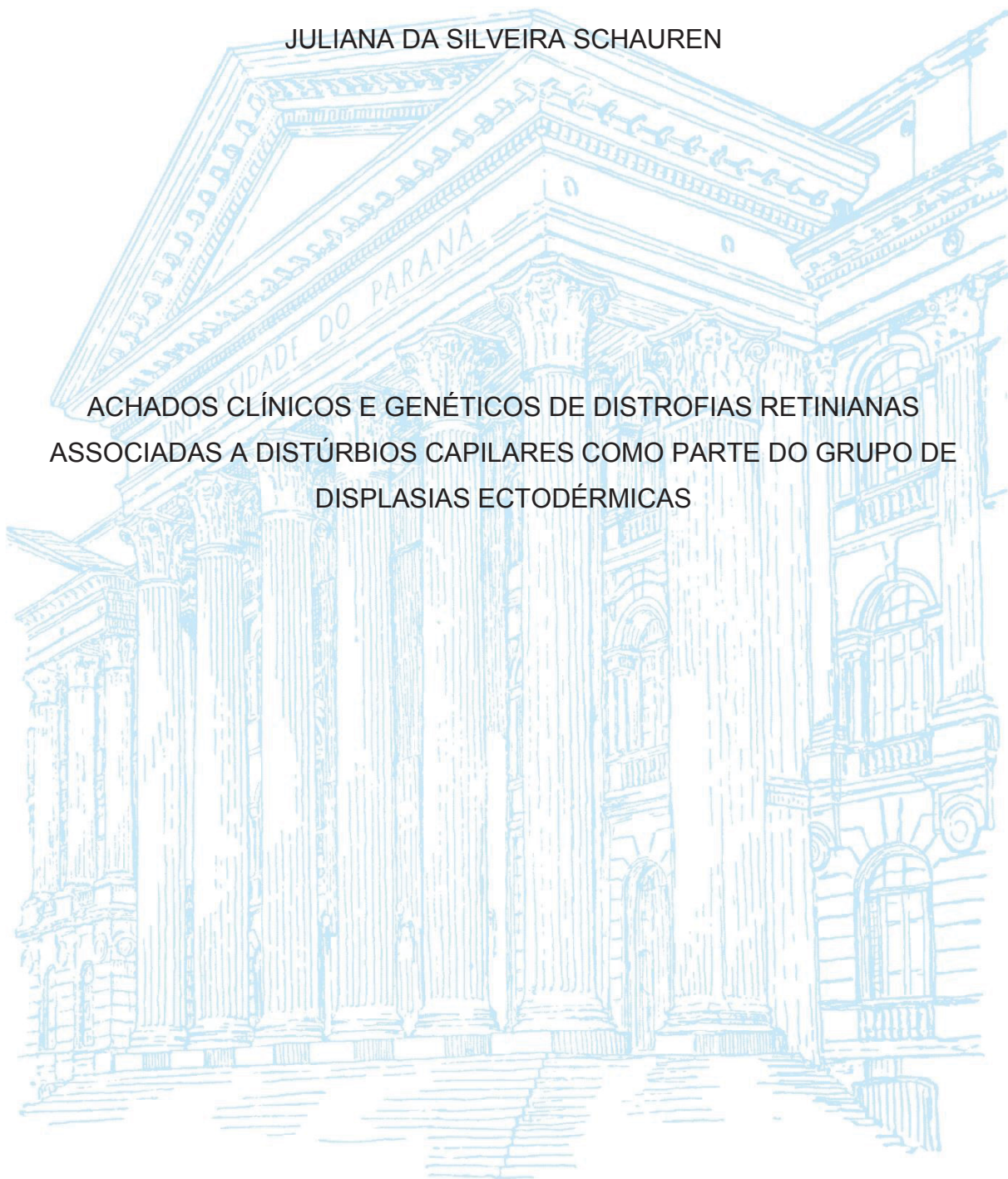


UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

JULIANA DA SILVEIRA SCHAUREN

ACHADOS CLÍNICOS E GENÉTICOS DE DISTROFIAS RETINIANAS
ASSOCIADAS A DISTÚRBIOS CAPILARES COMO PARTE DO GRUPO DE
DISPLASIAS ECTODÉRMICAS



CURITIBA

2017

JULIANA DA SILVEIRA SCHAUREN

ACHADOS CLÍNICOS E GENÉTICOS DE DISTROFIAS RETINIANAS
ASSOCIADAS A DISTÚRBIOS CAPILARES COMO PARTE DO GRUPO DE
DISPLASIAS ECTODÉRMICAS

Tese apresentada como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor ao Programa de Pós-Graduação em Genética, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.

Orientadora: Maria da Graça Bicalho

Coorientadores: Pablo Sandro Carvalho
Santos e Mario Teruo Sato

CURITIBA

2017

Universidade Federal do Paraná
Sistema de Bibliotecas
(Giana Mara Seniski Silva – CRB/9 1406)

Schauren, Juliana da Silveira

Achados clínicos e genéticos de distrofias retinianas associadas a distúrbios capilares como parte do grupo de displasias ectodérmicas. / Juliana da Silveira Schauren. – Curitiba, 2017.
142 p.: il.

Orientadora: Maria da Graça Bicalho.

Coorientadores: Pablo Sandro Carvalho Santos e Mario Teruo Sato.

Tese (doutorado) - Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Genética.

1. Degeneração macular. 2. Hipotricose. 3. Alopecia. 4. Genética. I. Título. II. Bicalho, Maria da Graça, 1958-. III. Santos, Pablo Sandro Carvalho. IV. Sato, Mario Teruo, 1965-. V. Universidade Federal do Paraná. Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Genética.

CDD (22. ed.) 614.5997




MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
SETOR DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA
CENTRO POLITÉCNICO - JARDIM DAS AMÉRICAS - CAIXA
POSTAL 19071 - CEP 81531-990 - CTBA, BRASIL 41 3361 1587
PPG-GEN@UFPR.BR

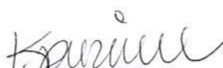



PARECER


Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em Genética da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da tese de doutorado de JULIANA DA SILVEIRA SCHAUREN, intitulada: "Achados clínicos e genéticos de distrofias retinianas associadas a distúrbios capilares como parte do grupo de displasias ectodérmicas", após terem inquirido a aluna e realizado a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua aprovação.

Curitiba, 27 de março de 2017


Doutor Marcelo Luiz Gehlen
Membro Titular


Doutora Kátia Sheylla Malta Purim
Membro Titular


Rodrigo Coutinho de Almeida
Membro Titular


Nina Amália Brancia Pagnan
Membro Titular


Doutora Maria da Graça Bicalho
Presidente



Dedico este trabalho à minha família, em especial à minha mãe Marisa da Graça da Silveira e a meu pai Libório Schauren por sempre me apoiarem e incentivarem meus estudos e meu crescimento profissional.

AGRADECIMENTOS

Começo agradecendo às pessoas mais importantes da minha vida, minha mãe Marisa, meu pai Libório, meu irmão Rafael (mais conhecido como gordo), minha tia Miriam, minha prima Nanda, meu afilhado João e a toda minha família que sempre me deu apoio em tudo. Incluo aqui meu trio inseparável que faz parte da minha família, Ana Paula e Mariana e meus afilhados amados Pedro Henrique e Isadora (afilhada de coração). Sem vocês eu não seria nada, não teria forças para pular as pedras que apareceram no meu caminho. Diante de todos os desafios e obstáculos que surgiram nesses quatro anos de doutorado, o mais difícil com certeza foi morar longe de vocês. Minha mãe teve um papel fundamental nesse período, com todo o apoio e amor incondicional. Mãe, obrigada! Você é meu tudo!

Preciso incluir aqui a minha família Curitibana, que foi sendo construída ao longo desses anos e que será para sempre. Ana Claudia, Néia, Erika, Carla, Lidi, Lo, Kadu, Mi, Su, Gê, Rê, Samuca, Vane, Mati, Go, Mari, Marisa, Bru, colegas do LIGH, amigos da Pós, Carol, Cidinho, Bruna, Paulo, Dani, Mineiro, Fafá. Obrigada por fazerem parte da minha vida! Agradeço também à Neusa e família por terem me acolhido no primeiro ano em Curitiba!

Agradeço imensamente a minha orientadora Graça por ter aceitado me orientar, por me dar a oportunidade de executar esse projeto, por não ter me deixado mudar de projeto, por confiar em mim e por me apoiar e permitir que eu trabalhasse durante o doutorado. Gratidão imensa!

Agradeço a meu coorientador Dr Mario que trouxe a ideia inicial do projeto para a Genética, que investiu e se dedicou para que o projeto tivesse andamento. Obrigada pela confiança depositada em mim! Foram muitas reuniões, ligações e almoços no costelão para colocar o trabalho em ordem. Também fizemos duas viagens pra coleta com a companhia das Anas. Uma experiência e tanto!

Agradeço a meu coorientador Pablo que fez contribuições fantásticas no delineamento do projeto, na escrita dos artigos. Ele também viajou conosco na primeira viagem de coleta em Paranaguá. Depois que foi pra Alemanha não perdemos o contato, tivemos longas reuniões por Skype muito produtivas.

Agradeço ao Dr Naoye por todo o apoio, interesse, dedicação, investimento e pela confiança depositada em mim. Foi uma convivência curta, mas muito agradável. Faço uma menção especial à Clínica Retina e Vitreo Consultoria que esteve sempre de portas abertas para a execução da pesquisa.

Agradeço à Dra Fabiane por todo o apoio na parte dermatológica do trabalho e na avaliação dos fios de cabelo. Sempre muito querida e disposta.

Agradeço à Ana Claudia pela parceria, pelas contribuições e especialmente pela amizade e palavras de motivação que foram muito importantes nesse período!

Agradeço ao Rodrigo pela ajuda com as análises, pelas contribuições e por aceitar participar da minha banca de qualificação e defesa.

Agradeço aos colaboradores Luiz Lima e Luiz Zago pelo investimento no projeto e pela confiança depositada em mim.

Agradeço aos professores da Pós, em especial à minha banca de acompanhamento, Lupe e Nina que fizeram contribuições muito importantes para o projeto e para minha vida acadêmica. Elas não só participaram como professoras durante esse período, mas também foram amigas, ouvindo meus problemas e me aconselhando. Muito obrigada!

Agradeço aos membros da banca que prontamente aceitaram participar da minha defesa.

Agradeço ao Convênio LIGH-FUNPAR e à CAPES pelo apoio financeiro e ao Centro de Microscopia Eletrônica/UFPR pelo apoio técnico.

Agradeço à Aninha, à Su e à Go por me auxiliarem com as coletas e ao Samuca e à Gê pelo apoio técnico durante o sequenciamento das amostras.

Agradeço a meus colegas e alunos da Uniandrade pela compreensão e pelo incentivo para que eu concluísse meu doutorado.

Por fim, agradeço especialmente aos pacientes e familiares que participaram deste estudo por seu tempo, interesse e carinho.

RESUMO

As distrofias maculares associadas a hipotricoses são doenças raras, com etiologia genética, que causam perda visual e problemas no crescimento dos cabelos. A Distrofia Macular Juvenil associada à Hipotricose (HJMD, do inglês *Hypotrichosis associated with Juvenile Macular Dystrophy*) é a que apresenta o maior número de casos. Ela e a Displasia Ectodérmica, Ectrodactilia e Distrofia Macular (EEM, do inglês *Ectodermal dysplasia, Ectrodactyly and Macular dystrophy*) são as únicas distrofias maculares associadas a alopecias que tem sua base genética conhecida, ambas causadas por mutações no gene *CDH3*. O objetivo deste trabalho foi investigar as bases genéticas das distrofias retinianas associadas a alopecias em três famílias brasileiras visando contribuir para a compreensão da fisiopatologia da doença. Das três famílias estudadas, 24 indivíduos (8 pacientes e 16 familiares) assinaram a termo de consentimento livre e esclarecido, passaram pela avaliação clínica e tiveram uma amostra de sangue coletada para extração do DNA. Através de sequenciamento de exomas, seguido por sequenciamento tradicional, três variantes foram encontradas no locus da p-caderina (*CDH3*). Os pacientes da família #1 foram homocigotos para a variante c.160+1G>A, os pacientes da família #2 foram heterocigotos para essa mesma variante e para c.G1063T:p.D355Y e os pacientes da família #3 foram homocigotos para a variante c.1795+1G>C. As duas últimas estão sendo descritas pela primeira vez. Ferramentas para predição indicam que todas essas variações são deletérias. Estes resultados contribuem para o aumento do conhecimento clínico e genético das distrofias maculares associadas a hipotricoses e confirmam o diagnóstico de HJMD nas três famílias. Esta é a primeira descrição de HJMD com confirmação genética na América Latina.

Palavras-chave: Hipotricose. Alopecia. Distrofia macular. Distrofia de retina. P-caderina. *CDH3*. HJMD. EEM.

ABSTRACT

Macular dystrophies associated to hypotrichosis are rare conditions, with genetic etiology, causing visual loss and impairing hair growth. Hypotrichosis associated with Juvenile Macular Dystrophy (HJMD), the most frequent of these diseases, and Ectodermal dysplasia, Ectrodactyly and Macular dystrophy (EEM) are the only ones with known genetic cause, both caused by mutations in *CDH3* gene. The objective of this study was to investigate the genetic basis of macular dystrophies associated with alopecias in three Brazilian families, aiming to shed light into the physiopathology of this disease. Of the three families studied, 24 individuals (8 patients and 16 relatives) signed the consent form, underwent clinical assessment and had a blood sample collected for DNA extraction. By whole exome sequencing approach followed by sequence-based genotyping, we were able to identify three variations in the p-cadherin locus (*CDH3*). The patients of family #1 were homozygous for the c.160+1G>A variant, the patients of family #2 were heterozygous for this same variation and for c.G1063T:p.D355Y and the patients of family #3 were homozygous for c.1795+1G>C. All nucleotide changes are predicted to encode truncated gene products, while two of which (c.G1063T:p.D355Y and c.1795+1G>C) are being described for the first time. These results shed light onto the clinical and genetic knowledge of macular dystrophies associated with hypotrichosis and confirm HJMD diagnosis in the three families. This is the first report of HJMD with molecular confirmation in Latin America.

Key-words: Hypotrichosis. Alopecia. Macular dystrophy. Retinal dystrophy. P-cadherin. *CDH3*. HJMD. EEM.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1- ESTRUTURA ANATÔMICA DO OLHO HUMANO.	16
FIGURA 2 – PRINCIPAIS CAMADAS E CÉLULAS DA RETINA HUMANA.....	18
FIGURA 3 - EQUEMA DO OLHO HUMANO MOSTRANDO A LOCALIZAÇÃO DA MÁCULA, E UMA SEÇÃO AMPLIADA MOSTRANDO A ORGANIZAÇÃO DAS CAMADAS DA RETINA.....	19
FIGURA 4 – IMAGENS DE MICROSCOPIA ÓPTICA E MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA DOS FIOS DE CABELO DE PACIENTES COM SCAF.....	24
FIGURA 5 – HEREDOGRAMA DA FAMÍLIA DIAGNOSTICADA COM DRORE-SCAF	27
FIGURA 6 – REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DA P-CADERINA, INCLUINDO OS DOMÍNIOS PROTEICOS E AS MUTAÇÕES CONHECIDAS	33
FIGURA 7 – ESTRUTURA DO GENE CDH3 E DA P-CADERINA HUMANA.	40
FIGURA 8 – FLUXOGRAMA DE APRESENTAÇÃO DA METODOLOGIA PROPOSTA PARA EXECUÇÃO DO PRESENTE PROJETO.	47
FIGURA 9 – PROCESSO DE CAPTURA DOS ALVOS ENRIQUECIDOS	53
FIGURA 10 – SEQUENCIAMENTO DE NOVA GERAÇÃO PELA PLATAFORMA ILLUMINA HISEQ 2000.....	54
FIGURE 1: OVERVIEW OF FILTERING STRATEGIES.	82
FIGURE 2: FAMILY #1 PEDIGREE AND CDH3 GENOTYPES SEGREGATION.....	83
FIGURE 3: FAMILY #2 PEDIGREE AND CDH3 GENOTYPES SEGREGATION.....	84
FIGURE 4: FAMILY #3 PEDIGREE AND CDH3 GENOTYPES SEGREGATION.....	85
FIGURE 5: POSTERIOR PHOTOGRAPH OF HAIR, RETINOGRAPHY AND SEM OF SPONTANEOUSLY ELIMINATED HAIR.....	86
FIGURE 1: BAR GRAPH OF HJMD, EEM AND CDH3 CONFIRMED CASES REPORTED BY YEAR.....	108

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - DISTROFIAS MACULARES ASSOCIADAS A ALOPECIAS DESCRITAS NA LITERATURA E SUAS PRINCIPAIS CARACTERÍSTICAS	29
TABELA 2 - GENES CANDIDATOS A TEREM ENVOLVIMENTO NA PATOGÊNESE DAS DISTROFIAS MACULARES ASSOCIADAS A ALOPECIAS, SUA LOCALIZAÇÃO GENÔMICA, FUNÇÃO E DOENÇAS RELACIONADAS.....	35
TABELA 3 – PRIMERS PARA AMPLIFICAÇÃO DO GENE <i>CDH3</i>	49
TABELA 4 – REAÇÃO DE PURIFICAÇÃO PELO MÉTODO ENZIMÁTICO EXO-SAP	50
TABELA 5 – REAÇÃO DE SEQUENCIAMENTO.....	51
TABELA 6 – CONDIÇÕES DE CICLAGEM PARA A REAÇÃO DE SEQUENCIAMENTO	51
TABLE 1: CLINICAL FEATURES SUMMARY.....	78
TABLE 2: LIST OF VARIANTS AFTER FILTERING.	81
TABLE S1: REVIEW OF MACULAR DYSTROPHY WITH ALOPECIA.....	87
TABLE S2: WES STATISTICS.....	93
TABLE 1: NUMBER OF HJMD, EEM AND CDH3 CONFIRMED CASES REPORTED BY YEAR.....	109
TABLE 2: DERMATOLOGICAL INFORMATION AND MICROSCOPY RESULTS FROM HJMD CASES REPORTED IN LITERATURE	110
TABLE 3: DERMATOLOGICAL INFORMATION AND MICROSCOPY RESULTS FROM EEM CASES REPORTED IN LITERATURE	114
TABLE 4: NUMBER OF STUDIES REPORTING THE DERMATOLOGICAL FEATURES IN HJMD AND EEM	115

LISTA DE ABREVIATURAS

AD - Autossômica dominante

AR - Autossômica recessiva

DNA – Ácido desoxirribonucleico

DRORE - Distrofia Retiniana com Onda Rápida Escotópica

EEM - Displasia Ectodérmica, Ectrodactilia e Distrofia Macular (do inglês *Ectodermal dysplasia, Ectrodactyly and Macular dystrophy*)

EOG - Eletro-oculograma

EPR - Epitélio pigmentado da retina

ERG - Eletrorretinograma

HC – Heterozigoto composto

HJMD - Distrofia Macular Juvenil associada à Hipotricose (do inglês *Hypotrichosis associated with Juvenile Macular Dystrophy*)

MEV - Microscopia eletrônica de varredura

MO - Microscopia óptica

PCR – Reação em cadeia da polimerase

SCAF - Síndrome dos Cabelos Anágenos Frouxos (do inglês *Loose Anagen Hair Syndrome*, LAHS)

UFPR – Universidade Federal do Paraná

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	14
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	16
2.1	ESTRUTURA DO OLHO HUMANO	16
2.2	DISTROFIAS MACULARES.....	19
2.3	ESTRUTURA DO FOLÍCULO CAPILAR E ALOPECIAS CONGÊNITAS.....	21
2.4	SÍNDROME DOS CABELOS ANÁGENOS FROUXOS (SCAF).....	24
2.5	DISTROFIA RETINIANA COM ONDA RÁPIDA ESCOTÓPICA ASSOCIADA À SÍNDROME DOS CABELOS ANÁGENOS FROUXOS (DRORE-SCAF)	25
2.6	CASUÍSTICA DAS DISTROFIAS MACULARES ASSOCIADAS A ALOPECIAS	27
2.7	DISTROFIAS MACULARES E ALTERAÇÕES CAPILARES PODEM SER CAUSADAS POR UMA ÚNICA MUTAÇÃO EM UM GENE PLEIOTRÓPICO?	34
2.8	O GENE <i>CDH3</i> E A P-CADERINA.....	39
3	JUSTIFICATIVA	42
4	OBJETIVOS	43
4.1	OBJETIVO GERAL:.....	43
4.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS:	43
5	MATERIAL E MÉTODOS	45
5.1	CARACTERIZAÇÃO DA AMOSTRA.....	45
5.2	METODOLOGIA.....	47
5.2.1	COLETA DO SANGUE PERIFÉRICO E EXTRAÇÃO DE DNA.	47
5.2.2	VALIDAÇÃO DOS RESULTADOS PELO SEQUENCIAMENTO DO GENE <i>CDH3</i>	47
5.2.3	SEQUENCIAMENTO DE EXOMAS	52
5.2.4	ANÁLISE DE SEGREGAÇÃO DAS VARIAÇÕES NAS FAMÍLIAS	55
6	RESULTADOS E DISCUSSÃO	56
6.1	CAPÍTULO I: DEEP CLINICAL INVESTIGATION AND WHOLE EXOME SEQUENCING REVEALS NEW <i>CDH3</i> VARIANTS IN BRAZILIAN FAMILIES WITH HYPOTRICHOSIS WITH JUVENILE MACULAR DYSTROPHY	57
	Abstract	58

	Introduction.....	59
	Subjects and Methods	61
	Results	65
	References	75
	Figure titles and legends	77
	Table titles and legends.....	77
	Supplemental Data References.....	94
6.2	CAPÍTULO II: HYPOTRICHOSSES ASSOCIATED TO SYNDROMES CAUSED BY MUTATIONS IN CDH3 GENE.....	96
	Abstract	98
	Introduction.....	99
	Methods.....	100
	Results and Discussion	101
	Conclusions.....	104
	References	105
	Figure legend	108
7	CONSIDERAÇÕES FINAIS	116
	REFERÊNCIAS.....	118
	APÊNDICE 1 - Termo de consentimento livre e esclarecido.	130
	APÊNDICE 2 - Termo de assentimento informado livre e esclarecido. ...	133
	APÊNDICE 3 - Questionário.....	136
	APÊNDICE 4 - Resumo apresentado na forma de pôster no ELAG course 2015.	139
	APÊNDICE 5 - Resumo apresentado na forma de pôster no 62° Congresso Brasileiro de Genética, 2016.	140
	APÊNDICE 6 - Folder para auxiliar profissionais no diagnóstico das distrofias maculares associadas a hipotricoses.....	141

1 INTRODUÇÃO

Distrofias maculares são distrofias retinianas que afetam predominantemente a área central da retina e causam perda visual lenta e progressiva. No ano de 2002, uma nova distrofia macular foi descrita pelo oftalmologista e professor da UFPR, Dr. Mario Teruo Sato (SATO et al., 2002). A nomenclatura sugerida foi Distrofia Retiniana com Onda Rápida Escotópica (DRORE). Apesar da descrição da distrofia retiniana por si só ser um achado relevante, esses pacientes apresentavam concomitantemente uma alopecia, também rara, denominada Síndrome dos Cabelos Anágenos Frouxos (SCAF ou LAHS, do inglês *Loose Anagen Hair Syndrome*) (SATO et al., 2002). Nessa ocasião foram estabelecidos a sintomatologia e o padrão de herança da doença, que revelavam fortes indícios de se tratar de uma condição autossômica recessiva e com expressividade variável (SATO, MARZAGÃO et al., 2004), porém a fisiopatologia da doença não foi caracterizada. Desde então, mais duas famílias com distrofia macular associada a alopecia foram diagnosticadas pelos Drs. Mario Teruo Sato e Naoye Shiokawa.

