 anos com desvio padrão de 22,58. No grupo controle, a média foi de 52,96 anos e o desvio padrão 20,55.

Mutações de polimorfismo de nucleotídeo único foram encontradas em ambos os grupos (estudo e controle). No entanto, não foram encontradas diferenças significativas nas frequências dos alelos mutante e selvagem entres os pacientes com ceratocone e os controles ($p=0,54$). A frequência do alelo mutante (C) foi de 4,8% para o grupo estudo e 7,6% para o grupo controle. Para o alelo selvagem (T), as frequências foram de 95,2% para os pacientes com ceratocone e 92,4% para os controles (figura 1).

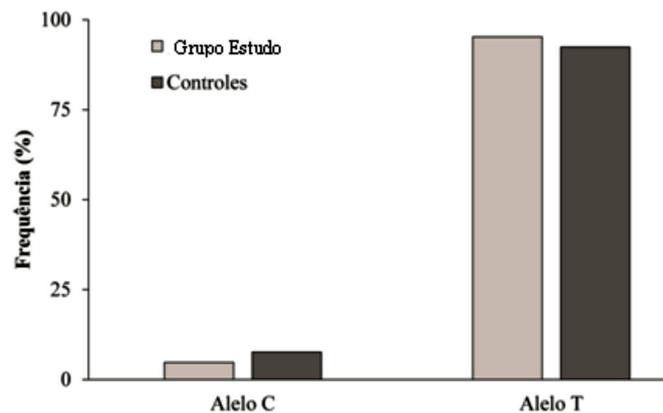


Figura 1: Comparação da frequência dos alelos mutante (C) e selvagem (T) para os pacientes com ceratocone e os controles.

Para os diferentes genótipos, também não existiram diferenças significantes entre o grupo estudo e o grupo controle ($p=0,57$). O genótipo homocigótico para o alelo mutante (CC) não foi encontrado no grupo estudo, enquanto 2% dos controles apresentaram este genótipo. O genótipo heterocigótico esteve presente em 9,5% dos pacientes com ceratocone e 11% dos controles. Já o genótipo homocigótico para o alelo selvagem (TT) foi encontrado em 90,5% e 87% para o grupo estudo e controle, respectivamente (figura 2).

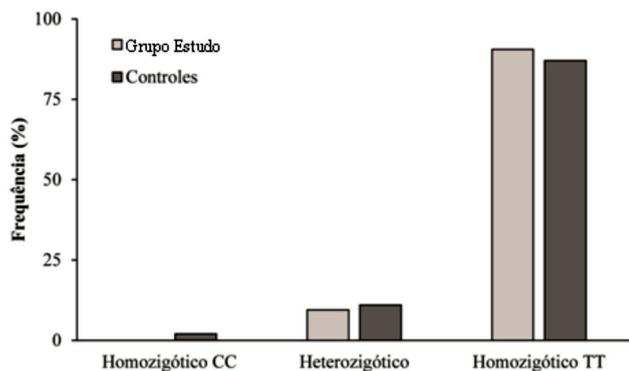


Figura 2: Comparação entre os genótipos dos pacientes com ceratocone e dos controles.

DISCUSSÃO

O ceratocone é uma disfunção ocular não-inflamatória caracterizada pelo afinamento corneano responsável pelo maior número de indicação de transplantes de córnea nos Estados Unidos e em todo o mundo ocidental. A etiologia do ceratocone envolve múltiplos fatores e o componente genético na sua origem foi confirmado em diversos estudos^(13,16,20). Entre os genes descritos que influenciam a manifestação do ceratocone, o *VSM1* e o *TGFBI* mostraram o maior potencial para o desenvolvimento da doença em pacientes predispostos⁽¹⁶⁾. Adicionalmente, o gene *DOCK9* foi associado ao desenvolvimento do ceratocone⁽¹⁷⁾.

Czugala e colaboradores (2012) observaram uma mutação de SNP no gene *DOCK9* relacionada ao ceratocone onde existe uma troca de aminoácidos (mutação não-sinônima). A mutação no SNP rs19104782 (c.2262A>C) altera a base adenina (A) para uma citosina (C) e, conseqüentemente, muda o aminoácido glutamina para histidina. Esta mudança de aminoácidos altera a forma e a função da proteína produzida, e está relacionada com desenvolvimento do fenótipo do ceratocone⁽²⁰⁾. Outro estudo, realizado *in vitro*, observou mutações neste mesmo SNP, rs191047852, em que ocorreu uma mutação sinônima (sem a troca de aminoácidos) afetando a tradução da proteína e assim, teoricamente, promovendo o desenvolvimento do ceratocone⁽¹⁶⁾.