Existem alguns relatos de distrofias retinianas associadas a alopecias na literatura, porém existe grande variabilidade fenotípica entre os afetados. A maioria dessas doenças ainda não tem fisiopatologia descrita e tampouco tratamento. As distrofias retinianas associadas a alopecias mais bem estudadas, a Distrofia Macular Juvenil associada à Hipotricose e a Displasia Ectodérmica, Ectrodactilia e Distrofia Macular, são causadas por diferentes mutações em um mesmo gene. Essa descoberta gera dúvidas em relação à classificação destas como doenças distintas, pois poderiam ser variações fenotípicas da mesma doença (BASEL-VANAGAITE et al., 2010).

A variabilidade fenotípica das distrofias retinianas associadas a alopecias dificulta seu diagnóstico. O diagnóstico precoce é importante para que os pacientes tenham o suporte adequado, além disso, a degeneração macular pode levar ao remodelamento da retina neurosensorial, impedindo que qualquer potencial terapia regenerativa seja efetiva (JONES et al., 2012). Portanto, a presença de alopecia precoce deve alertar os clínicos para uma avaliação oftalmológica (FRAINER et al., 2013). Em suma, a heterogeneidade genética, fenotípica e clínica dessas doenças

juntamente com a dificuldade de diagnóstico, classificação e a ausência de tratamento específico para as mesmas justificam a necessidade de estudos que tragam contribuições para o conhecimento de sua fisiopatologia. Para tanto, este estudo tem por objetivo principal investigar as bases genéticas das distrofias retinianas associadas a alopecias nas famílias afetadas.

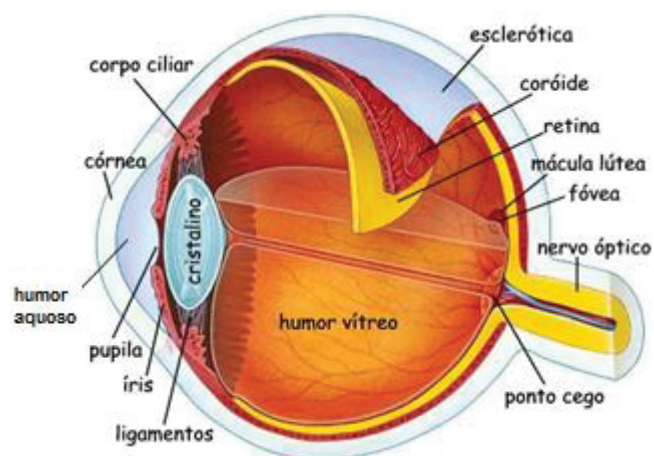
As metodologias propostas para esse estudo incluem o sequenciamento tradicional para análise de genes selecionados por revisão da literatura, o sequenciamento de nova geração para busca de variações patogênicas em regiões codificadoras (sequenciamento de exomas) e o amplo uso de ferramentas bioinformáticas para análise dos dados gerados. Atualmente o sequenciamento de exomas é uma das estratégias mais apropriadas para a busca de variantes raras relacionadas a fenótipos mendelianos e, possivelmente, a traços complexos (BAMSHAD et al., 2011). Além disso, essa estratégia tem se tornado cada vez mais acessível e eficaz. Em conjunto, essas características justificam a utilização do sequenciamento de exomas para a busca de variações patogênicas em pacientes de distrofias retinianas associadas a alopecias.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Estrutura do Olho Humano

O olho é o órgão sensorial responsável pela visão. O globo ocular localiza-se em uma cavidade óssea chamada órbita e é protegido externamente pelas pálpebras. Sua estrutura anatômica é composta por 6 músculos responsáveis pelos movimentos oculares e por 3 camadas concêntricas que englobam as demais estruturas que compõem o olho (FIGURA 1). A camada mais externa é composta pela córnea e pela esclera e tem função dióptrica e de proteção, respectivamente. A camada média é constituída pela coróide e pelo corpo ciliar, tendo como principal função a nutrição, e pela íris, estrutura circular responsável pelo controle do diâmetro da pupila e conseqüentemente regula a entrada de luminosidade no olho. A luz que entra no olho é convergida pelo cristalino, localizado entre a íris e o humor vítreo, que funciona como uma lente permitindo a focalização das imagens na retina (GUYTON e HALL, 1996). Já a camada mais interna é formada pela retina, que é a camada responsável pela formação das imagens e o foco principal deste estudo. Entre a córnea, a íris e o cristalino, há o humor aquoso, que é responsável pela manutenção da pressão intra-ocular (MCCAA, 1982). O humor vítreo preenche a parte interna do olho, entre o cristalino e a retina, mantendo a forma esférica do globo ocular (MCCAA, 1982).

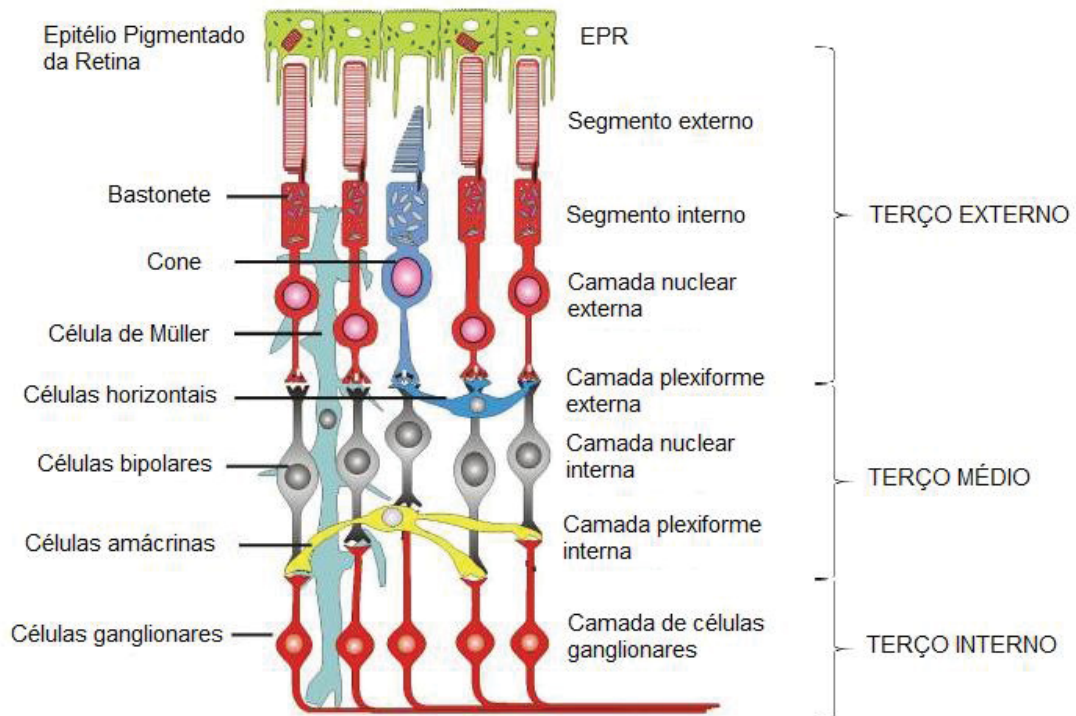
FIGURA 1- ESTRUTURA ANATÔMICA DO OLHO HUMANO.



FONTE: Domínio público (COE).

A retina humana é a camada sensível à luz presente na superfície interna do olho (GUYTON e HALL, 1996) (FIGURAS 2 e 3). Ela é constituída por 10 camadas contendo um ou mais tipos morfológicos de neurônios especializados no processamento da informação visual (NAG e WADHWA, 2012). Dentre esses diferentes tipos de neurônios encontram-se as células ganglionares cujos axônios formam o nervo óptico, que faz parte do sistema nervoso central (GUYTON e HALL, 1996). Quando estímulos luminosos incidem nesta camada, são desencadeadas cascatas de sinais químicos e elétricos, gerando impulsos nervosos que são levados pelo nervo óptico ao cérebro para o processamento das imagens. Anatomicamente, a retina pode ser dividida em três níveis principais, que correspondem à sua atividade elétrica (SATO, 2002). O terço externo, que é limitado pela membrana limitante externa e pela camada plexiforme, sítio anatômico de conexão entre fotorreceptores (cones, bastonetes e seus axônios) e o epitélio pigmentado da retina (EPR) (SATO, 2002). Os cones são responsáveis pelo reconhecimento das cores e resolução dos objetos enquanto os bastonetes permitem a percepção de luminosidade, vultos e movimentos. As principais funções do EPR são proteger, nutrir e sustentar os fotorreceptores. O terço médio, que é limitado pela camada plexiforme externa e interna, é composto por corpos celulares da camada nuclear interna e suas intrincadas organizações sinápticas (SATO, 2002). Essas células são as bipolares, horizontais, células de Müller e amácrimas. Essas últimas estabelecem contato com as células ganglionares. Somente uma categoria de células é encontrada no terço interno que está entre a camada plexiforme interna e a membrana limitante interna: as células ganglionares (SATO, 2002).

FIGURA 2 – PRINCIPAIS CAMADAS E CÉLULAS DA RETINA HUMANA.

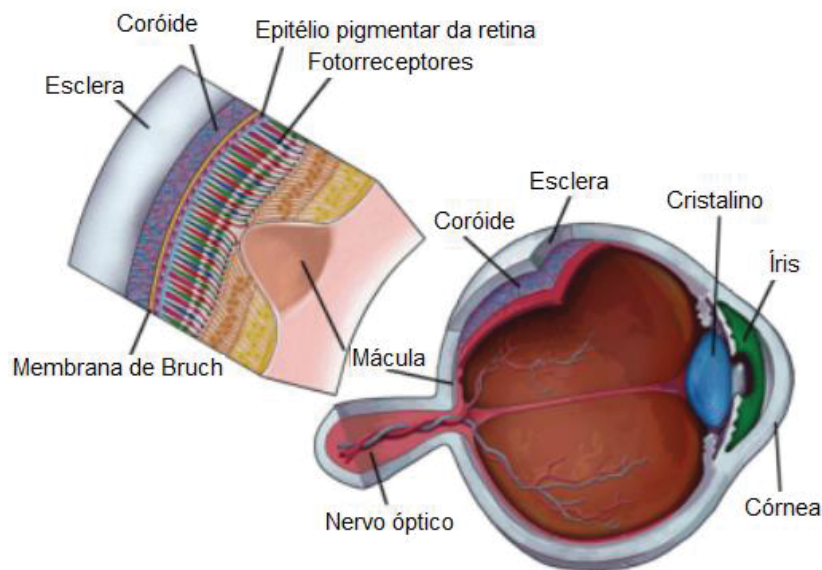


FONTE: Modificado de Molday e Zhang (2010).

NOTAS: Traduzido para o português pela autora.

A maior densidade de fotorreceptores é encontrada em uma região pigmentada central da retina denominada mácula (MOLDAY e ZHANG, 2010). Essa região apresenta propriedades fisiológicas e anatômicas distintas do restante da retina. Formada pela fóvea, parafóvea e perifóvea, a mácula é rica em cones, estrutura anatômica que proporciona a maior acuidade visual e a visão de alta resolução (NAG e WADHWA, 2012). No desenvolvimento do olho, os fotorreceptores são derivados do neuroepitélio óptico, mesma origem embrionária do epitélio pigmentado da retina que os sustenta. A irrigação sanguínea dessa região provém do complexo coriocapilar da coróide, que é separada do epitélio pigmentado da retina pela membrana de Bruch (FIGURA 3) (NAG e WADHWA, 2012).

FIGURA 3 - EQUEMA DO OLHO HUMANO MOSTRANDO A LOCALIZAÇÃO DA MÁCULA, E UMA SEÇÃO AMPLIADA MOSTRANDO A ORGANIZAÇÃO DAS CAMADAS DA RETINA.



FONTE: Nag e Wadhwa (2012).

NOTAS: Traduzido para o português pela autora.

2.2 DISTROFIAS MACULARES

As distrofias de retina são doenças raras, com etiologia genética, que causam perda visual lenta e progressiva. Distrofias maculares são distrofias retinianas que afetam predominantemente a área macular ao passo que a degeneração hereditária do epitélio pigmentado da retina (DHEPR), também constitui um tipo importante de distrofias retinianas, tendo como exemplo mais comum a retinose pigmentar, que afetam primariamente o epitélio pigmentado da retina (EPR) (CAVENDER, 1990).

Distrofias maculares são degenerações progressivas da retina e ou coróide, afetando predominantemente a área macular. Estas alterações tornam-se manifestas na infância como um distúrbio determinado geneticamente. Isto ocorre em forma de base displásica, em que células normais ou tecidos gradualmente se deterioram e morrem prematuramente. As distrofias maculares são caracterizadas pelo seguinte elenco: 1) alterações predominantemente no pólo

posterior; 2) de caráter familiar, bilaterais e freqüentemente de envolvimento simétrico; 3) a distrofia vem associada com diminuição da acuidade visual; 4) tem início em idade precoce; 5) progressão lenta e 6) geralmente sem alterações físicas gerais ou anormalidades laboratoriais (CAVENDER, 1990).

Pessoas com lesões nessa região apresentam redução na acuidade visual que pode ser grave o suficiente para levar à cegueira (MELLOUGH, STEEL e LAKO, 2009). Essas alterações são raras, geralmente tornam-se sintomáticas nas duas primeiras décadas de vida e prejudicam muito a qualidade de vida de seus portadores. As principais distrofias maculares descritas são: doença de Stargardt, *fundus flavimaculatus*, distrofia de cones, distrofia macular viteliforme de Best, distrofia padrão, retinosquise ligada ao sexo, distrofia macular de Sorsby e distrofia macular da Carolina do Norte (MELLOUGH, STEEL e LAKO, 2009). O diagnóstico diferencial é feito através do exame oftalmológico completo, que inclui os testes e acuidade visual e exame de fundo de olho, com o auxílio de exames complementares como os testes eletrofisiológicos (eletro-oculograma, eletrorretinograma de campo total, eletrorretinograma multifocal), teste de cores (D-15 Farnsworth), campo visual, retinografia, angiofluoresceinografia, ecografia e tomografia de coerência óptica (OCT).

A degeneração da retina pode decorrer da disfunção e degradação dos fotorreceptores, do EPR ou de ambos, podendo levar à atrofia coriocapilar e a perda da retina neurosensorial (MARC et al., 2003; MELLOUGH, STEEL e LAKO, 2009). Assim como as demais distrofias de retina, as distrofias maculares possuem considerável heterogeneidade fenotípica e genética, podendo apresentar padrões de herança autossômico dominante, autossômico recessivo ou recessivo ligado ao X (MICHAELIDES, HUNT e MOORE, 2003; LIUTKEVICIENE et al., 2012). Além disso, maioria destas doenças é rara e pouco caracterizada, o que torna a classificação baseada apenas nas características fenotípicas insatisfatória (MICHAELIDES, HUNT e MOORE, 2003). Acredita-se que uma classificação baseada na patologia molecular seria mais adequada (MICHAELIDES, HUNT e MOORE, 2003). O interesse da comunidade científica nas distrofias retinianas e o surgimento das plataformas de sequenciamento altamente paralelizado permitiram um recente crescimento no conhecimento das variações genéticas causadoras de muitas destas doenças (MELLOUGH, STEEL e LAKO, 2009; ELLINGFORD et al., 2016). Até o

presente momento, são conhecidas mais de 400 mutações causadoras ou potencialmente causadoras de distrofias retinianas (ELLINGFORD et al., 2016). Sete genes associados com algumas distrofias maculares não sindrômicas foram identificados: *ABCA4* (OMIM 601691), *ELOVL4* (OMIM 605512), *PROML1* (OMIM 604365), *VMD2* (OMIM 607854), *peripherin/RDS* (OMIM 179605), *TIMP3* (OMIM 188826) e *XLRS* (OMIM 312700) (LIUTKEVICIENE et al., 2012). Essas descobertas permitiram avanços nos estudos relacionados à patogênese dessas doenças, porém, até o momento, não há cura para elas e os tratamentos, quando existentes, são paliativos (MELLOUGH, STEEL e LAKO, 2009).

Terapias potenciais para o tratamento de distrofias retinianas vem sendo estudadas e trazem resultados promissores. Alguns exemplos são a capacidade de gerar, purificar e transplantar (em ratos) fotorreceptores derivados de células tronco induzidas humanas (LAMBA et al., 2010) e o uso de células tronco embrionárias humanas para atrasar a degeneração retiniana e restaurar parcialmente a visão em ratos (SHAO, ZHOU e PENG, 2017). Além disso, os avanços na terapia gênica das últimas décadas somados às características fisiológicas e anatômicas do olho permitiram o desenvolvimento de uma série de estudos, muitos deles em fase de ensaio clínico (SENGILLO et al., 2017). Outra possibilidade em estudo é o transplante de células do EPR, que podem ser obtidas de diferentes fontes (autólogas ou alogênicas) ou substituídas por células epiteliais pigmentadas da íris (ALEXANDER et al., 2015). Apesar destes avanços, o remodelamento da retina neurosensorial que ocorre como consequência das degenerações retinianas pode impedir que terapias celulares ou gênicas sejam efetivas (JONES et al., 2003; MELLOUGH, STEEL e LAKO, 2009; JONES et al., 2012). Assim sendo, mesmo que futuras terapias com células tronco induzidas obtenham bons resultados, o diagnóstico precoce é fundamental para que a degeneração tecidual não chegue a níveis irreversíveis.

2.3 ESTRUTURA DO FOLÍCULO CAPILAR E ALOPECIAS CONGÊNITAS

Os pêlos são estruturas delgadas e queratinizadas que se desenvolvem a partir de uma invaginação da epiderme, denominada folículo piloso (JUNQUEIRA e

CARNEIRO, 2004). Os folículos pilosos variam consideravelmente em tamanho e forma dependendo de sua localização, mas partilham da mesma estrutura básica (PAUS e COTSARELIS, 1999). De forma geral, os folículos pilosos em fase de crescimento apresentam uma dilatação terminal denominada bulbo piloso, em cujo centro se observa uma papila dérmica. As células da matriz que recobrem a papila dérmica formam a raiz do pêlo (JUNQUEIRA e CARNEIRO, 2004). A raiz do pêlo dá origem à haste do pêlo, que é dividida em três camadas: medula (interna), córtex (intermediária) e cutícula (externa). As células mais externas da raiz dão origem à bainha radicular interna e externa que envolvem o eixo do pelo na sua porção inicial (JUNQUEIRA e CARNEIRO, 2004). Na bainha radicular externa existe uma zona chamada bulge que contém uma variedade de células bioquimicamente distintas, inclusive células tronco, que participam da regeneração do folículo e da epiderme (PAUS e COTSARELIS, 1999; SHIMOMURA e CHRISTIANO, 2010).

Além de sua função biológica de proteção e dispersão de produtos das glândulas sudoríparas (ex. feromônios), nos humanos os cabelos têm grande importância psicossocial (PAUS e COTSARELIS, 1999; HUNT e MCHALE, 2005). Em condições saudáveis, os cabelos crescem numa velocidade que varia de 0,6mm a 1,2cm por mês, enquanto 50 a 150 fios são perdidos por dia. Ao mesmo tempo que um fio cai, outro começa a crescer no mesmo folículo. O ciclo de crescimento dos cabelos ocorre em três fases: anágena (fase de crescimento, dura de 2 a 8 anos), catágena (fase de regressão, dura alguns dias ou semanas) e telógena (fase de repouso, dura em torno de 3 meses) (PAUS e COTSARELIS, 1999; SEMALTY et al., 2011).

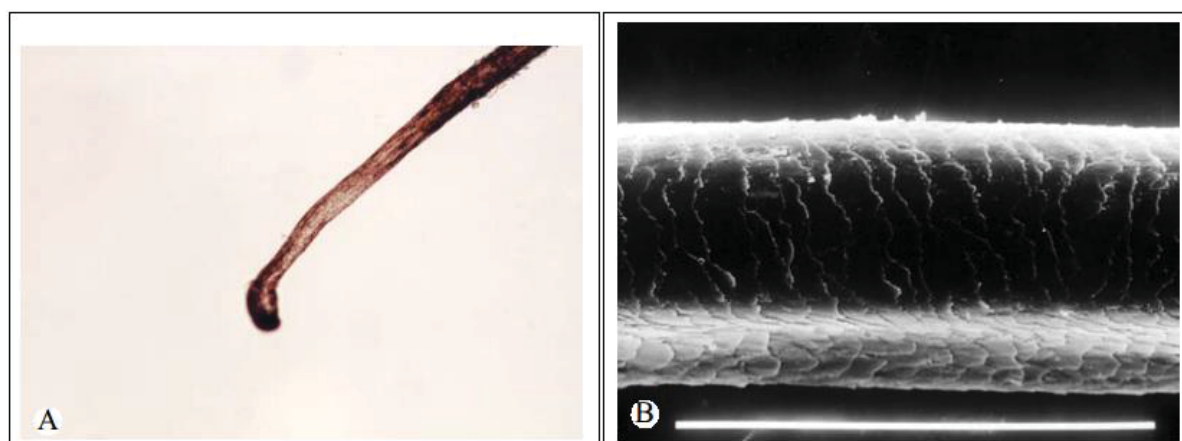
Alopecia é redução total ou parcial de pêlos ou cabelos. Ela pode ocorrer de forma localizada ou difusa e pode ser temporária ou permanente. Existem pelo menos 50 tipos de alopecias congênitas, que podem ser subdivididas em duas classes principais: as alopecias sindrômicas, nas quais a alopecia aparece como uma parte de uma síndrome mais ampla, e as alopecias não-sindrômicas, que apresentam apenas o fenótipo dos cabelos (SHIMOMURA, 2012). Muitos genes conhecidos são expressos no folículo capilar e mutações em alguns deles foram associadas com alopecias congênitas em humanos (SHIMOMURA e CHRISTIANO, 2010). Uma variedade de moléculas envolvidas na patogênese dessas doenças já são conhecidas. Shimomura (2012) divide as alopecias congênitas em grupos de

acordo com seu mecanismo molecular de patogênese. Dentre esses mecanismos estão mutações em genes que codificam as queratinas, moléculas de adesão celular, fatores de transcrição e proteínas envolvidas em vias de sinalização (SHIMOMURA, 2012).

2.4 SÍNDROME DOS CABELOS ANÁGENOS FROUXOS (SCAF)

Descrita pela primeira vez por Nödl em 1986 na Alemanha (Nödl citado por (PRICE e GUMMER, 1989)), a SCAF (OMIM 600628) é uma alopecia não-cicatricial na qual os cabelos apresentam problemas de ancoragem na fase anágena (DHURAT e DESHPANDE, 2010). A síndrome é caracterizada pela presença de fios de cabelo esparsos no couro cabeludo, com crescimento anômalo e sem necessidade de cortes frequentes (SATO, BRENNER et al., 2004). Na SCAF, os cabelos são facilmente arrancados do couro cabeludo sem dor e sem quebra dos mesmos. No tricograma¹, mais de 50% dos fios encontram-se na fase anágena enquanto na microscopia observa-se a ausência das bainha radicular interna e externa (DHURAT e DESHPANDE, 2010). Na análise através de microscopia óptica (MO, FIGURA 4A) e microscopia eletrônica de varredura (MEV, FIGURA 4B) os fios de cabelo apresentam ausência das células cuticulares na parte proximal, o córtex se encontra torcido e distorcido, a haste contém depressões canaliculares e o fio de cabelo se apresenta intacto, sem fraturas (SATO, 2002).

FIGURA 4 – IMAGENS DE MICROSCOPIA ÓPTICA E MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA DOS FIOS DE CABELO DE PACIENTES COM SCAF. (A) MO de fio de cabelo com ausência de bainha radicular interna e externa e enrugamento da cutícula na porção proximal do bulbo. (B) MEV do fio de cabelo com formação canalicular.



FONTE: Sato *et al.* (2004a)

¹ Exame no qual 50 a 100 fios de cabelo são arrancados do couro cabeludo e examinados em um microscópio, permitindo a classificação dos tipos e das fases de crescimento dos cabelos e sua contagem diferencial.

A SCAF geralmente se manifesta na infância, diagnosticada com maior frequência no sexo feminino, provavelmente subdiagnosticada em meninos por causa dos cortes de cabelo mais curtos, e na maioria dos casos os cabelos são louros ou louro-escuros, embora também possa ser observada em cabelos escuros (ABDEL-RAOUF et al., 2009; DHURAT e DESHPANDE, 2010; PHAM e KREJCI-MANWARING, 2010). A SCAF pode ser esporádica ou apresentar herança autossômica dominante com expressividade variável (CANTATORE-FRANCIS e ORLOW, 2009). Chapalain e colaboradores (2002) detectaram uma mutação no gene *K6HF*, que codifica citoqueratinas expressas no folículo capilar, em 3 de 9 famílias estudadas, porém não se sabe se essa alteração causa a doença ou se teria apenas um papel modificador em sua patogênese. Eles sugerem que outras queratinas possam estar envolvidas na patogênese da SCAF (CHAPALAIN et al., 2002). Em 2001, Porter e colaboradores caracterizaram uma nova queratina do tipo II em humanos e camundongos, a K6irs (KRT72, OMIM 608246). Por ser expressa exclusivamente na bainha radicular interna do folículo capilar, estes autores sugeriram que ela possa estar envolvida na patogênese da SCAF (PORTER et al., 2001). Apesar dessa descoberta não ser muito recente, nenhum estudo molecular sobre o envolvimento dessa proteína em pacientes com SCAF foi encontrado na literatura até a presente data.

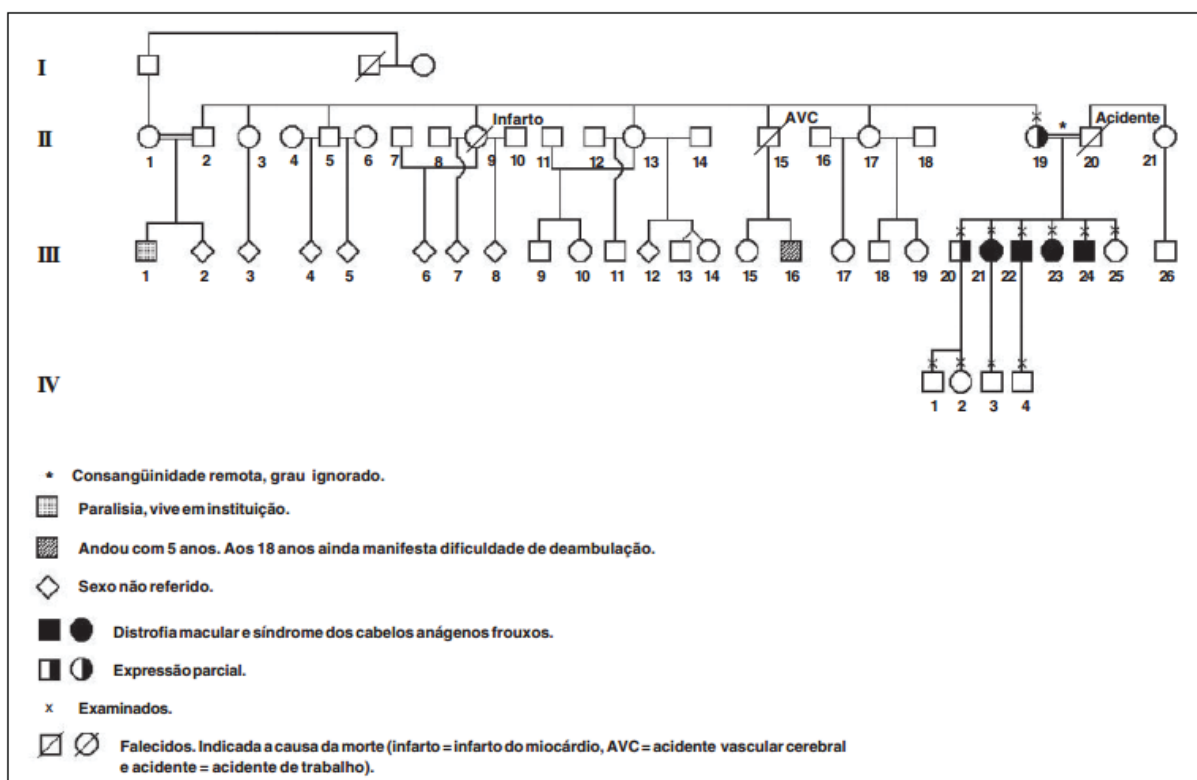
2.5 DISTROFIA RETINIANA COM ONDA RÁPIDA ESCOTÓPICA ASSOCIADA À SÍNDROME DOS CABELOS ANÁGENOS FROUXOS (DRORE-SCAF)

Em 2002, Sato e colaboradores descreveram uma família que apresentava uma nova distrofia macular associada a uma alopecia já conhecida, cujo nome sugerido foi Distrofia Retiniana com Onda Rápida Escotópica associada à Síndrome dos Cabelos Anágenos Frouxos (SATO, MARZAGÃO e MOREIRA JÚNIOR, 2004). As principais características clínicas são diminuição da visão na idade escolar (7-11 anos) com piora progressiva e relativa estabilização da acuidade visual em torno de 14-18 anos, fotofobia, lacrimejamento, dificuldade de visão noturna (apenas nos homens) e cabelos com fios esparsos na infância, facilmente arrancáveis, sem necessidade de cortes frequentes (SATO et al., 2002). A hipótese inicial foi de retinite pigmentosa inversa associada à hipotricose congênita. O diagnóstico foi feito

através da avaliação oftalmológica completa, teste de cores, ecografia, angiografia fluoresceínica, campo visual, topografia de papila, eletro-oculograma (EOG), eletrorretinograma (ERG), testes laboratoriais, exame dermatológico, teste de suor, MO e MEV dos fios de cabelo. A principal peculiaridade da DRORE consiste no traçado eletrorretinográfico característico com tempo de culminação diminuído (rápido) na fase escotópica (achado exclusivo desta patologia), sugerindo que a alteração dessa distrofia se encontra em nível do epitélio pigmentado da retina (SATO, MARZAGÃO e MOREIRA JÚNIOR, 2004).

O heredograma da família pode ser observado na FIGURA 5. Dos 6 irmãos, 4 apresentam DRORE e SCAF. As duas irmãs afetadas apresentaram adicionalmente coloboma macular, posteriormente caracterizado como estafiloma pelo Dr. Naoye Shiokawa, devido a esta alteração ser provavelmente congênita, mantivemos a nomenclatura coloboma/estafiloma macular. A mãe e o irmão mais velho apresentam características de SCAF sem alteração ocular. O pai era normal, existindo possível parentesco de grau desconhecido entre os pais. Tais indícios sugerem se tratar de uma herança autossômica recessiva e com expressividade variável, e os indivíduos que apresentam sintomas mais leves possivelmente são heterozigotos (SATO et al., 2002).

FIGURA 5 – HEREDOGRAMA DA FAMÍLIA DIAGNOSTICADA COM DRORE-SCAF



FONTE: Sato et al. (2002)

Foi proposto que esta doença fosse classificada como displasia ectodérmica do grupo B. Segundo a classificação de Freire-Maia² (1971, 1977 citado por (PAGNAN e VISINONI, 2014)) esse grupo abrange as afecções com defeitos em apenas uma dentre estas quatro estruturas - pelos, dentes, unhas e glândulas sudoríparas - e, pelo menos, um outro defeito de origem ectodérmica. Neste caso, o envolvimento dos cabelos e da retina se encaixa bem na classificação proposta.

2.6 CASUÍSTICA DAS DISTROFIAS MACULARES ASSOCIADAS A ALOPECIAS

Apesar de distrofias maculares associadas a alopecias serem condições raras, existem diversos casos relatados na literatura. Na TABELA 1 são apresentadas as principais características destas doenças. A herança autossômica recessiva é relatada predominantemente, existindo casos de herança autossômica dominante, heterozigotos compostos e herança independente. A maioria dos casos foram diagnosticados em países do Oriente Médio, da Ásia Meridional e da Europa.

² FREIRE-MAIA, N. **Ectodermal dysplasias revisited**. Acta Genet Med Gemellol (Roma), v. 26, n. 2, p 121-31, 1977.

FREIRE-MAIA, N. **Ectodermal dysplasias**. Hum Hered, v. 21, n. 4, p. 309-12, 1971.

A consanguinidade está presente em aproximadamente metade dos casos estudados e existe bastante variação fenotípica entre as famílias e dentro delas.

Do ponto de vista clínico, nenhum dos casos apresentados na TABELA 1 é idêntico à DRORE-SCAF. Existem dois casos de coloboma associados à SCAF, porém em nenhum deles há relato de distrofia macular. Um dos casos é uma menina que apresenta colobomas na íris e na coróide associados a outras má formações congênitas (HANSEN, BRANDRUP e CLEMMENSEN, 2004). O outro caso é de 2 irmãos que apresentaram coloboma na mácula e no disco óptico sem outras má formações congênitas (MURPHY, MCGINNITY e ALLEN, 1995). Este último caso parece ser semelhante aos achados nas pacientes mulheres de DRORE associada a SCAF, porém os irmãos não apresentaram distrofia macular.

No Brasil, além da DRORE-SCAF, foram publicados três relatos de caso de distrofias maculares associadas a alopecias. Cecatto-de-Lima et al. (1988) descreveram dois irmãos, filhos de primos de primeiro grau, que apresentavam oculotricodisplasia, uma displasia ectodérmica que afeta cabelos, unhas, dentes e retina (CECATTO-DE-LIMA, PINHEIRO e FREIRE-MAIA, 1988). Balarin Silva et al. (1999) descreveram uma família que apresentava dois irmãos com Displasia Ectodérmica, Ectrodactilia e Distrofia Macular, um irmão com sindactilia e um primo de primeiro grau com ectrodactilia. Em 2013, Frainer et al. descreveram uma paciente que apresentava distrofia macular de Stargardt e hipotricose congênita. Ela pertencia a uma família de sete irmãos, sendo que um deles apresentava o mesmo fenótipo (FRAINER et al., 2013). Além desses casos publicados, mais duas famílias não relacionadas foram recentemente diagnosticadas com distrofia macular associada à alopecia, uma de Curitiba/PR e uma de Otacílio Costa/SC diagnosticadas pelos Drs. Mario Teruo Sato e Naoye Shiokawa (artigo submetido).

TABELA 1 - DISTROFIAS MACULARES ASSOCIADAS A ALOPECIAS DESCRITAS NA LITERATURA E SUAS PRINCIPAIS CARACTERÍSTICAS

continua						
Diagnóstico clínico	Afetados	Outras alterações	Herança	Origem	Consaguinidade	Referência
Degeneração tapetoretinal e alopecia	2	.	.	Hungria	Não	LUDVIG (1965) ³ citado por (BJORK e JAHNBERG, 1975)
Degeneração macular hereditária com alopecia congênita	8 (apenas 2 com alopecia)	Coarctação da aorta; nistagmo; estrabismo	AD	Irlanda do Norte	Não mencionada	(JOHNSTON,DARRAGH e NEVIN, 1973)
Distrofia retiniana combinada com alopecia	2	.	Não mencionada	Suécia	Não	(BJORK e JAHNBERG, 1975)
Degeneração macular, alopecia areata e retardo de crescimento	1	Paciente baixo. Hepatite, herpes zoster. Tia paterna com alopecia.	Não mencionada	Alemanha	Não mencionada	(KUSTER,MAJEWSKI e HAMMERSTEIN, 1987)
Oculotricodisplasia (retinose pigmentar, hipotricose e alterações estruturais) [OMIM 257960]	2	Anomalias dentárias e onichodisplasia; lábio leporino	AR	Brasileira com ancestralidade portuguesa e indiana	Sim	(CECATTO-DE-LIMA,PINHEIRO e FREIRE-MAIA, 1988)
Degeneração macular (Stargardt) com hipotricose hereditária do tipo Marie-Unna	1	Não mencionadas no resumo	Independente (AR + AD)	Reino Unido	Não mencionada no resumo	(MARREN et al., 1992)
SCAF associada a colobomas ^a	2	Não	AR	Reino Unido	Não mencionada no resumo	(MURPHY,MCGINNITY e ALLEN, 1995)
	1	Características dismórficas	Não mencionada	Dinamarca	Não	(HANSEN,BRANDRUP e CLEMMENSEN, 2004)
Distrofia macular ligada à alopecia universalis autossômica recessiva	3	.	AR	Austrália	Não, porém os avós vêm de uma mesma cidade pequena	(DA CRUZ e MCALLISTER, 2001)
DRORE associada à SCAF	4 (+2 SCAF)	Não	AR	Brasil (Curitiba)	Remota	(SATO et al., 2002)
Distrofia macular (Stargardt) e hipotricose congênita	2	Não mencionadas	AR	Brasil (Porto Alegre)	Não mencionada	(FRAINER et al., 2013)

³ LUDVIG, I. **Tapetoretinale Degeneration mit Totaler Alopezie bei geschwistern.** Oest Ophthal Ges, 8th Ann Meeting, p.63-69.1963.

TABELA 1 - DISTROFIAS MACULARES ASSOCIADAS A ALOPECIAS DESCRITAS NA LITERATURA E SUAS PRINCIPAIS CARACTERÍSTICAS

Diagnóstico clínico	Afetados	Outras alterações	Herança	Origem	Consaguinidade	continuação
						Referência
EEM [OMIM 225280]	2	Malformações dos membros	AR	Dinamarca	Sim	ALBRECTSEN e SVENDSEN (1956) ⁴ citado por (OHDO,HIRAYAMA e TERAWAKI, 1983; KJAER et al., 2005)
	5	Malformações das extremidades e anodontia parcial	AR	Ilha isolada do Japão	Sim (endogamia)	(OHDO,HIRAYAMA e TERAWAKI, 1983)
	1	Anodontia parcial, dentes pequenos, ectrodactilia e sindactilia	AR	Japão	Sim	(HAYAKAWA et al., 1989)
	2	Um irmão com sindactilia e um primo com ectrodactilia	AR ou recessiva ligada ao X	Brasileira com ancestralidade européia e nativa	Não	(BALARIN SILVA,SIMOES e MARQUES-DE-FARIA, 1999)
	2	Não	AR	Judeus Yemenitas	Não	(SENECKY et al., 2001)
	3	Sindactilia	AR	Brasil	Sim	(KJAER et al., 2005)
	3	Malformações dos membros	AR	Turquia	Sim	(YILDIRIM,OGUN e KAMIS, 2006)
	7	Malformações dos membros	AR	Paquistão	Sim	(SHIMOMURA et al., 2008)
HJMD [OMIM 601553]	1	Inflamação do apêndice e das tonsilas.	Não mencionada	Alemanha	Não, mas os pais são do mesmo vilarejo	(KROLL, 1981)
	2	.	AR	Portugal	Não	(SOUIED et al., 1995)
	2	.	AR	Sibéria	Sim	(BECKER et al., 1998)
	1	Rinite alérgica	AR	França	Não	(RAISON-PEYRON et al., 2000)
	11 afetados em 4 famílias	Não	AR	População Druza do norte de Israel	Sim	(SPRECHER et al., 2001)
	4	Não	AR	Árabe Israelense	Sim	(INDELMAN et al., 2002)
	9 afetados em 5 famílias	Fenótipo bem variado, incluindo alterações de pele	AR	Francesa, 2 Turcas e 2 Árabe Israelense	Desconhecida	(INDELMAN et al., 2003)
	2	Não	AR	Árabe Muçulmano	Sim	(INDELMAN et al., 2005)

⁴ ALBRECTSEN, B. e I. B. SVENDSEN. **Hypotrichosis, syndactyly, and retinal degeneration in two siblings.** Acta Derm Venereol, v.36, n.2, p.96-101. 1956.