Uma outra mutação do tipo polimorfismo de nucleotídeo único no gene *DOCK9* foi observada no estudo de CZUGALA et al. (2012), relacionada também com o desenvolvimento do ceratocone em uma família equatoriana, no SNP rs7995432 (c.720+43A>G). O referido SNP se encontra em uma região intrônica do gene *DOCK9* e, portanto, pode afetar o *splicing* do RNA mensageiro, alterando a função da proteína resultante através de mudanças na sua estrutura terciária. Nessa pesquisa, 51 pacientes com ceratocone foram avaliados, sendo que 23 pertencentes à mesma família, convencionada de KTCN-014. Os outros 28 pacientes eram indivíduos de 14 famílias diferentes, com 2 representantes em cada grupo familiar. Para o grupo controle, 105 indivíduos sem ceratocone e de mesma origem étnica foram selecionados, perfazendo um total de 210 alelos. Como resultado, a sequência mutante no gene *DOCK9* coincidiu com o fenótipo portador de ceratocone em 100% dos indivíduos da família equatoriana com 23 pacientes; enquanto que no grupo controle apenas 3 indivíduos apresentaram essa sequência variante.

No presente estudo, o mesmo SNP rs7995432 (c.720+43A>G) foi analisado nos pacientes com ceratocone e nos indivíduos do grupo controle para posterior comparação da frequência do alelo mutante entre os dois grupos, assim como da frequência do alelo selvagem e dos três possíveis genótipos, com o fito de verificar se há correlação estatisticamente significativa entre a ocorrência da mutação e o fenótipo com ceratocone e possível nexos de causalidade. Para isso, 46 pacientes com ceratocone e sem vínculos familiares foram selecionados e testados para o SNP em tela. Para formar o grupo controle, foram recrutados 62 indivíduos que também se submeteram à análise da mutação no rs7995432, presente no gene *DOCK9*. Nos resultados da pesquisa, não houve diferenças significativas para associação deste SNP com a incidência ou com o desenvolvimento do ceratocone nos pacientes analisados.

Este é o primeiro estudo a analisar a ocorrência de polimorfismos de nucleotídeo único no gene *DOCK9* em pacientes com ceratocone atendidos no Brasil. Os resultados desta pesquisa, entretanto, divergem daqueles encontrados no estudo realizado por Czugala e colaboradores (2012) em indivíduos do Equador. Estas diferenças podem estar relacionadas com a variabilidade genética entre populações e fatores ambientais que desencadeiam o desenvolvimento da doença.

Todavia, outras considerações merecem menção. A primeira é que no estudo original, outros dois genes avaliados também apresentaram concomitantemente mutação com segregação para o fenótipo com ceratocone, quais sejam: c.2377-132A>C no *IPO5* e c.1053+29G>C no *STK24*; além de outra mutação no próprio gene *DOCK9*, a substituição c.2262A4C (Gln754His) no éxon 20⁽²⁰⁾.

Igualmente, no estudo realizado com indivíduos brasileiros não há qualquer relação de parentesco entre os pacientes, tampouco uniformidade étnica entre os mesmos e os membros do grupo controle, o que dificulta a coincidência de uma linhagem com o mesmo genótipo.

Finalmente, não há que se falar do estágio de evolução da doença na influência dos resultados, posto que estudos anteriores sugeriram que pacientes com ceratocone em diferentes estádios podem ser recrutados para estudo genético, vez que a gravidade da doença não parece influenciar na agregação familiar.

CONCLUSÃO

As mutações tipo polimorfismo de nucleotídeo único foram observadas em pacientes com ceratocone e controles. Não foram observadas diferenças significativas na frequência e discriminação dos alelos mutante e selvagem entre os dois grupos. Assim, não foi possível fazer uma associação destas mutações com a ocorrência do ceratocone para esta população.

Este estudo contribui para o conhecimento molecular e genético na patologia do ceratocone, pois os resultados encontrados descaracterizam a influência da mutação de nucleotídeo único rs7995432 no gene *DOCK9* como fator de risco para o desenvolvimento da referida doença. Há, todavia, 387 polimorfismos de nucleotídeo único somente no gene *DOCK9* e devido à alta variabilidade de expressão gênica para o ceratocone em diferentes populações, futuros estudos são necessários para determinar a associação deste gene em pacientes com ceratocone.