TABELA 1 - DISTROFIAS MACULARES ASSOCIADAS A ALOPECIAS DESCRITAS NA LITERATURA E SUAS PRINCIPAIS CARACTERÍSTICAS

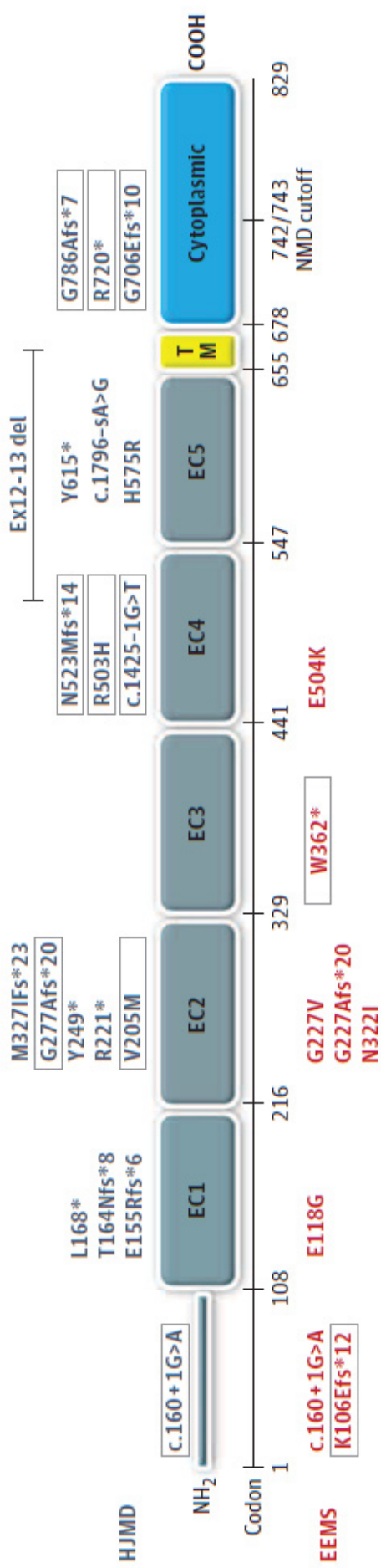
Diagnóstico clínico	Continuação e conclusão						
	Afetados	Outras alterações	Herança	Origem	Consaguinidade	Referência	
	4 em 2 famílias	Sindactilia. Alterações nas unhas e dentes e T1D.	AR	Inglesa e Norte Americana	Não	(INDELMAN et al., 2007)	
	22	.	AR	Paquistão	Sim	(SHIMOMURA et al., 2008)	
	6	Não	AR	Paquistão	Sim	(JELANI, SALMAN CHISHTI e AHMAD, 2009)	
	6	Não	AR	Paquistão	Sim	(KAMRAN-UL-HASSAN NAQVI et al., 2010)	
	7 em 2 famílias	Não	AR	Paquistão	Sim	(SHIMOMURA et al., 2010)	
	2	Não	AR	Inglaterra	Provável	(HALFORD et al., 2012)	
	1	Anemia	AR	Árabe Muçulmano	Sim	(AVITAN-HERSH et al., 2012)	
	HJMD [OMIM 601553]	1	Maculopatia em olho de boi, timpanostomia e adenoidectomia.	AR	EUA	Não mencionada	(MASON e PATEL, 2015)
		4	Infertilidade, crescimento lento do cabelo e das unhas	AR	Arábia Saudita	Sim	(KHAN e BOLZ, 2016)
		8	.	AR	Paquistão	Sim	(AHMAD et al., 2016)
1		.	AR	Singapura	Não mencionado	(SINGH et al., 2016)	
1		.	AR	Portugal	Sim	(ELFATOIKI et al., 2016)	
15		Nictalopia e captodactilia	AR	Alemanha, Paquistão, Jordânia, Turquia, Portugal, Reino Unido	Em 8 das 10 famílias os pais eram consaguineos	(HULL et al., 2016)	
1		Ceratose folicular	AR	Espanha	Não	(BLANCO-KELLY et al., 2017)	

Abreviaturas: AD (autossômica dominante), AR (autossômica recessiva), DRORE (Distrofia Retiniana com Onda Rápida Escotópica), EEM (Displasia Ectodérmica, Ectrodactilia e Distrofia Macular), HJMD (Distrofia Macular Juvenil associada à Hipotricose), OMIM (*Online Mendelian Inheritance in Man*), SCAF (Síndrome dos Cabelos Anágenos Frouxos). Legenda: ^a Não há menção à distrofia macular.

Das doenças apresentadas na TABELA 1, a Distrofia Macular Juvenil associada à Hipotricose (HJMD, do inglês *Hypotrichosis associated with Juvenile Macular Dystrophy*) é a que apresenta o maior número de casos. Ela e a Displasia Ectodérmica, Ectrodactilia e Distrofia Macular (EEM, do inglês *Ectodermal dysplasia, Ectrodactyly and Macular dystrophy*) são as únicas distrofias maculares associadas a alopecias que tem sua base genética conhecida. Ambas são causadas por mutações no mesmo gene, o *CDH3*, que codifica a p-caderina, molécula de adesão celular (mais detalhes sobre o gene e a proteína serão discutidos no item 3.8). Essas mutações e a região da proteína na qual elas ocorrem estão representadas FIGURA 6.

O padrão de herança da HJMD e da EEM é autossômico recessivo, com alguns casos de heterozigose composta. Basel-Vanagaite *et al.* em 2010 revisaram o espectro de mutações e as anomalias de membros nas duas doenças. Foi observada variação intra e inter-familiar na severidade das anomalias dos membros e uma variação fenotípica contínua entre as duas doenças (BASEL-VANAGAITE *et al.*, 2010). Várias das mutações estão localizadas em posições altamente conservadas da proteína, provavelmente causando alterações em seu funcionamento, principalmente relacionadas a instabilidades em sítios de ligação ao cálcio ou estruturais (BASEL-VANAGAITE *et al.*, 2010). Também pode ser observado que a mesma variante (c.829delG) foi descrita como causadora nas duas doenças (INDELMAN *et al.*, 2003; KJAER *et al.*, 2005). Basel-Vanagaite *et al.* (2010) sugerem que a HJMD e a EEM representem provavelmente um espectro fenotípico contínuo relacionado a mutações no gene *CDH3*, e não duas síndromes distintas como previamente relatado.

FIGURA 6 – REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DA P-CADERINA, INCLUINDO OS DOMÍNIOS PROTEICOS E AS MUTAÇÕES CONHECIDAS. As mutações nos retângulos foram as descritas por Hull et al (2016). Abreviaturas: COOH (grupo carboxil), EC (extracelular), EEMS (Síndrome da Displasia Ectodérmica, Ectrodactilia e Distrofia Macular), HJMD (Distrofia Macular Juvenil associada à Hipotricose), NH2 (grupo amino), NMD (decaimento de mRNAs mediado por mutações sem sentido) e TM (transmembrana).



FONTE: Hull et al. (2016).

2.7 DISTROFIAS MACULARES E ALTERAÇÕES CAPILARES PODEM SER CAUSADAS POR UMA ÚNICA MUTAÇÃO EM UM GENE PLEIOTRÓPICO?

Para discutirmos essa questão, é importante saber que retina e o cabelo são estruturas derivadas da mesma origem embrionária: a neuroectoderme. Levando-se em conta que as duas distrofias maculares associadas a alopecias que tem sua base genética estudada (HJMD e EEM) são causadas por alterações em um mesmo gene (heterogeneidade alélica), que a maioria dessas doenças tem o mesmo padrão de herança e que a retina e o cabelo tem a mesma origem embrionária, acreditamos que essas doenças possam ser causadas por variações em um mesmo gene envolvido no desenvolvimento da retina e do folículo capilar (pleiotropia). Além disso, seguindo a linha de pensamento de Basel-Vanagaite *et al.* (2010), supomos que distrofias maculares associadas a alopecias sejam uma única doença e que a variabilidade fenotípica apresentada seja decorrente do efeito de genes modificadores. Isso nos leva a crer que o gene *CDH3* possa estar envolvido na patogênese das distrofias maculares associadas a alopecias diagnosticadas por nosso grupo.

Apesar de nossa hipótese de trabalho principal ser a do envolvimento direto do gene *CDH3* no desenvolvimento das distrofias maculares associadas a alopecias e de que a variação fenotípica seja decorrente do efeito de genes modificadores, não podemos descartar outras hipóteses plausíveis como:

- a) Dois genes diferentes podem estar causando a distrofia macular e a alopecia de forma independente e a ocorrência simultânea das duas doenças pode ser favorecida pela consanguinidade ou pela endogamia.
- b) Outro gene envolvido no desenvolvimento da retina e do cabelo pode ser o responsável por causar as distrofias maculares associadas a alopecias.
- c) Distrofias maculares associadas a alopecias podem ser doenças multifatoriais.

Para averiguarmos a existência de dados que fornecessem um direcionamento para alguma dessas hipóteses, realizamos uma revisão da literatura buscando encontrar genes que possam estar envolvidos no desenvolvimento e/ou na fisiologia da retina e/ou do cabelo e que, por conseguinte, serão os candidatos

para busca de variações genéticas que possam estar envolvidas na fisiopatologia dessas doenças. Estes genes, sua localização genômica, sua função e as doenças associadas a eles estão listados na TABELA 2. O gene *CDH3* será discutido com mais detalhes no próximo tópico.

TABELA 2 - GENES CANDIDATOS A TEREM ENVOLVIMENTO NA PATOGÊNESE DAS DISTROFIAS MACULARES ASSOCIADAS A ALOPECIAS, SUA LOCALIZAÇÃO GENÔMICA, FUNÇÃO E DOENÇAS RELACIONADAS.

continua

Genes Candidatos	Localização Cromossômica	Função	Doenças relacionadas a alterações nestes genes (OMIM)	Referências
<i>ABCA4 (ATP-binding cassette transporter, retina-specific ou ABCR)</i>	1p22.1	Ciclo da vitamina A e transporte de membrana nos fotorreceptores.	Distrofia de cones e bastonetes 3, fundus flavimaculatus, degeneração macular relacionada a idade, distrofia de retina severa de início precoce, retinose pigmentar 19 e Stargardt 1. (601691)	(SINGH et al., 2006; BURKE e TSANG, 2011; GEMENETZI e LOTERY, 2013)
<i>CDH3(P-cadherin)</i>	16q22.1	Adesão e sinalização celular, desenvolvimento embriológico (membros, cabelo), morfogênese, tumorigênese.	HJMD e EEM. (114021)	(SHIMOYAMA, HIROHASHI et al., 1989; SPRECHER et al., 2001; INDELMAN et al., 2002; KJAER et al., 2005; SHIMOMURA et al., 2008; BASEL-VANAGAITE et al., 2010; HEUBERGER e BIRCHMEIER, 2010; SAMUELOV et al., 2012)
<i>CERKL (Ceramide kinase-like)</i>	2q31.3	Viabilidade de células neuronais e de membranas ricas em esfingolipídeos.	Retinose pigmentar 26. (608381)	(TUSON, MARFANY e GONZALEZ-DUARTE, 2004)
<i>CHX10 (Homeobox10, HOX10 ou VSX2)</i>	14q24.3	Fator de transcrição que atua no desenvolvimento do esqueleto e da retina.	Microftalmia com coloboma 3 e microftalmia isolada 2. (142993)	(FERDA PERCIN et al., 2000; WELLIK e CAPECCHI, 2003; BAR-YOSEF et al., 2004)
<i>CRB1 (crumbs 1, cell polarity complex component)</i>	1q31.3	Morfogênese da retina.	Amaurose congênita de Leber (613835) e retinose pigmentar (600105)	(BUJAKOWSKA et al., 2011)

CTNNB1 (Beta catenin)	3p22.1	Regulação do crescimento e adesão celular, morfogênese do folículo capilar e regulação da diferenciação de células tronco na pele.	Câncer colo-retal, carcinoma hepatocelular, retardo mental, câncer de ovário e pilomatricoma. (116806)	(HUELSKEN et al., 2001; HEUBERGER e BIRCHMEIER, 2010)
GRK1 (Rhodopsin kinase, RHOK, RK)	13q34	Fototransdução.	Doença de Oguchi. (180381)	(BAYLOR e BURNS, 1998)
KRT75 (K6HF)	12q13.13	Formação do cabelo e unhas.	SCAF e pseudofoliculite da barba. (609025)	(CHAPALAIN et al., 2002; WANG et al., 2003)
LRAT (Lecithin retinol acyltransferase)	4q32.1	Ciclo da vitamina A	Amaurose congênita de Leber 14, distrofia de retina severa de início precoce e retinose pigmentar juvenil. (604863)	(THOMPSON et al., 2001; XUE et al., 2004)
MITF (Microphthalmia)	3p14-p13	Fator de transcrição que regula a diferenciação e o desenvolvimento dos melanócitos do epitélio pigmentar da retina.	Síndrome de Tietz, síndrome de Waardenburg Tipo 2 e susceptibilidade a Melanoma. (156845)	(FUSE et al., 1999)
OTX2 (Orthodenticle homeobox 2)	14q22.3	Fator de transcrição que atua no desenvolvimento do cérebro, craniofacial e dos órgãos sensoriais.	Microftalmia, deficiência do hormônio hipofisário e distrofia de retina de início precoce com disfunção da hipófise. (600037)	(HEVER, WILLIAMSON e VAN HEYNINGEN, 2006)
PAX6 (PAIRED BOX GENE 6)	11p13	Fator de transcrição expresso no desenvolvimento do sistema nervoso e dos olhos.	Aniridia, catarata, coloboma, hiperplasia da fóvea, síndrome de Gillespie, ceratite, hipoplasia do nervo óptico, anomalia de Peters e anomalia de disco "morning glory". (607108)	(HEVER, WILLIAMSON e VAN HEYNINGEN, 2006; MATSUSHIMA, HEAVNER e PEVNY, 2011)
POU4F2 (Pou-domain transcription factor BRN3B)	4q31.22	Fator de transcrição envolvido na manutenção dos neurônios do sistema visual na retina.	Aceleração do crescimento tumoral em câncer de mama. (113725)	(WEISHAUPT, KLOCKER e BAHR, 2005; MAO et al., 2008)

<i>RB1(p105-Rb)</i>	13q14.2	Regulação do ciclo celular, manutenção da estrutura da cromatina, regulação da diferenciação celular no sistema nervoso central e na retina e supressão tumoral.	Retinoblastoma, osteosarcoma, câncer de bexiga, câncer de pulmão de células pequenas. (614041)	(UCHIDA, 2012)
<i>RGR (Retinal G protein coupled receptor)</i>	10q23.1	Ciclo da vitamina A	Retinose pigmentar 44. (600342)	(MORIMURA et al., 1999)
<i>RHO (Rhodopsin)</i>	3q22.1	Início da cascata de transdução visual.	Cegueira noturna congênita estacionaria, retinose pigmentar 4 e retinite punctata albescens. (180380)	(PEPE, 2001; MALANSON e LEM, 2009)
<i>RLBP1 (Cellular retinaldehyde-binding protein, CRALBP)</i>	15q26.1	Ciclo da vitamina A	Distrofia de retina de Bothnia, fundus albipunctatus, distrofia de cones e bastonetes de Newfoundland e retinite punctata albescens. (180090)	(SAARI e CRABB, 2005; VAZQUEZ-CHONA, CLARK e LEVINE, 2009; BURSTEDT e GOLOVLEVA, 2010)
<i>RPE65 (Retinal pigment epithelium-specific protein 65kDa)</i>	1p31.3-p31.2	Ciclo da vitamina A e regeneração dos pigmentos visuais	Amaurose congênita de Leber e retinose pigmentar 20. (180069)	(TANG et al., 2011)
<i>SAG (S-antigen, arrestin)</i>	2q37.1	Fototransdução.	Doença de Oguchi e retinose pigmentar 47. (181031)	(YAMAKI et al., 1990; BAYLOR e BURNS, 1998; NAKAZAWA, WADA e TAMAI, 1998)
<i>SOX2 (SRY-BOX 2)</i>	3q26.33	Fator de transcrição envolvido na manutenção da pluripotência das células tronco do sistema nervoso central e no desenvolvimento da retina.	Microftalmia e hipoplasia do nervo óptico com anomalias no sistema nervoso central. (184429)	(HEVER, WILLIAMSON e VAN HEYNINGEN, 2006; MATSUSHIMA, HEAVNER e PEVNY, 2011)
<i>TIMP3 (Tissue inhibitor of metalloproteinase 3)</i>	22q12.3	Inibição de metaloproteases de matriz e da angiogênese, tumorigênese	Distrofia macular de Sorsby e retinose pigmentar. (188826)	(JONES, JOMARY e NEAL, 1994; WEBER et al., 1994)

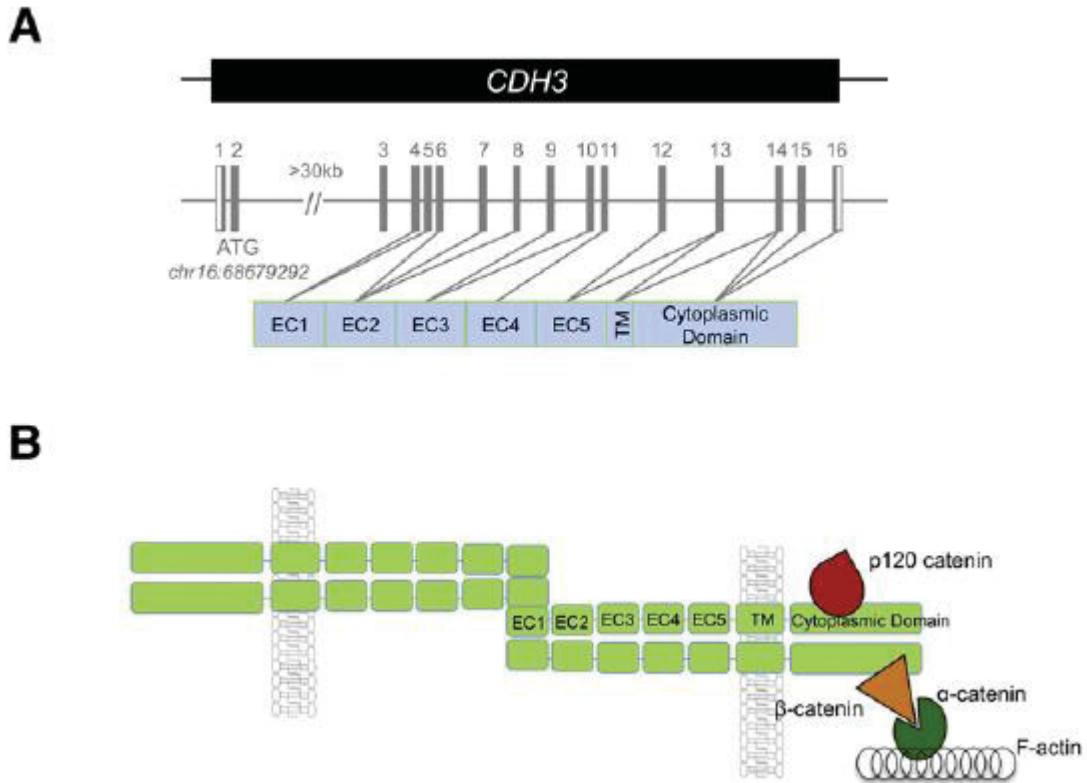
<i>TP63 (Tumor protein p63)</i>	3q28	Fator de transcrição da p-caderina, envolvido no desenvolvimento e manutenção de tecidos.	Síndrome ADULT, síndrome da ectrodactilia, displasia ectodérmica e fissura lábio palatina, síndrome de Hay-Wells, síndrome dos membros-glândulas mamárias, fissura orofacial, síndrome de Rapp-Hodgkin e malformação da mão e do pé fendidos. (603273)	(SHIMOMURA et al., 2008)
<i>WT1 (WT1/EWS fusion gene)</i>	11p13	Fator de transcrição que regula o desenvolvimento do sistema urogenital, mesotelial e o desenvolvimento neuronal da retina.	Tumor de Wilmst, síndrome Denys-Drash, mesotelioma, síndrome nefrótica, síndrome de Frasier e de Meacham. (607102)	(WAGNER et al., 2002)

2.8 O GENE *CDH3* E A P-CADERINA

O gene *CDH3* está localizado no cromossomo 16q22.1, formando um grupo com os genes *CDH1*, *CDH5*, *CDH8* e *CDH11* (KREMMIDIOTIS et al., 1998). Este gene possui 16 éxons (FIGURA 7A) e codifica a P-caderina (caderina-3), molécula de adesão celular dependente de cálcio que pertence a família das caderinas clássicas, que inclui as subclasses P-caderina (placentária), E-caderina (epitelial) e N-caderina (neural) (SHIMOYAMA, YOSHIDA et al., 1989). A P-caderina madura é organizada em três principais domínios estruturais: um grande domínio extracelular composto por cinco repetições de caderinas (EC1-EC5), um domínio transmembrana e um domínio citoplasmático curto (FIGURA 7) (PAREDES et al., 2012). Os domínios EC são conectados por regiões de dobradiça que são sítios de ligação ao Ca^{2+} (CAILLIEZ e LAVERY, 2005). Os domínios EC1 e EC2 são os principais responsáveis pelas propriedades adesivas dessa proteína (formação de dímeros ss) e, diferente das outras caderinas, a P-caderina não depende de Ca^{2+} para essa dimerização, porém ele aumenta sua estabilidade térmica (KUDO et al., 2012). O domínio citoplasmático das caderinas interage com a actina do citoesqueleto através de um complexo de proteínas que inclui a p120-, a β - e a α -catenina (FIGURA 7B) (PAREDES et al., 2012).

Além da função de adesão celular, essa proteína também está envolvida no reconhecimento e sinalização celular, na morfogênese e no desenvolvimento de tumores (SHIMOYAMA, HIROHASHI et al., 1989; HEUBERGER e BIRCHMEIER, 2010; SAMUELOV et al., 2012). Em camundongos, a expressão da P-caderina foi observada durante o desenvolvimento embriológico de diversas estruturas do olho, inclusive da retina (XU, OVERBEEK e RENEKER, 2002). Em humanos, esta proteína foi encontrada no EPR adulto (BURKE et al., 1999) e tem papel fundamental na morfogênese dos folículos capilares e na formação dos membros (SHIMOMURA et al., 2008). Recentemente, foi demonstrado que a P-caderina é necessária para a manutenção da fase anágena do cabelo pela regulação da via de sinalização canônica Wnt (via Wnt/ β -catenina) e pela supressão de TGF β 2 (SAMUELOV et al., 2012).

FIGURA 7 – ESTRUTURA DO GENE *CDH3* E DA P-CADERINA HUMANA. (A) O gene *CDH3* possui 16 éxons. A P-caderina madura é organizada em três principais domínios estruturais: um grande domínio extracelular composto por cinco repetições de caderinas (EC), um domínio transmembrana (TM) e um domínio citoplasmático curto. (B) Esquema representando as interações da P-caderina. O domínio citoplasmático das caderinas interage com a actina do citoesqueleto através de um complexo de proteínas incluindo a p120-, a β - e a α -catenina.



FONTE: Modificado de Paredes *et al.* (2012).

O conhecimento sobre a regulação da expressão gênica do *CDH3* ainda é limitado, porém sabe-se que a p63 e a β -catenina são proteínas que atuam nessa regulação (FARALDO *et al.*, 2007; SHIMOMURA *et al.*, 2008). A β -catenina, além de regular a expressão da P-caderina, é uma molécula essencial na adesão celular mediada por caderinas e tem papel fundamental na via de sinalização canônica Wnt (HEUBERGER e BIRCHMEIER, 2010). Essa via controla processos fundamentais como a proliferação, a sobrevivência, a migração e a diferenciação celular bem como a formação de padrões em células e tecidos (HEUBERGER e BIRCHMEIER, 2010). A via Wnt e as caderinas competem pela β -catenina que, nas células epiteliais, é encontrada ligada ao domínio citoplasmático das caderinas ou livre no citoplasma (SAMUELOV *et al.*, 2012). Em 2012, Samuelov e colaboradores inibiram a expressão da P-caderina de folículos capilares humanos em cultura através de

siRNAs e observaram o mesmo fenótipo capilar observado em pacientes com HJMD. Esses achados permitiram o estabelecimento de uma relação de causa-efeito entre a perda da P-caderina e a supressão da via Wnt que impede a expressão de genes relacionados ao ciclo de crescimento dos cabelos e a sua morfogênese (SAMUELOV et al., 2012).

Diante do exposto, o *CDH3* é o principal gene candidato para o estudo das bases genéticas das distrofias maculares associadas à alopecias. Apesar disto, a heterogeneidade fenotípica dentro das famílias e entre elas indica que mais genes podem estar atuando na patofisiologia da doença, portanto é fundamental investigar o resto do genoma para variações em genes envolvidos na formação dos folículos capilares e da retina. Esta ampla gama de genes candidatos requer uma extensa investigação que, há poucos anos atrás, seria extremamente cara e demorada, mas, com o desenvolvimento da bioinformática e com a redução expressiva de custos das tecnologias de sequenciamento de nova geração, torna-se exequível em um curto período.

3 JUSTIFICATIVA

As distrofias maculares associadas a alopecias são doenças raras, sem cura, que tem um impacto importante na vida dos pacientes, podendo desencadear problemas psicossociais e levar à cegueira. A heterogeneidade das distrofias maculares impede que classificações baseadas em suas características fenotípicas sejam satisfatórias e dificulta seu diagnóstico. Uma classificação baseada na patologia molecular seria mais adequada (MICHAELIDES, HUNT e MOORE, 2003). As distrofias maculares associadas a alopecias diagnosticadas por nosso grupo apresentam supostamente herança autossômica recessiva, porém sua base genética ainda é desconhecida.

Aparentemente essas distrofias não se enquadram nas características da HJMD e da EEM, porém as evidências sugerem que todas estas podem ser causadas por alterações em um só gene. Tendo em vista que a HJMD e a EEM são causadas por alterações no gene *CDH3* e que este é expresso no folículo capilar e na retina, justifica-se a procura de variações desse gene nos pacientes aqui diagnosticados. Além disso, a procura de alterações em outros genes envolvidos no desenvolvimento do cabelo e da retina é de fundamental importância para a compreensão da heterogeneidade dessas doenças. O conhecimento das bases genéticas dessas doenças pode facilitar seu diagnóstico, auxiliar na sua classificação, contribuir para o conhecimento dos mecanismos moleculares envolvidos na fisiopatologia das mesmas e, no futuro, auxiliar no desenvolvimento de um tratamento efetivo. Vale ressaltar que os tratamentos disponíveis são muito mais promissores quando o diagnóstico é precoce.

4 OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GERAL:

Investigar as bases genéticas das distrofias maculares associadas a hipotricoses visando contribuir para a compreensão da fisiopatologia da doença.

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

4.2.1 Buscar por variações no gene *CDH3* que possam estar envolvidas na patogênese das distrofias maculares associadas a hipotricoses.

4.2.2 Procurar variações genéticas em regiões codificadoras de outros genes candidatos (TABELA 2) potencialmente envolvidos na patogênese das distrofias de retina associadas a alopecias através da análise de exomas.

4.2.3 Elaborar uma estratégia para filtrar as variantes obtidas por sequenciamento de exomas potencialmente envolvidas na patogênese das distrofias maculares associadas a hipotricoses.

4.2.4 A partir das variantes encontradas (itens 4.2.1, 4.2.2 e 4.2.3), selecionar as potencialmente patogênicas para validação por sequenciamento tradicional.

4.2.5 Elaborar heredogramas das famílias, verificar se as variantes selecionadas segregam com a doença e confirmar seu padrão de herança.

4.2.6 Testar a hipótese do trabalho anterior de que o padrão de herança da DRORE-SCAF seja autossômico recessivo com expressividade variável.

4.2.7 Analisar os fios de cabelo de pacientes e familiares por microscopia eletrônica de varredura

4.2.8 Desenvolver um folheto informativo que auxilie profissionais no diagnóstico das distrofias maculares associadas a hipotricoses (APÊNDICE 6).

4.2.9 Sugerir uma nova classificação para as distrofias de retina associadas a alopecias.

4.2.10 Escrever um artigo de revisão sobre as hipotricoses associadas à HJMD e EEM

5 MATERIAL E MÉTODOS

5.1 CARACTERIZAÇÃO DA AMOSTRA

Foram inclusas na pesquisa uma família com DRORE-SCAF e duas famílias com distrofias maculares associadas a hipotricoses que serão descritas no Capítulo I. O diagnóstico e a captação de pacientes foram realizados pelo Prof. Dr. Mário Teruo Sato e pelos colaboradores deste projeto no Hospital de Clínicas da UFPR, na Clínica Retina e Vítreo Consultoria ou no Centro Hospitalar de Reabilitação Ana Carolina Moura Xavier.

A avaliação oftalmológica é realizada através dos seguintes exames:

- Acuidade visual sem e com correção
- Motilidade ocular extrínseca
- Motilidade ocular intrínseca
- Fundoscopia
- Tonometria
- Biomicroscopia
- Mapeamento de retina
- Teste de cores
- Ecografia
- Campo visual computadorizado e manual
- Tomografia de coerência óptica
- Angiografia fluoresceínica
- Retinografia
- Eletro-oculograma
- Eletrorretinograma de campo total e multifocal

Para o diagnóstico dos pacientes com queixas capilares foram realizadas as seguintes avaliações:

Avaliação clínica:

- Padrão de distribuição da rarefação

- Presença de fios terminais ou velo
- Teste da tração
- Alterações da haste
- Acometimento de outras áreas pilosas além do couro cabeludo
- Acometimento de unhas
- Acometimento dentário
- Fotografias clínicas padronizadas (vértex, perfil direito, perfil esquerdo, posterior)

Avaliação dermatoscópica:

- Na área afetada e na área controle (não afetada)
- Observação da densidade
- Observação de estruturas especiais (pontos brancos, amarelos, cabelos cadavéricos, etc)
- Tricoscopia (Tricoptilose, tricorrexe nodosa, pili torti, etc)

Avaliação microscópica (microscopia óptica e microscopia eletrônica de varredura dos fios de cabelos):

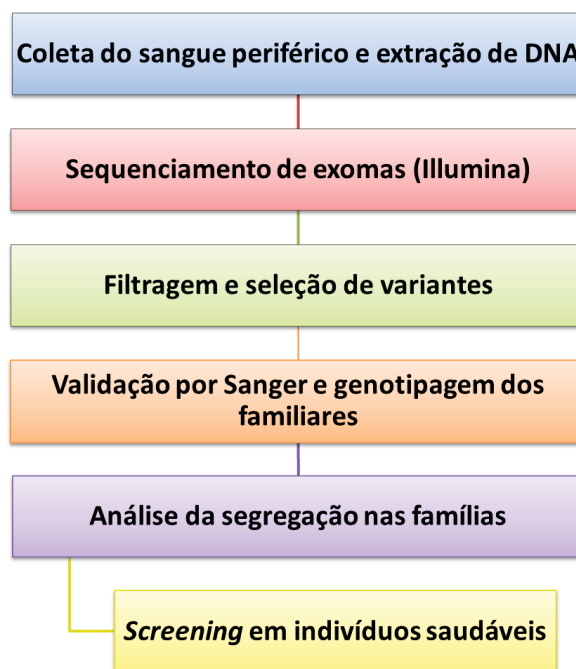
- Cabelos eliminados espontaneamente
- Tricograma: Exame no qual 50 a 100 fios de cabelo são arrancados do couro cabeludo e examinados em um microscópio, permitindo a classificação dos tipos e das fases de crescimento dos cabelos e sua contagem diferencial.
- Biópsia de couro cabeludo

Todas as amostras foram obtidas após a assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido (APÊNDICE 1) aprovado em 23 de julho de 2014 pelo Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos do Hospital de Clínicas/UFPR (Certificado de Apresentação para Apreciação Ética: 24561313.3.0000.0096).

5.2 METODOLOGIA

A FIGURA 8 representa o fluxograma da metodologia utilizada na execução do presente estudo.

FIGURA 8 – FLUXOGRAMA DE APRESENTAÇÃO DA METODOLOGIA PROPOSTA PARA EXECUÇÃO DO PRESENTE PROJETO.



FONTE: A autora (2014).

5.2.1 Coleta do sangue periférico e extração de DNA.

De cada indivíduo foram coletados 10mL de sangue periférico em vacutainer contendo o anticoagulante EDTA. Este sangue foi centrifugado para a separação da camada de células mononucleares, da qual foi extraído o DNA pela técnica de precipitação salina (LAHIRI e NURNBERGER, 1991).

5.2.2 Validação dos resultados pelo sequenciamento do gene *CDH3*

5.2.2.1 Amplificação do gene *CDH3*

O DNA foi amplificado através da Reação em Cadeira da Polimerase (PCR, do Inglês *Polymerase Chain Reaction*) utilizando 30 primers para cobrir toda a região

codificadora e os limites íntron-éxon do gene *CDH3* (TABELA 3). A maioria destes primers foi previamente descrita por Indelman e colaboradores (INDELMAN et al., 2002). Alguns deles foram substituídos por novos primers para otimização da técnica desenhados utilizando o software Primer3 (version 0.4.0) (KORESSAAR e REMM, 2007; UNTERGASSER et al., 2012) e conferidos quanto a sua especificidade e qualidade através dos programas Primer-BLAST (YE et al., 2012) e OligoAnalyzer 3.1 (IDT, 2012). Para a amplificação foi utilizada a Platinum®*Taq* DNA Polimerase (Life Technologies) e as condições da reação foram as recomendadas pelo fabricante.

TABELA 3 – PRIMERS PARA AMPLIFICAÇÃO DO GENE *CDH3*

Éxon(s)	Nome do primer	Sequência (5'→3')
1 e 2	CDH3-JS-EX1,2-F ^a	GGAGTGCCTGGGTGTTCTT
1	CDH3-EX1-R ^b	GAGGGCAGAGAGTGAAGGAG
2	CDH3-EX2-F ^b	CAAGGGAGTCCCGGAAGG
1 e 2	CDH3-JS-EX1,2-R ^a	GAGGAGGGGGTCAAGGTAAG
3	CDH3-EX3-F ^b	GTCAGAGGACTCTTGTCTGCTT
3	CDH3-EX3-R ^b	GCTCCTGGCCAGCAATTT
4	CDH3-EX4-F ^b	AGGTGAGAGGATGTTGAGCA
4	CDH3-EX4-R ^b	AAATCTCATGCAGGCCTTTG
5 e 6	CDH3-EX56-F ^b	GCCCCTCTTCACAGAGGACT
5 e 6	CDH3-EX56-R ^b	TGATACACAGCCAAGGAAATCA
7 e 8	CDH3-JS-EX7,8-F ^b	GTAGACAGGGCTGGAGTTGG
7	CDH3-EX7-R ^b	ACGTGGGTCCTCACTGTTCT
8	CDH3-EX8-F ^b	CAGTGCTTCCTGGAGGTCAG
7 e 8	CDH3-JS-EX7,8-R ^b	GTGCTGAGACTGGCATTGTA
9	CDH3-EX9-F ^b	GTTGGATGGAGGCTTCTCAG
9	CDH3-EX9-R ^b	GACTAGCCACGGTAGACA
10 e 11	CDH3-JS-EX10,11-F ^a	CACATCTCAACTGTCCTGCAC
10	CDH3-EX10-R ^b	GAACAAACGTTGGCCATGAT
11	CDH3-EX11-F ^b	TCTGCCAGTTGGTATGAGGA
10 e 11	CDH3-JS-EX10,11-R ^a	AAAGACCCCTTTGACCGTCT
12	CDH3-EX12-F ^b	AGAGCTGGGCGGTAAACAG
12	CDH3-EX12-R ^b	GTGTGCAGAATCCTGGTGTG
13	CDH3-EX13-F ^b	TGTGGAAGCCGTATTCTCAA
13	CDH3-EX13-R ^b	TGGTGGCCTCTTAGTTCCAG
14 e 15	CDH3-JS-EX14,15-F ^a	GAAGTTGCTGGGGTATTCA
14	CDH3-EX14-R ^b	ACCAGAGAAGTGCTGGAGGA
15	CDH3-EX15-F ^b	TCCCATGAGCCAGAGTATC
14 e 15	CDH3-JS-EX14,15-R ^a	GTCAAAAGCTGGTTGGTGGT
16	CDH3-EX16-F ^b	GAGAGAGGGGCTCACAGAGA
16	CDH3-EX16-R ^b	GGACACAGGGTTGAGCATTT

FORNE: ^aA autora (2013), ^bINDELMANN (2002).

5.2.2.2 Purificação dos produtos de PCR

Os produtos destas amplificações foram purificados pelo método enzimático ou por acetato de amônio e etanol conforme disponibilidade no laboratório. As reações de purificação estão listadas abaixo.

- Purificação pelo método enzimático ExoSAP: utilizando as enzimas Exonuclease I (EXO I) e *Shrimp Alkaline Phosphatase* (SAP) são removidos primers e dNTPs não incorporados nos produtos de PCR. A reação

apresentada na TABELA 4 é incubada a 37°C por 30 minutos, seguida de 15 minutos de incubação a 80°C para inativação enzimática.

TABELA 4 – REAÇÃO DE PURIFICAÇÃO PELO MÉTODO ENZIMÁTICO EXO-SAP

Reagentes	Volume
Tampão de reação SAP 10X	1,0 µl
EXO (1U/µl)	1,0 µl
SAP (10U/µl)	2,0 µl
Produto de PCR	10,0 µl
Total	14,0 µl

- b) Purificação por acetato de amônio e etanol:
- Em um tubo/placa com 20µl de produto de PCR, adicionar 10,8 µl de acetato de amônio (7,5M) e 66,8 µl de etanol absoluto.
 - Homogeneizar.
 - Deixar em repouso por 10 min em temperatura ambiente.
 - Centrifugar por 30 min a 2000g (5000rpm).
 - Flicar gentilmente (spin invertido).
 - Adicionar 40 µl de etanol 70%.
 - Homogeneizar gentilmente.
 - Centrifugar por 30 min a 2000g (5000rpm).
 - Flicar gentilmente (spin invertido).
 - Incubar a 37°C por aproximadamente 10 min (banho maria com a tampa aberta).
 - Ressuspender com 10 µl de H₂O de injeção.
 - Deixar em repouso na geladeira (4°C) por 24h.

5.2.2.3 Reação de sequenciamento para gene *CDH3*

Após a purificação, foi realizada a reação de sequenciamento apresentada na TABELA 5, pelo método de terminação de cadeia (SANGER, NICKLEN e COULSON, 1977) utilizando o kit BigDye 3.1 Terminator (Applied Biosystems) nas condições apresentadas na TABELA 6. Esta reação é seguida de uma etapa de precipitação por meio de acetato de sódio e etanol (absoluto e 70%). Terminada esta última etapa o DNA precipitado é ressuspensionado em 12 µl de Formamida Hi-Di® (Life Technologies), desnaturado a 96°C e submetido a choque térmico em freezer - 80°C. Por fim, os fragmentos foram analisados no seqüenciador automático ABI

Prism 3130[®] (Applied Biosystems) utilizando o polímero POP7 e capilares de 36cm. Os dados obtidos foram coletados pelo programa Data Collection v.3.0 (fornecido pela Applied Biosystems).

TABELA 5 – REAÇÃO DE SEQUENCIAMENTO

Reagentes	Volume
Água (18,2MΩcm)	4,5 µl
Tampão de sequenciamento 5X	1,5 µl
BigDye Terminator	1,0 µl
Primer específico (1,6 pmol)	1,0 µl
Produto de PCR purificado	2,0 µl
Total	10,0 µl

TABELA 6 – CONDIÇÕES DE CICLAGEM PARA A REAÇÃO DE SEQUENCIAMENTO

Etapas	Temperatura	Tempo	Nº de ciclos
Denaturação Inicial	96°C	1'	1
Denaturação	96° C	15"	
Anelamento	54°C	15"	35
Extensão	60°C	2'	
Resfriamento	4°C	∞	∞

5.2.2.4 Análise dos dados

Os eletroferogramas gerados foram visualizados, interpretados e alinhados através do software UGENE, que reúne ferramentas bioinformáticas que permitem todas essas análises.

5.2.3 Sequenciamento de exomas

Foram sequenciados os exomas de 2 pacientes de cada família e um indivíduo saudável (7 indivíduos) utilizando o sistema HiSeq 2000(Illumina). As etapas de controle de qualidade final, sequenciamento de exomas, remoção de *reads* duplicados e detecção de variantes foram terceirizadas pela a empresa MacroGen Inc®.