REFERÊNCIAS

1. Krachmer JH, Feder RS, Belin MW. Keratoconus and related noninflammatory corneal thinning disorders. *Surv Ophthalmol*. 1984;28(4):293-322.
2. Rabinowitz YS, Nesburn AB, McDonnell PJ. Videokeratography of the fellow eye in unilateral keratoconus. *Ophthalmology*. 1993;100(2):181-6.
3. Rabinowitz YS. Keratoconus. *Surv Ophthalmol*. 1998;42(4):297-319.
4. Kang PC, Klintworth GK, Kim T, Carlson AN, Adelman R, Stinnett S, et al. Trends in the indications for penetrating keratoplasty, 1980-2001. *Cornea*. 2005;24(7):801-3.
5. Davidson A, Hayes S, Hardcastle A, Tuft S. The pathogenesis of keratoconus. *Eye*. 2014;28(2):189-95.
6. Kennedy RH, Bourne WM, Dyer JA. A 48-year clinical and epidemiologic study of keratoconus. *Am J Ophthalmol*. 1986;101(3):267-73.
7. Choi JA, Kim M-S. Progression of keratoconus by longitudinal assessment with corneal topography. *Investigative ophthalmology & visual science*. 2012;53(2):927-35.
8. Edwards M, McGhee CN, Dean S. The genetics of keratoconus. *Clin Exp Ophthalmol*. 2001;29(6):345-51.
9. Sugar J, Macsai MS. What causes keratoconus? *Cornea*. 2012;31(6):716-9.
10. Gonzalez V, McDonnell PJ. Computer-assisted corneal topography in parents of patients with keratoconus. *Arch Ophthalmol*. 1992;110(10):1412-4.
11. Parker J, Ko WW, Pavlopoulos G, Rabinowitz YS, Feldman ST. Videokeratography of keratoconus in monozygotic twins. *J Refract Surg*. 1996;12(1):180.
12. Rabinowitz YS. The genetics of keratoconus. *Ophthalmol Clin*. 2003;16(4):607-20.
13. Romero-Jiménez M, Santodomingo-Rubido J, Wolffsohn JS. Keratoconus: a review. *Contact Lens Anterior Eye*. 2010;33(4):157-66.
14. Wheeler J, Hauser MA, Afshari NA, Allingham RR, Liu Y. The genetics of keratoconus: a review. *Microscopy (Oxford, England)*. 2012 (Suppl 6),pii:001.
15. Szczotka-Flynn L, Slaughter M, McMahon T, Barr J, Edrington T, Fink B, et al. Disease severity and family history in keratoconus. *Br J Ophthalmol*. 2008;92(8):1108-11.
16. Karolak JA, Polakowski P, Szaflik J, Szaflik JP, Gajecka M. Molecular screening of keratoconus susceptibility sequence variants in VSX1, TGFB1, DOCK9, STK24, and IPO5 genes in polish patients and novel TGFB1 variant identification. *Ophthalmic Genet*. 2016;37(1):37-43.
17. Gajecka M, Radhakrishna U, Winters D, Nath SK, Rydzanicz M, Ratnamala U, et al. Localization of a gene for keratoconus to a 5.6-Mb interval on 13q32. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2009;50(4):1531-9.
18. Boopathi NM. Genotyping of Mapping Population. *Genetic Mapping and Marker Assisted Selection*. Nova Delhi: Springer; 2013. p. 39-80.
19. Pasternak JJ. An introduction to human molecular genetics: mechanisms of inherited diseases. Hoboken: John Wiley & Sons; 2005.
20. Czugala M, Karolak JA, Nowak DM, Polakowski P, Pitarque J, Molinari A, et al. Novel mutation and three other sequence variants segregating with phenotype at keratoconus 13q32 susceptibility locus. *Eur J Hum Genet*. 2012;20(4):389-97.
21. Nowak DM, Gajecka M. Nonrandom Distribution of miRNAs genes and single nucleotide variants in keratoconus loci. *PLoS One*. 2015;10(7):e0132143.

Autor correspondente:

Leonardo Mariano Reis
 Av. Americano do Brasil, nº260, Goiânia - GO, Brasil
 CEP.: 74180-010
 E-mail: drleomreis@hotmail.com