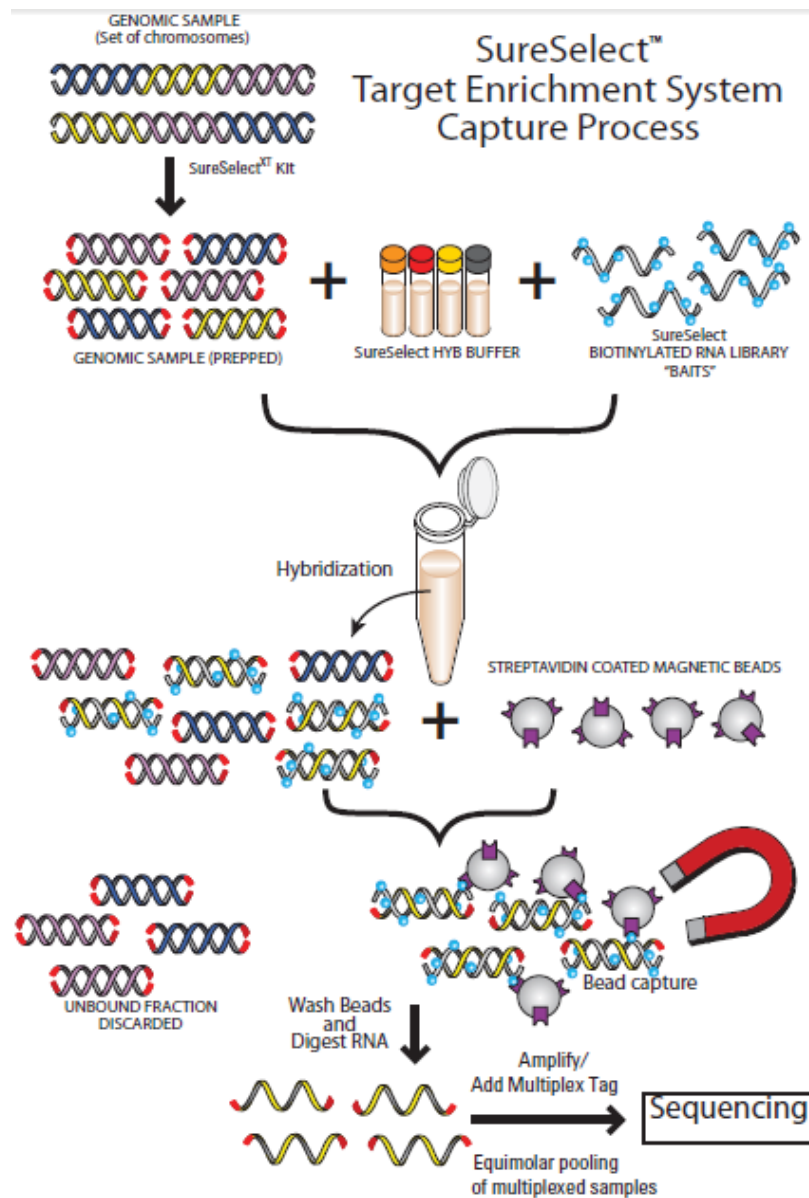
5.2.3.1 Controle de qualidade do DNA

Para que o sequenciamento de nova geração seja eficiente, é necessário que o DNA tenha boa qualidade em termos de quantidade, pureza e integridade. A quantidade total de DNA, verificada pelo método Picogreen (Invitrogen), deve ser superior a 1µg. A pureza, calculada pela razão das absovâncias nos comprimentos de onda 260 e 280 no aparelho NanoDrop (Thermo Fisher Scientific Inc.), deve ser superior a 1,7. Além disso, quando aplicado em gel de agarose 1% (0,5µl de DNA, 30 minutos de corrida a 100V), o DNA deve apresentar uma banda íntegra com tamanho aproximado de 30kb ou superior.

5.2.3.2 SureSelect target enrichment system capture process (Processo de captura dos alvos enriquecidos)

A FIGURA 9 esquematiza o processo de captura dos alvos enriquecidos pela metodologia SureSelect. A preparação das amostras para a captura dos exomas começa na quebra das moléculas de DNA em fragmentos de 150 a 180pb. As pontas são cortadas enzimaticamente para geração de extremidades cegas, que permitirão a ligação dos adaptadores. Os fragmentos são selecionados pelo tamanho de interesse e amplificados, gerando então a biblioteca de DNA genômico. A biblioteca de RNA para a seleção dos éxons (*SureSelect Human All Exon V4*, Agilent, Santa Clara, EUA) marcada com biotina é hibridizada com a biblioteca de DNA genômico. Com a utilização de esferas magnéticas cobertas com estreptavidina, os fragmentos de DNA hibridizados com a biblioteca de RNA são selecionados, lavados para remoção de fragmentos não hibridizados e o RNA é degradado, restando apenas os fragmentos de DNA de interesse.

FIGURA 9 – PROCESSO DE CAPTURA DOS ALVOS ENRIQUECIDOS



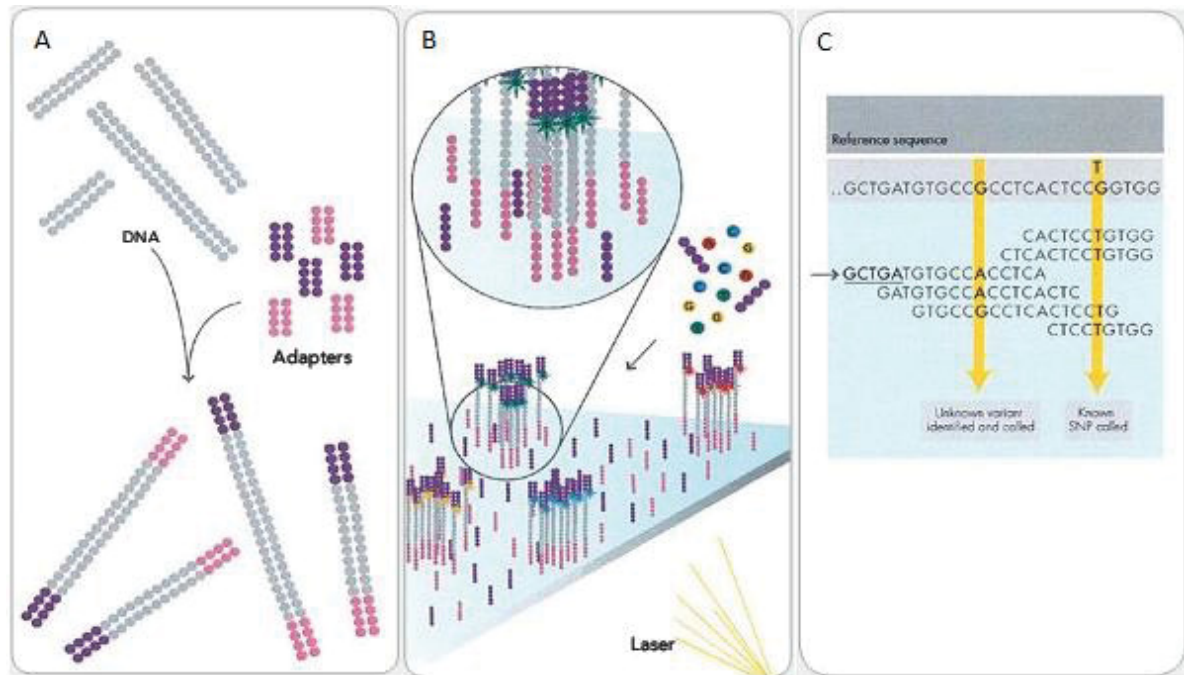
FONTE: Agilent Technologies, Inc. (2012)

5.2.3.2 Sequenciamento de nova geração pela plataforma Illumina HiSeq 2000

Os fragmentos selecionados foram submetidos ao sequenciamento de nova geração pela plataforma *Illumina HiSeq 2000* (Illumina, San Diego, CA, EUA), representado na FIGURA 10. Essa plataforma inicia na ligação de adaptadores aos fragmentos de DNA previamente selecionados. Esses fragmentos são ligados através dos adaptadores na célula de fluxo e posteriormente amplificados (*bridge amplification*). Essa amplificação gera agrupamentos (*clusters*) de amplicons do mesmo fragmento, que servirão para ampliar o sinal no sequenciamento por síntese. A tecnologia de

SBS utiliza os quatro nucleotídeos marcados com fluorescência para sequenciar os milhares de clusters na célula de fluxo em paralelo. Em cada ciclo, um nucleotídeo marcado é adicionado e sua fluorescência detectada. O *software* de coleta de dados gera os *reads*, que são as sequências de cada fragmento. No final do processo são gerados milhares de *reads* que foram alinhados e comparados (mapeadas) com a sequência referência UCSC hg19 (<http://genome.ucsc.edu/>) pelo *software* BWA (LI e DURBIN, 2010). Os *reads* duplicados foram removidos pela ferramenta Picard (<http://broadinstitute.github.io/picard/>).

FIGURA 10 – SEQUENCIAMENTO DE NOVA GERAÇÃO PELA PLATAFORMA ILLUMINA HISEQ 2000. (A) Ligação dos adaptadores aos fragmentos de DNA previamente selecionados e purificados. (B) Incorporação dos nucleotídeos marcados com fluorescência. (C) Alinhamento dos *reads* com a sequência referência.



FONTE: Modificado de Illumina.

5.2.3.3 Detecção e análise de variantes

O resultado final do sequenciamento de nova geração é o dado bruto da sequência obtida no formato FASTQ. A detecção das variantes (SNPs e Indels) foi realizada pelo pacote de programas SAMTOOLS (SAMTOOLS, 2014), utilizando as bases de dados do dbSNP & 1000 Genomes como referência para gerar o arquivo no formato VCF (*variant call format*). As variantes foram anotadas com a ferramenta ANNOVAR (WANG, LI e HAKONARSON, 2010), incluindo frequências alélicas do

Exome Aggregation Consortium (ExAC)(LEK et al., 2016) e predição do efeito das variantes pelas ferramentas SIFT (<http://sift.bii.a-star.edu.sg/>), PolyPhen (<http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/>), MutationTaster (<http://www.mutationtaster.org/>), PhyloP (<http://hgdownload.cse.ucsc.edu/goldenpath/hg19/phyloP100way/>) e SiPhy (http://portals.broadinstitute.org/genome_bio/siphy/).

As variantes obtidas foram filtradas e priorizadas de acordo com a metodologia descrita no Capítulo I. As variantes que passaram todos os critérios de filtragem foram validadas por sequenciamento tradicional.

5.2.4 Análise de segregação das variações nas famílias

Para avaliar se as variações selecionadas estavam segregando com a doença, foram elaboradas genealogias das famílias.

6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados e a discussão desta tese estão descritos na forma de artigo, na língua inglesa, apresentados a seguir, de acordo com o artigo 61 das normas internas do Programa de Pós Graduação em Genética da Universidade Federal do Paraná.

Esta seção da tese foi elaborada e formatada de acordo com as normas das publicações científicas American Journal of Human Genetics (Capítulo I) disponível em: [http://onlinelibrary.wiley.com/journal/10.1002/\(ISSN\)1552-4833/homepage/ForAuthors.html](http://onlinelibrary.wiley.com/journal/10.1002/(ISSN)1552-4833/homepage/ForAuthors.html) e British Journal of Dermatology (Capítulo II) disponível em: [http://onlinelibrary.wiley.com/journal/10.1111/\(ISSN\)1365-2133/homepage/ForAuthors.html](http://onlinelibrary.wiley.com/journal/10.1111/(ISSN)1365-2133/homepage/ForAuthors.html).

6.1 CAPÍTULO I: DEEP CLINICAL INVESTIGATION AND WHOLE EXOME SEQUENCING REVEALS NEW CDH3 VARIANTS IN BRAZILIAN FAMILIES WITH HYPOTRICHOSIS WITH JUVENILE MACULAR DYSTROPHY

Juliana S Schauren,^{1} Ana CMBG Torres,¹ Rodrigo C Almeida,¹ Pablo SC Santos,² Fabiane Mulinari-Brenner,³ Luiz H Lima,⁴ Luiz AZ Filho,⁵ Naoye Shiokawa,⁵ Mario T Sato,⁵ Maria G Bicalho.^{1*}**

¹ Departamento de Genética, Universidade Federal do Paraná - UFPR, Curitiba, Paraná, Caixa Postal 19071, Brazil.

² Institute of Evolutionary Ecology and Conservation Genomics, University of Ulm, Ulm, D-89069, 89081, Germany.

³ Departamento de Clínica Médica, Hospital de Clínicas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, Paraná, CEP 80.060-900, Brazil.

⁴ Departamento de Retina e Vítreo, Universidade Federal de São Paulo, UNIFESP, São Paulo-SP, CEP 04021-001, Brazil.

⁵ Departamento de Oftalmo-Otorrino da Faculdade de Medicina, Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, Paraná, CEP 80060-240, Brazil.

Corresponding Authors: * ligh@ufpr.br ; ** julianaschauren@gmail.com

Abstract

Hypotrichosis with Juvenile Macular Dystrophy (HJMD) is a rare disease that impairs vision and hair growth. Patients typically present short scalp hair since birth and progressive loss of visual acuity. Here we report Hypotrichosis with Juvenile Macular Dystrophy in eight Brazilian patients from three unrelated families. Seven patients underwent complete clinical evaluation. Ophthalmological findings were compatible with macular dystrophy and hair shaft microscopy showed a diversity of alterations. By performing a whole exome sequencing approach followed by sequence-based genotyping, we were able to identify three variations in the p-cadherin locus (*CDH3*), which has been associated with the disease before. The patients of family #1 were homozygous for the c.160+1G>A variant, the patients of family #2 were heterozygous for this same variation and for c.G1063T:p.D355Y and the patients of family #3 were homozygous for c.1795+1G>C. All nucleotide changes are predicted to encode truncated gene products, while two of which (c.G1063T:p.D355Y and c.1795+1G>C) are being described for the first time. Our findings shed light onto the etiology of HJMD and emphasize *CDH3* mutations as an important diagnostic criteria for this complex condition. To our knowledge, this is the first report in Latin America whose clinical findings combined with molecular data enabled us to confirm HJMD.

Key Words: *CDH3*, HJMD, hypotrichosis, macular dystrophy, P-cadherin

Introduction

Hypotrichosis associated with Juvenile Macular Dystrophy (HJMD [MIM: 601553]) is a rare disease with onset in the first decades of life. This condition is characterized by thin and sparse scalp hair and progressive retinal degeneration with central visual loss, bilateral and general symmetric atrophy of the macula and the underlying retinal pigment epithelium (RPE).^{1;2} This disorder is caused by mutations in *CDH3* gene (MIM: 114021), which is located on chromosome 16q22.1, in a cluster harbouring paralogue loci such as *CDH1*, *CDH5*, *CDH8* and *CDH11*.³ *CDH3* has sixteen exons and codes for p-cadherin (cadherin-3), a calcium dependent cell adhesion glycoprotein.⁴ P-cadherin has three structural domains: a large ectodomain with five extracellular cadherin domains (EC1-EC5), a transmembrane domain and a short cytoplasmic domain.⁵ Besides of HJMD, also Ectodermal dysplasia, Ectrodactyly and Macular dystrophy (EEM [MIM: 225280]) can be caused by mutations in the *CDH3* gene, with additional abnormalities in the limbs and, sometimes, in the teeth. HJMD and EEM may be classified as *CDH3*-related diseases as they have a phenotypic continuum and identical mutations can cause both diseases.^{2;6}

Approximately 100 cases of HJMD have been published to date (Tab S1). Although none has been reported so far in Latin America, four different cases of macular dystrophy associated with alopecia were already reported in Brazil, including one family with EEM (Tab S1).⁷⁻¹⁰ Due to the phenotypic variation among these four cases, they were reported as distinct diseases. One of these cases involved a family studied by our group (Family #1) with clinical diagnose of macular dystrophy associated with the Loose Anagen Hair Syndrome (LAHS [MIM: 600628]).⁹ In the last 10 years, two other families with macular dystrophy and alopecia were identified and referred to our ophthalmology department for evaluation (named families #2 and #3

hereafter). It's noteworthy that all three families had relatives with intermediary phenotypes, which is uncommon in previous HJMD cases (Tab S1). Despite of the latter, and although LAHS have never been described in HJMD patients, we suspect that such cases could be HJMD based in patient's clinical findings.

In order to confirm or discharge HJMD diagnosis and to unravel the disease genetic basis in the three families, we performed a deep clinical and genetic investigation among patients and controls diagnosed by our group. First, in order to identify variants likely associated with patients phenotypes, we performed whole exome sequencing (WES) in seven individuals. Further, for an in-depth investigation of selected loci, we used sequence-based genotyping in each participant. Our approach confirmed the HJMD diagnosis for the families studied, thus improving the understanding of HJMD etiology and reinforcing *CDH3* gene sequencing for molecular diagnosis of this disease.

Subjects and Methods

Subjects and clinical assessment

The three families assessed here will be referred to as family #1(12 subjects), family #2 (7 subjects) and family #3 (5 subjects). All 24 subjects were born and live currently in the Southern region of Brazil. Family #1 is from Paranaguá city and family #2 is from Curitiba and has maternal relatives in Paranaguá city, both in the state of Paraná. Family #3 is from Otacilio Costa, in the state of Santa Catarina. The families are reportedly unaware of any possibility of kinship among them. Medical history was obtained from each family and the clinical features are presented in Table 1. All subjects (8 patients and 17 controls) underwent standard ophthalmic evaluation. Seven patients were additionally submitted to retinography, colour vision testing, full field and multifocal electroretinography (ERG), electrooculogram (EOG) and optical coherence tomography (OCT). The patient left out was unavailable for complete examination. Standardized clinical photographs (vertex, right profile, left profile and posterior) were taken from all subjects for dermatological assessment. Spontaneously shed hairs were collected and submitted to microscopic analysis and scanning electron microscopy (SEM). Patients from families #1 and #2 underwent complete dermatological examination including scalp dermoscopy, starch-iodine test, gentle traction test, trichogram and optical microscopy (OM). The present study was approved by the Human Research Ethics Committee of Hospital de Clínicas-Universidade Federal do Paraná in Curitiba, Brazil (CAAE 24561313.3.0000.0096) and written informed consent was obtained from all participants.

Exome Capture, Sequence Alignment and Variant Calling

In order to identify variants likely associated with HJMD phenotypes, we performed a WES. First, peripheral blood was collected from all subjects and genomic DNA was extracted by salting out.¹¹ Two affected members from each family and one unaffected sibling (control) from family #1 were selected for WES. The criterion for choosing the control was the availability of complete clinical evaluation. Next, exome libraries were prepared using the Sure Select Human All Exon V4 (Agilent, Santa Clara, CA, USA) and sequenced using the HiSeq2000 system (Illumina, San Diego, CA, USA) according to the manufacturer's protocol. The reads were mapped against the UCSC hg19 reference sequence using the BWA mapping tool.¹² Duplicated reads were removed by Picard tools. SNPs and Indels were detected using SAMTOOLS and having the dbSNP and the 1000 Genomes databases as references to generate variant call format (VCF). Variants were annotated with the ANNOVAR tool¹³, including allele frequency information from Exome Aggregation Consortium (ExAC)¹⁴ and variant effect prediction from SIFT (<http://sift.bii.a-star.edu.sg/>; range from 1 to 0), PolyPhen (<http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/>; range from 0 to 1), MutationTaster (<http://www.mutationtaster.org/>; range from 0.0 to 215) , PhyloP (<http://hgdownload.cse.ucsc.edu/goldenpath/hg19/phyloP100way/>; range from -20 to 30), SiPhy tools (http://portals.broadinstitute.org/genome_bio/siphy/; range from 0 to 20).

Variant filtering and prioritizing

An overview of two filtering strategies applied to select possible pathogenic variants is given in Figure 1. The Homozygosity Based Strategy, took into account the

recessive inheritance model and presumed the causative variant to be in a homozygous state. Filtering steps included removing variants with (A) high ExAC frequency (>1%), (B) not in coding region or splice site, (C) low coverage (depth $\leq 10x$), (D) low quality (Phred-score ≤ 20), (E) synonymous SNVs, (F) PolyPhen benign, SIFT tolerated, LRT neutral, (G) heterozygous, (F) different between brothers, (G) identical to control and (H) different between families. All of the remaining variants were investigated for their relation with retina or hair development or physiology on the OMIM, NCBI Gene, ENSEMBL and PUBMED databases. The second filtering strategy, named Candidate Gene Strategy, was based on a selection of 22 candidate genes. Selection criterion was based on known involvement in hair and/or retina development or physiology. Selected genes were: *ABCA4*, *CDH3*, *CERKL*, *CHX10*, *CRB1*, *CTNNB1*, *GRK1*, *KRT75*, *LRAT*, *MITF*, *OTX2*, *PAX6*, *POU4F2*, *RB1*, *RGR*, *RHO*, *RLBP1*, *RPE65*, *SAG*, *SOX2*, *TIMP3*, *TP63*, *WT1*. Each gene was investigated individually in each family. Only exonic or splicing site variations with nonsynonymous, indel or unknown changes were selected while all variants with a frequency higher than 1%, discordant between siblings or identical to control were excluded.

The variants passing all filtering criteria were individually assessed for pathogenicity and the final decision for removal or acceptance was made based on frequency (>1%) and other information given in the comments column of Table 2.

Validation and segregation analysis

Validation of the filtered variants and its segregation with the disease phenotype was verified by sequence-based typing of the whole family. Exons 1 and 2 were amplified with primers Forward 5'-GGAGTGCACTGGGTGTTCTT-3' and Reverse 5'-GAGGAGGGGGTCAAGGTAAG-3'. Exon 9 was amplified with primers Forward 5'-

GTTGGATGGAGGCTTCTCAG-3' and Reverse 5'-GGACTAGCCCACGGTAGACA-3'.¹⁵ Exon 12 was amplified with primers Forward 5'-AGAGCTGGGCGGTAAACAG-3' and Reverse 5'-GTGTGCAGAATCCTGGTGTG-3'.¹⁵ All of the primers encompass exon-intron boundaries. Amplification conditions are available upon request. Ten μ l of each PCR product was purified using 20 units of Exonuclease (EXO1) (USB Corporation), 4 units of shrimp alkaline phosphatase (SAP) (USB Corporation) and 1X SAP Buffer (USB Corporation). The purified PCR products were then sequenced on both strands using an ABI Prism Big Dye Terminator Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems) with an ABI Prism 3130xl Genetic Analyzer (Applied Biosystems). Primers used for sequencing reaction were the same as the ones mentioned above plus Forward 5' CAAGGGAGTCCCGGAAGG 3' for exon 2.¹⁵ Sequences were aligned and analysed on SeqScape software version 2.7 (Applied Biosystems).

Results

The results from clinical assessment of each participant are presented in Table 1. All patients were found to have a history of congenital short scalp hair and progressive loss of visual acuity due to retinal degeneration. The WES approach yielded an average of 43,505,514 reads for each exome (ranging from 35,223,972 to 54,439,068; s.d.=6,742,341) with a mean depth of target regions of 54X. In average, 72,092 variants were identified for each subject (ranging from 65,707 to 77,965; s.d.=4,051). More details on WES statistics are presented in supporting information (Table S2). The first filtering strategy applied was the Homozygosity Based Strategy. In this step, only three of the filtered variants in three loci were identical between the three families (*OR4X1*, *HYDIN* and *PKD1L3*). As none of these genes are related to retina or hair development and/or physiology, we considered this finding spurious and removed them from downstream analysis. The second filtering strategy applied was the Candidate Gene Strategy. In this step, only 5 variants in 2 genes remained after filtering (Table 2). From these, only 3 were selected as possible candidate variants, all in *CDH3* gene. Sanger sequencing confirmed segregation of the *CDH3* variants with the disease (Figures 2, 3 and 4).

Family # 1

The family's pedigree is shown in Figure 2. A remote possibility of consanguinity may be considered in this family as the deceased father (III-1) was adopted and there was no information about his relatives. This family has four patients (IV-3, IV-4, IV-5 and IV-6), all born with sparse scalp hair, easily plucked, with rare haircuts throughout life (Fig 5D). Hair growth improved with increasing age. Visual impairment complaints started in childhood (7-11 years), with a progressive degeneration. Visual symptoms are photophobia, lacrimation and nyctalopia, the later just in males.⁹ Clinical findings

were previously published in a complete ophthalmological and dermatological investigation.^{9;16-18} Here we present the results from the clinical follow up which shows the progressive course of macular degeneration with the increase of pigmentary dispersion (Fig 5E) and an ERG showing subnormal waves in scotopic and photopic phases, with normal implicit time of scotopic phase (which was previously decreased or short¹⁷). Results from each subject are presented in Table 1. Light microscopy and scanning electron microscopy of subject V-2 were normal while her brother (V-1) presented several alterations such as trichorrhexis nodosa, longitudinal groove (Fig 5F), dystrophic anagen hair, ruffling of the cuticle adjacent to the anagen bulb (“floppy sock”). Subjects II-1, II-2, III-1, III-3, III-4, IV-1, IV-7, V-2, V-3, V-4 and V-5 had no complaints or evidence of macular dystrophy or alopecia/LAHS. Subjects I-1 and I-2 had a visual impairment and subject II-3 is blind (family report). Subject IV-1 is blind of one eye from birth and ophthalmological examination ruled out macular dystrophy.

On respect to WES analysis, patients from Family #1 were homozygous for exon 2 c.160+1G>A splicing site variation while the control was heterozygous. Sequencing of exon 2 and exon-intron boundaries confirmed that all patients were homozygous for this nucleotide change while healthy relatives were heterozygous or homozygous for G allele. Genotypes of each subject are presented in Figure 2. MutationTaster, PhyloP and SiPhy predicted this variation to be deleterious (scores 1.000, 2.038 and 11.397, respectively).

Family # 2

The family’s pedigree is shown in Figure 3. Family #2 has two patients (III-1 and III-2). Their parents do not have any symptoms and some of the maternal relatives have visual impairment. Patients were born with thin sparse scalp hair (Fig 5G) with no

growth and presented progressive visual impairment from childhood (4-15 years). In patient III-1, EOG was subnormal, with Arden ratio of 1.7 (right eye) and 1.6 (left eye). ERG was subnormal in photopic and escotopic phases in both eyes. Ophthalmological findings were diffuse alteration of RPE with pigmentar dispersion and yellow coloring in the macular area (Fig 5H), compatible with macular dystrophy. Patient III-2 presented similar findings, but with more pigmentar dispersion and area of atrophy o RPE with exposure of choroidal vessels in posterior pole in both eyes. Additionally, patient III-2 presented nystagmus and patient III-1 was born with cleft lip and palate. Among the relatives with visual impairment, only subject II-6 agreed to participate in the study. Standard ophthalmological evaluation revealed posterior pole RPE atrophy characteristic of myopic fundus and nystagmus with no characteristics of macular dystrophy. Dermatological investigation could not associate clinical findings with a particular type of hypotrichosis or any syndrome. Light microscopy and SEM evaluation of hair shafts demonstrated similar findings in both patients: thin hair (Fig 5I), bulb dystrophy, cuticle clefts, trichorrhexis nodosa, longitudinal groove, abnormal shape, twists, loose cuticle and diameter variations. Both sisters wear wigs. Scalp biopsies demonstrated sparse follicles with dystrophic outer root sheath.

Regarding WES data, Family #2 patients were heterozygous for exon 2 c.160+1G>A splicing site variation and for the exon 9 c.G1063T:p.D355Y missense variation. By sequencing of exon 2 and 9, we could confirm that patients were compound heterozygous for these variations while healthy relatives were heterozygous for only one of the variations or homozygous for wild type alleles. Genotypes of each subject are presented in Figure 3. Exon 9 variant effect prediction from MutationTaster, PhyloP and SiPhy predicted this variation to be deleterious (scores 1.000, 2.614 and 17.035, respectively).

Family # 3

The family's pedigree is shown in Figure 4. This family has two patients (III-10 and III-11) that were born with thin sparse scalp hair (Fig 5J) and presented visual impairment from ages of seven years (III-10) and nineteen years (III-11). Patient III-10 is more severely affected than III-11. The father (II-4) and his male relatives present alopecia in an androgenetic pattern. Patient III-10 fundoscopic findings were pigmentary dispersions in the posterior pole, with a yellow coloring in the macular area (Fig 5K), similar to males from family #1 and compatible with macular dystrophy. In EOG, Arden ratio was 2.5 (right eye) and 2.4 (left eye), within normal limits. ERG was normal in scotopic and subnormal in photopic phases in both eyes. Light microscopy of shed hair shafts demonstrated telogen bulbs with hair shaft abnormalities. SEM evaluation of patients revealed longitudinal groove, bulb dystrophy, abnormal shape (polygonal hair) (Fig 5L), flattening and dystrophic anagen bulb. The only finding in subject II-4 was a slight diameter variation and a minor groove/flattening, suggestive of androgenetic alopecia.

Concerning WES results, Family #3 patients presented a new splicing site variation, exon12 c.1795+1G>C. Sequencing of exon 12 and exon-intron boundaries confirmed that all patients were homozygous for this variation while healthy relatives were heterozygous. Genotypes of each subject are presented in Figure 4. MutationTaster, PhyloP and SiPhy predicted this variation to be deleterious (scores 1.000, 2.230, 13.393, respectively).

Discussion

This study presents a clinical and genetic investigation of three unrelated families with macular dystrophy and alopecia. All patients presented rare variants on the *CDH3* gene. Clinical findings combined with molecular data enabled us to confirm the first reports of HJMD in Brazil to date.

Although p-cadherin is better known for its functions in cell adhesion, cell signaling and tumorigenesis, this protein has also been found in adult RPE¹⁹ and plays a key role in hair follicles and limb bud morphogenesis.²⁰ These findings support *CDH3* involvement in HJMD and EEM. Kjaer et al (2005) suggested that *CDH1* (MIM: 192090), which codes for E-cadherin, as a candidate modifier gene to explain differences between HJMD and EEM.²¹ Both cadherins are coexpressed in the limbs, but E-cadherin cannot substitute for P-cadherin in hair follicle and retina,^{20;22} which may explain why all patients with *CDH3* mutations will have combined hypotrichosis and macular dystrophy. Indeed, no *CDH1* variation was found in this study and none of our patients had limb abnormalities. Another syndrome in which symptoms overlap with EEM is Ectrodactyly, Ectodermal Dysplasia, and Cleft Lip/Palate Syndrome (EEC Syndrome [MIM: EEC1 129900, EEC3 604292]). EEC3 is caused by mutations in *TP63* gene (MIM: 603273). Interestingly, we report the first HJMD case with cleft lip and palate (patient III-1 from family #2), however no variation in *TP63* gene could be related to cleft lip and palate phenotype in this patient.

Out of the variants found in the present study in *CDH3*, exon2 c.160+1G>A was the only nucleotide change that has been already described, first by Indelman et al (2007) and recently by Hull et al (2016), both times in English patients with HJMD (compound heterozygous and homozygous, respectively).^{2;23} According to

Indelman's study, c.160+1G>A disrupts a highly conserved consensus donor splice site.²³ Although no RNA was available for expression analysis, this mutation was predicted to prevent intron 2 splicing, and therefore to significantly alter P-cadherin structure.²³ Indeed, absence of intron 2 splicing is expected to generate a severely truncated molecule due to premature termination of translation fourteen amino acids downstream mutation site.²³

All patients from family #1 were homozygous for *CDH3* exon 2 variant confirming HJMD diagnosis, while family members were heterozygous or homozygous for the G allele (Figure 2). This family has a special feature that is a few subjects with an intermediary hair phenotype, in other words, they presented hair abnormalities under SEM analysis (III-2, IV-2 and V-1) but no macular alterations. It was previously hypothesized that these subjects could be heterozygous for the same mutation presented by patients in *CDH3*,¹⁸ however we ruled out this hypothesis because subjects IV-2 and V-1 are homozygous for the wild type allele (G). This evidence supports that hair phenotype in intermediary phenotype subjects of this family may be related to another gene which might also act as a modifier in patients. Nevertheless, *CDH3* variations impairing p-cadherin function or its expression are sufficient to cause hair abnormalities observed in HJMD.²⁴ It is interesting that this is the only family with a confirmed diagnosis of LAHS, a rare syndrome previously associated with the *K6HF* (*KRT75*) gene in three out of nine families studied.²⁵ With the strategies used here, no allelic variant on *K6HF* gene could be related to the disease (data not shown). Our findings support a role for *CDH3* gene in LAHS as only homozygous for the c.160+1G>A variant presented the syndrome.

Family #2 patients were also heterozygous for exon2 c.160+1G>A, but additionally heterozygous for the exon 9 c.G1063T:p.D355Y variant (Figure 3). Regarding exon 2

variant, it noteworthy to observe that family #1 and family #2 subjects bearing this genetic variant were from the same geographic region (Paranaguá City), which might indicate a possible founder effect in this population. The second variant found in this family, exon 9, causes an amino acid change from aspartic acid to tyrosine in the EC3 extracellular domain of CDH3 and is predicted to be deleterious. To our knowledge, this genetic variant has not been described before. The relatives bearing only one of these variations do not present any related symptoms. Maternal related subject with complaints of visual impairment was homozygous for the wild type alleles in both exons, which, along with clinical findings, rule out the possibility of an intermediate eye phenotype in this family. This findings support the idea that one functional copy of *CDH3* gene is enough for a normal phenotype. This is the fifth family described in the literature of HJMD caused by compound heterozygous mutations in *CDH3* gene. Previously described compound heterozygous HJMD cases are given in Table S1.

Family #3 patients presented another new variant, exon12 c.1795+1G>C (Figure 4), in a splicing region, which may lead to a premature stop codon 10 bp downstream of intron 12. Alternatively this variation may lead to exon 12 skipping; with both assumptions leading to a non-functional protein. A different variant at the same site was already described in ExAC (c.1795+1G>T), although instead of G>C the transversion was G>T. We confirmed that C/C genotype is present only in patients and the genotyped relatives were heterozygous G/C. In this family intermediate phenotype did not segregate with heterozygous genotype and the pedigree supports the androgenetic hypothesis alopecia (MIM: 109200). Hair findings in patients are different from androgenetic alopecia findings, therefore supporting that the hair loss presented by patients is a more severe form caused by *CDH3* mutation and that

another genes may be related to androgenetic alopecia, as it seems to be a complex disease.

Regarding ophthalmological finding, ERG from all patients was abnormal, with subnormal waves with decreased amplitude and increased implicit time in scotopic and photopic phase, this is a common outcome in retinal dystrophies.²⁶ Findings from families #1 and #2 indicate that the alteration is in the RPE level. Fundoscopic changes are compatible with macular degeneration. The extension of the lesion was more prominent in family #1, probably due to age difference between patients of both families. In family #2, the younger sister affected (III-2) presented worst visual acuity in relation to the older (III-1), due to more severe alterations in eye fundus (Tab 1). ERG results in these families rule out the possibility of retinitis pigmentosa and cones dystrophy. EOG and fundoscopic findings from family #3 were less severe when compared to families #1 and #2. Similarity in ophthalmological findings from families #1 and #2 may be due to the fact that both have a common variation (exon2 c.160+1G>A) although family #1 is homozygous and family #2 is a compound heterozygous. At exon 2, this nucleotide change seems to be causing more severe phenotype than that in exon 12 variant. Nevertheless, expression studies are needed to confirm the consequence of the variations described in protein expression levels and protein sequence. Following the strategy used here, no other gene variant was found to explain the phenotypic variations in these families. Although consanguinity was not reported, intermediary hair findings are only present in families with homozygous mutations (#1 and #3), alerting for the possibility of inbreeding.

Macular findings were very similar in the families investigated, and could be related to biallelic variations in *CDH3* inherited in an autosomal recessive pattern even in a homozygous or in a compound heterozygous manner (haplosufficiency). The fully

penetrant phenotypes could be related to *CDH3* allelic variants only in family #2. The mild hair phenotypes observed in relatives from the other families must be caused by another gene which may act as a modifier, explaining heterogeneity inside the families. Interfamilial variations may be consequences of different effects of distinct mutations in *CDH3* gene and of modifier genes. Furthermore, taking into account that *CDH3* variations are causative of HJMD and EEM Syndrome, and that hair loss is its first clinical manifestation, congenital alopecia or hypotrichosis should alert clinicians for the ophthalmological investigation. Although no cure for macular dystrophy is yet available, patients may receive medical support to improve their life quality. Moreover, knowledge of the molecular basis of HJMD, advances in development of gene and cell based therapies for inherited retinal disorders²⁷ and *CDH3* suitability for gene augmentation therapy²⁸ may soon give hope to the treatment of these patients, not only for the macular dystrophy but also for restoring normal hair cycle.²⁹ If treatment becomes reality, early diagnosis will be fundamental to prevent irreversible neurosensorial retina remodelling, which is a possible consequence of retinal degeneration.³⁰

In conclusion, we performed a clinical and genetic investigation of three families which lead to HJMD diagnosis and the description of two novel *CDH3* variants causative of the disease. WES analysis allowed us to discard the involvement of other candidate genes supposedly involved in the pathogenesis of the disease. This is the first report of HJMD with genetic confirmation in Latin America. Our findings reinforce *CDH3* mutations as major diagnostic criteria for HJMD. Additionally, we reported a *CDH3* variant segregating with LAHS in one of the investigated families. Further studies are needed unravel the cause of intra and interfamilial heterogeneity of these diseases.

Supplemental Data

Supplemental Data include two tables.

Conflict of interest: the authors declare no conflict of interest.

Acknowledgements: We thank CAPES and FUNPAR for financial support; Clínica Retina e Vitreo Consultoria for providing medical, technical and logistic support for patients evaluation, Centro de Microscopia Eletrônica/UFPR for technical support and images; Ana Maria Machicado de Ugarte, Suelen Camargo Zeck and Gorete Rezende for sample collection; José Samuel da Silva, Georgia Gelmini and LIGH staff for technical support and all patients for participation in the study.

Web Resources:

1000 Genomes, <http://www.internationalgenome.org/>
ANNOVAR, <http://annovar.openbioinformatics.org/en/latest/>
BWA, <http://bio-bwa.sourceforge.net/>
dbSNP, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/>
ExAC Browser, <http://exac.broadinstitute.org/>
GenBank, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>
MutationTaster, <http://www.mutationtaster.org/>
NCBI Genome, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/>
NCBI Nucleotide, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/>
OMIM, <http://www.omim.org/>
Picard tools, <http://broadinstitute.github.io/picard/>
PhyloP100way, <http://hgdownload.cse.ucsc.edu/goldenpath/hg19/phyloP100way/>
PolyPhen-2, <http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/>
SAMTOOLS, <http://samtools.sourceforge.net/>
SIFT, <http://sift.bii.a-star.edu.sg/>
SiPhy, http://portals.broadinstitute.org/genome_bio/siphy/
UCSC Genome Browser, <http://genome.ucsc.edu>
VEP <http://www.ensembl.org/info/docs/tools/vep/index.html>

Accession Numbers:

Accession number requested to ClinVar on January 18, 2017. Submission IDs are SUB2325171 and SUB2324430.

References

1. Liutkeviciene, R., Lesauskaite, V., Asmoniene, V., Gelzinis, A., Zaliuniene, D., Jasinskas, V. (2012). Inherited macular dystrophies and differential diagnostics. *Medicina (Kaunas)* *48*, 485-495.
2. Hull, S., Arno, G., Robson, A.G., Broadgate, S., Plagnol, V., McKibbin, M., Halford, S., Michaelides, M., Holder, G.E., Moore, A.T., et al. (2016). Characterization of CDH3-Related Congenital Hypotrichosis With Juvenile Macular Dystrophy. *JAMA Ophthalmol* *134*, 992-1000.
3. Kremmidiotis, G., Baker, E., Crawford, J., Eyre, H.J., Nahmias, J., Callen, D.F. (1998). Localization of human cadherin genes to chromosome regions exhibiting cancer-related loss of heterozygosity. *Genomics* *49*, 467-471.
4. Shimoyama, Y., Yoshida, T., Terada, M., Shimosato, Y., Abe, O., Hirohashi, S. (1989). Molecular cloning of a human Ca²⁺-dependent cell-cell adhesion molecule homologous to mouse placental cadherin: its low expression in human placental tissues. *J Cell Biol* *109*, 1787-1794.
5. Paredes, J., Figueiredo, J., Albergaria, A., Oliveira, P., Carvalho, J., Ribeiro, A.S., Caldeira, J., Costa, A.M., Simoes-Correia, J., Oliveira, M.J., et al. (2012). Epithelial E- and P-cadherins: role and clinical significance in cancer. *Biochim Biophys Acta* *1826*, 297-311.
6. Basel-Vanagaite, L., Pasmanik-Chor, M., Lurie, R., Yeheskel, A., Kjaer, K.W. (2010). CDH3-Related Syndromes: Report on a New Mutation and Overview of the Genotype-Phenotype Correlations. *Mol Syndromol* *1*, 223-230.
7. Cecatto-De-Lima, L., Pinheiro, M., Freire-Maia, N. (1988). Oculotrichodysplasia (OTD): a new probably autosomal recessive condition. *J Med Genet* *25*, 430-432.
8. Balarin Silva, V., Simoes, A.M., Marques-de-Faria, A.P. (1999). EEM syndrome: report of a family and results of a ten-year follow-up. *Ophthalmic Genet* *20*, 95-99.
9. Sato, M.T., Marzagão, R., Graff, C., Arana, J., A.T.R., M., Pagnan, N.A.B., Ribeiro, E.M.S.F., Moreira, C.A. (2002). Descrição de nova distrofia macular associada à síndrome dos cabelos anágenos frouxos. *Arq Bras Oftalmol* *65*, 249-256.
10. Frainer, R.H., de Abreu, L.B., Pinto, G.M., de Carvalho, A.V., Meneghello, L.P. (2013). Do you know this syndrome? *An Bras Dermatol* *88*, 135-137.
11. Miller, S.A., Dykes, D.D., Polesky, H.F. (1988). A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res* *16*, 1215.
12. Li, H., Durbin, R. (2010). Fast and accurate long-read alignment with Burrows-Wheeler transform. *Bioinformatics* *26*, 589-595.
13. Wang, K., Li, M., Hakonarson, H. (2010). ANNOVAR: functional annotation of genetic variants from high-throughput sequencing data. *Nucleic Acids Res* *38*, e164.
14. Lek, M., Karczewski, K.J., Minikel, E.V., Samocha, K.E., Banks, E., Fennell, T., O'Donnell-Luria, A.H., Ware, J.S., Hill, A.J., Cummings, B.B., et al. (2016). Analysis of protein-coding genetic variation in 60,706 humans. *Nature* *536*, 285-291.
15. Indelman, M., Bergman, R., Lurie, R., Richard, G., Miller, B., Petronius, D., Ciubutaro, D., Leib, R., Sprecher, E. (2002). A missense mutation in CDH3, encoding P-cadherin, causes hypotrichosis with juvenile macular dystrophy. *J Invest Dermatol* *119*, 1210-1213.
16. Sato, M.T., Brenner, F.M., Marzagão, R., Sabbag, F., Bordignon, G., Neto, J.F., Eiras-Stofella, D.R., Franco, A., Júnior, C.A.M. (2004). Loose anagen hair syndrome associated with macular dystrophy: a family description. *Anais Brasileiros de Dermatologia* *79*, 725-731.

17. Sato, M.T., Marzagão, R., Moreira Júnior, C.A. (2004). Distrofia retiniana com onda rápida escotópica (DRORE) associada à síndrome dos cabelos anágenos frouxos (SCAF). Parte I: Achados oftalmológicos. *Arq Bras Oftalmol* 67, 491-499.
18. Sato, M.T., Marzagão, R., Pagnan, N.A.B., Freire-Maia, N., Moreira Júnior, C.A. (2004). Distrofia retiniana com onda rápida escotópica (DRORE) associada à síndrome dos cabelos anágenos frouxos (SCAF). Parte II: Genética. *Arq Bras Oftalmol* 67, 621-630.
19. Burke, J.M., Cao, F., Irving, P.E., Skumatz, C.M. (1999). Expression of E-cadherin by human retinal pigment epithelium: delayed expression in vitro. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 40, 2963-2970.
20. Shimomura, Y., Wajid, M., Shapiro, L., Christiano, A.M. (2008). P-cadherin is a p63 target gene with a crucial role in the developing human limb bud and hair follicle. *Development* 135, 743-753.
21. Kjaer, K.W., Hansen, L., Schwabe, G.C., Marques-de-Faria, A.P., Eiberg, H., Mundlos, S., Tommerup, N., Rosenberg, T. (2005). Distinct CDH3 mutations cause ectodermal dysplasia, ectrodactyly, macular dystrophy (EEM syndrome). *J Med Genet* 42, 292-298.
22. Shimomura, Y., Wajid, M., Kurban, M., Christiano, A.M. (2010). Splice site mutations in the P-cadherin gene underlie hypotrichosis with juvenile macular dystrophy. *Dermatology* 220, 208-212.
23. Indelman, M., Eason, J., Hummel, M., Loza, O., Suri, M., Leys, M.J., Bayne, M., Schwartz, F.L., Sprecher, E. (2007). Novel CDH3 mutations in hypotrichosis with juvenile macular dystrophy. *Clin Exp Dermatol* 32, 191-196.
24. Samuelov, L., Sprecher, E., Tsuruta, D., Biro, T., Kloepper, J.E., Paus, R. (2012). P-cadherin regulates human hair growth and cycling via canonical Wnt signaling and transforming growth factor-beta2. *J Invest Dermatol* 132, 2332-2341.
25. Chapalain, V., Winter, H., Langbein, L., Le Roy, J.M., Labreze, C., Nikolic, M., Schweizer, J., Taieb, A. (2002). Is the loose anagen hair syndrome a keratin disorder? A clinical and molecular study. *Arch Dermatol* 138, 501-506.
26. Brunette, J.R. (1982). Clinical electroretinography. Part 1: Foundations. *Can J Ophthalmol* 17, 143-149.
27. Sengillo, J.D., Justus, S., Tsai, Y.T., Cabral, T., Tsang, S.H. (2016). Gene and cell-based therapies for inherited retinal disorders: An update. *Am J Med Genet C Semin Med Genet* 172, 349-366.
28. Singh, M.S., Broadgate, S., Mathur, R., Holt, R., Halford, S., MacLaren, R.E. (2016). Hypotrichosis and juvenile macular dystrophy caused by CDH3 mutation: A candidate disease for retinal gene therapy. *Sci Rep* 6, 23674.
29. Chen, J., Roop, D.R. (2012). Mimicking hair disorders by genetic manipulation of organ-cultured human hair follicles. *J Invest Dermatol* 132, 2312-2314.
30. Mellough, C.B., Steel, D.H., Lako, M. (2009). Genetic basis of inherited macular dystrophies and implications for stem cell therapy. *Stem Cells* 27, 2833-2845.

Figure titles and legends

Figure 1: Overview of filtering strategies.

For filtering of the annotated variants two approaches were adopted, Homozygosity Based Strategy and Candidate Gene Strategy. Boxes contain characteristics selected in each step and the mean number of variants remaining after each stage of filtering in 3 families.

Figure 2: Family #1 pedigree and *CDH3* genotypes segregation.

Family #1 presented 4 affected siblings (IV-3 to IV-6), 4 subjects with hair shaft alterations (III-2, IV-2 and V-1). Arrows indicate subjects with WES data.

Figure 3: Family #2 pedigree and *CDH3* genotypes segregation.

Family #2 presented 2 affected sisters (III-1 and III-2) and 5 subjects with visual impairment (I-6, II-6, II-7, III-5 and III-6), From these, only subject II-6 was accessed. Arrows indicate subjects with WES data.

Figure 4: Family #3 pedigree and *CDH3* genotypes segregation.

Family #3 presented 2 affected brothers (III-10 and III-11) and 8 males with androgenetic alopecia (I-1, II-1, II-4 and III-1 to III-5), From these, only subject II-4 was accessed. Arrows indicate subjects with WES data.

Figure 5: Posterior photograph of hair, retinography and SEM of spontaneously eliminated hair.

Family #1: (A) Normal hair of patient IV- 7 (B) normal eye fundus of patient IV-7; (C) SEM of normal spontaneously eliminated hair of subject V-2; (D) posterior scalp view of patient IV-5 at 47 years old; (E) patient IV-5 retinography of patient IV-5 with RPE atrophy and pigmentary dispersion in posterior pole, compatible with coloboma/staphyloma in the macular area; (F) SEM of spontaneously eliminated hair of subject V-1 showing the longitudinal groove. Family #2: (G) posterior scalp view of patient III-1 at thirty two years old; (H) patient III-1 retinography with RPE atrophy in posterior pole and pigmentary dispersion in macular area; (I) patient III-1 SEM of spontaneously eliminated hair showing two shafts with hair thinning. Family #3: (J) posterior scalp view of patient III-10 at thirty four years old; (K) patient III-10 retinography with RPE atrophy in posterior pole and yellowish pigmentary dispersion in macular area; (L) patient III-10 SEM of spontaneously eliminated hair showing longitudinal grooves and abnormal shape.

Table titles and legends

Table 1: Clinical features summary

Abbreviations: CF, counting fingers; EOG, electro-oculography; ERG, electroretinogram; OD, *oculus dexter* (right eye); OS, *oculus sinister* (left eye); OU, *oculus uterque* (both eyes); SEM, scanning electron microscopy.

Table 2: List of variants after filtering.

Abbreviations: VEP, Variant Effect Predictor.

											choroidal vessels in posterior pole	
II-4	M	57	Yes	Slight diameter variation and a minor groove/flattening	No	20/20 OU	.	.	.	Normal	Normal	Androgenetic alopecia
II-5	F	50	No	Normal	No	20/20 OU	.	.	.	Normal	Normal	.
F				Longitudinal groove, bulb dystrophy,							Pigmentary dispersions in the posterior pole, with a yellow coloring in the macular area	
A				abnormal shape (polygonal hair), flattening and dystrophic anagen bulb	Yes	20/200; 20/200	.	Subnormal	Normal	.	Inconclusive	Maculopathy
M		26	Yes									Photophobia
I												
L												
Y												
# 3												
III-11	M	23	Yes	Longitudinal groove, bulb dystrophy, abnormal shape (polygonal hair), flattening and dystrophic anagen bulb	Yes	20/25; 20/60	.	.	.	Posterior pole RPE atrophy and pigmentary dispersions	Inconclusive	Photophobia
III-9	M	27	No	Normal	No	20/20 OU	.	.	.	Normal	Normal	.

Abbreviations: CF, counting fingers; EOG, electro-oculography; ERG, electroretinogram; OD, *oculus dexter* (right eye); OS, *oculus sinister* (left eye); OU, *oculus uterque* (both eyes); SEM, scanning electron microscopy.

Table 2: List of variants after filtering.

Gene (RefSeq)	Variant	Protein change	dbSNP ID	Family (hom/het)	Comment
<i>POU4F2</i> (NM_004575)	exon1:c.200_201insCGG	Inframe insertion p.G67delinsGG	rs5862765	3 (hom)	Excluded: Glycine homopolymer region of the protein considered a compositional bias region by UNIPROT and not in the POU domain or in DNA binding site. VEP considered this insertion as moderate impact variation.
	exon2:c.160+1G>A	Splicing site transition	.	1 (hom) and 2 (het)	Selected: disrupts highly conserved splicing site
<i>CDH3</i> (NM_001793)	exon9:c.G1063T	Missense p.D355Y	.	2 (het)	Selected: predicted to be a deleterious change in a highly conserved residue
	exon12:c.G1689C	Missense p.Q563H	rs1126933	2 (het)	Excluded: Frequency >0,01
	exon12:c.1795+1G>C	Splicing site transversion	.	3 (hom)	Selected: disrupts highly conserved splicing site

Abbreviations: VEP, Variant Effect Predictor.

Figure 1: Overview of filtering strategies.

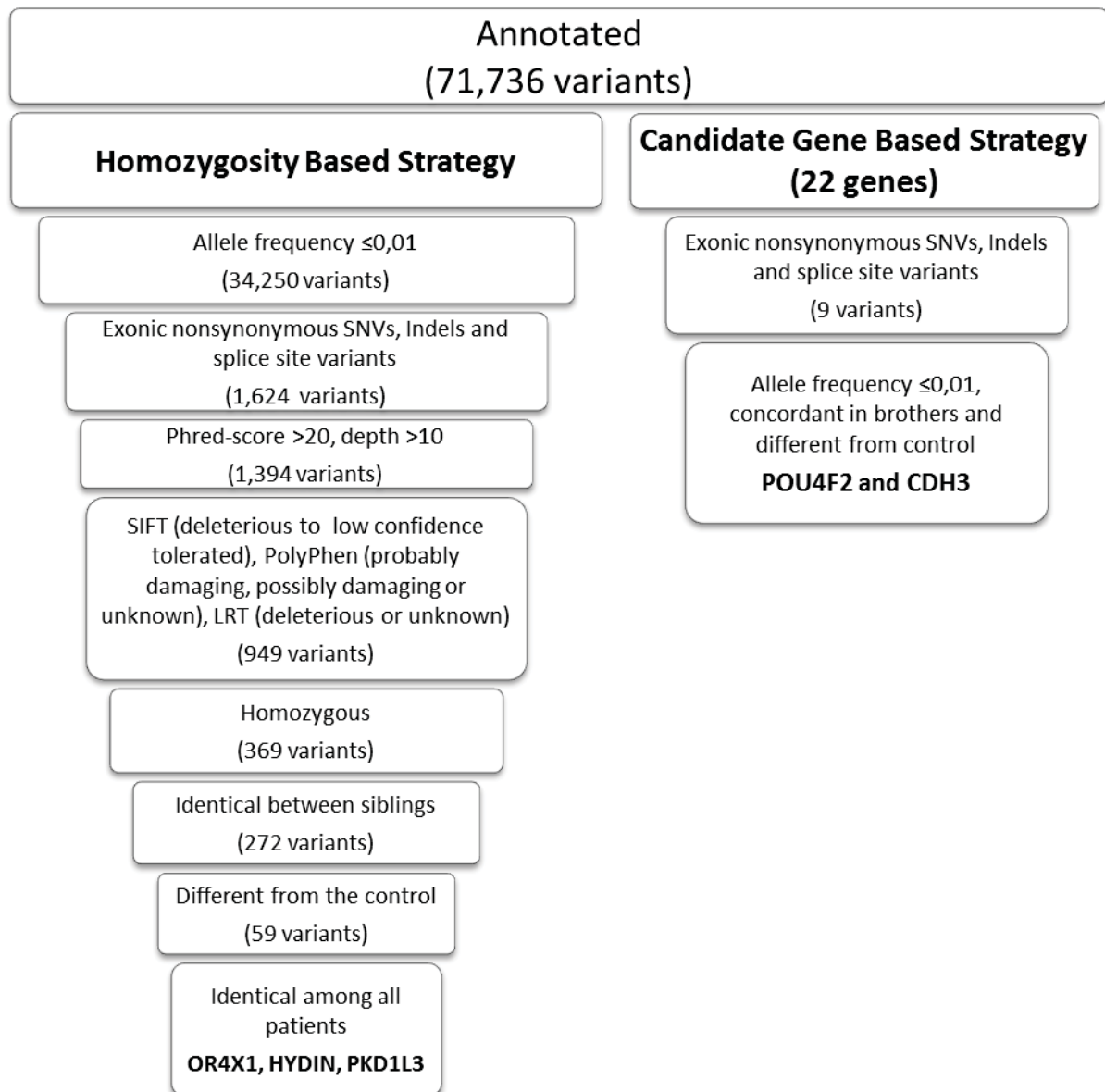


Figure 2: Family #1 pedigree and CDH3 genotypes segregation.

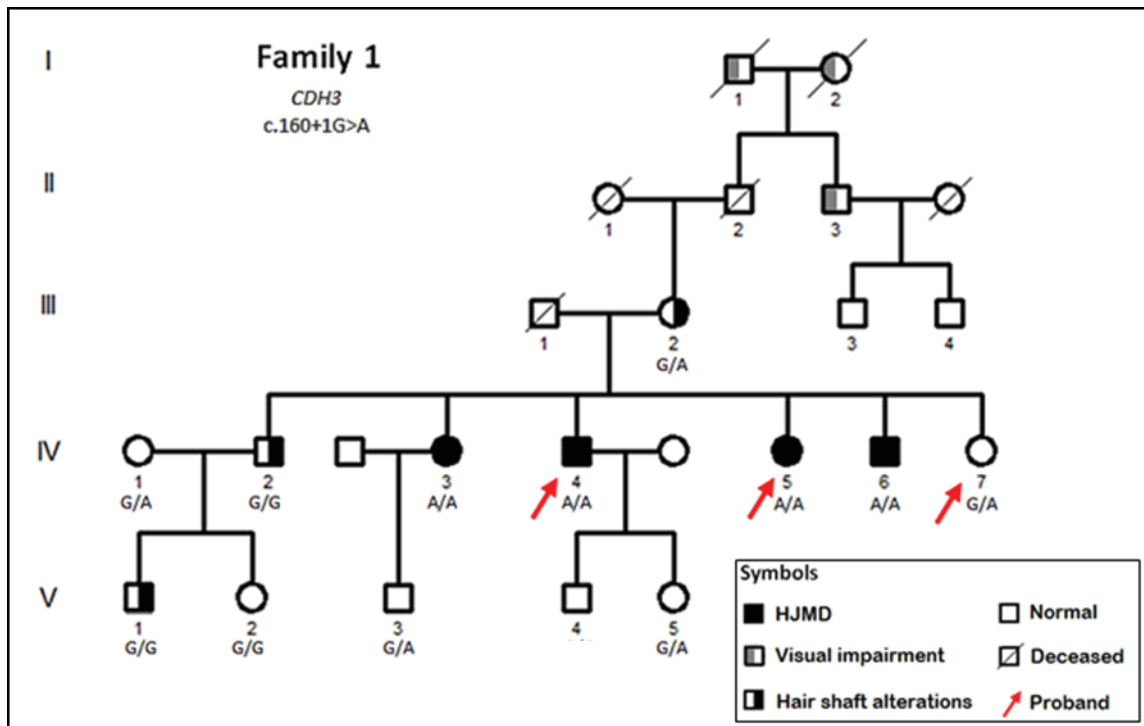


Figure 3: Family #2 pedigree and CDH3 genotypes segregation.

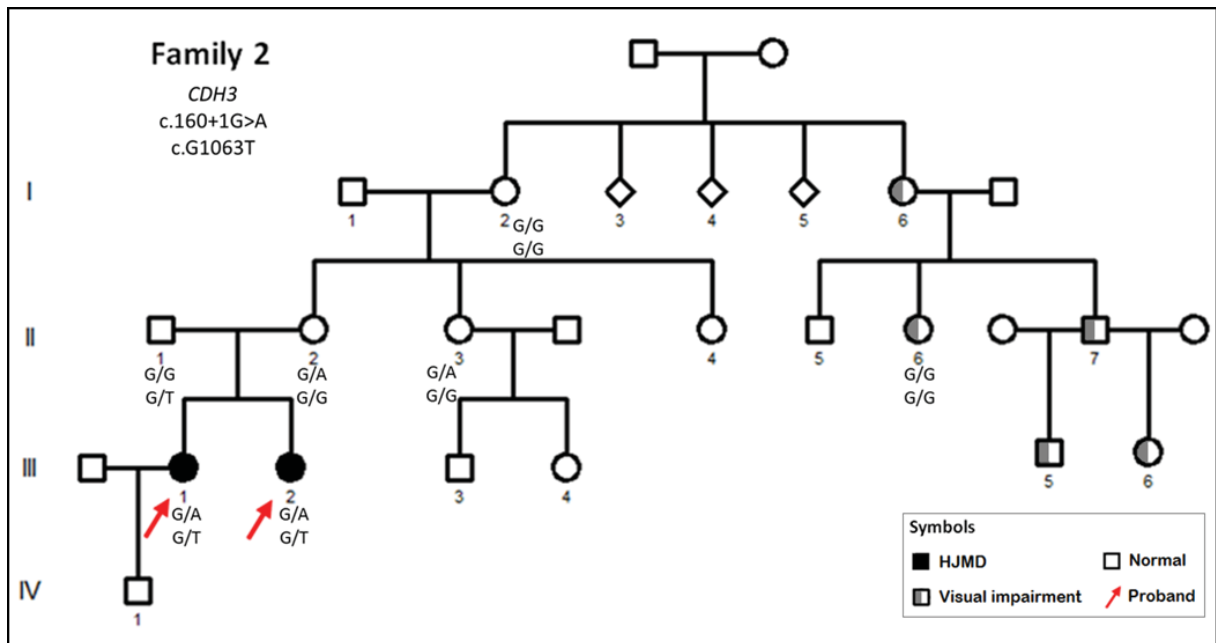


Figure 4: Family #3 pedigree and CDH3 genotypes segregation.

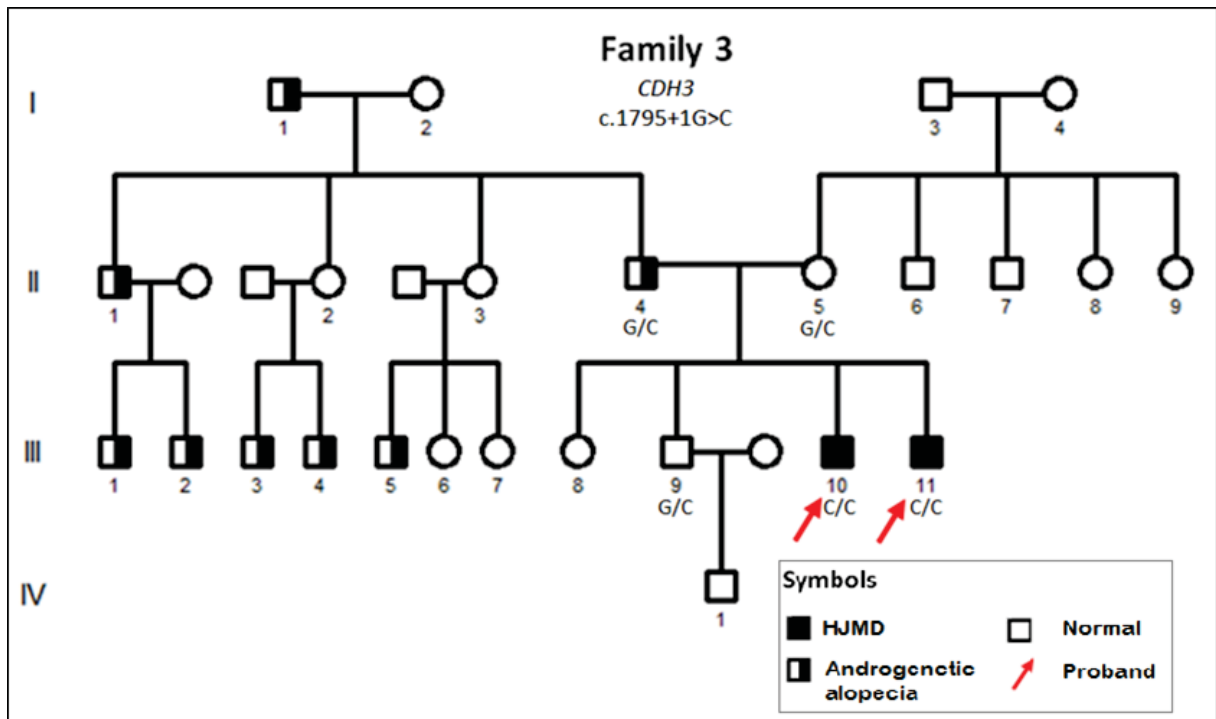


Figure 5: Posterior photograph of hair, retinography and SEM of spontaneously eliminated hair.

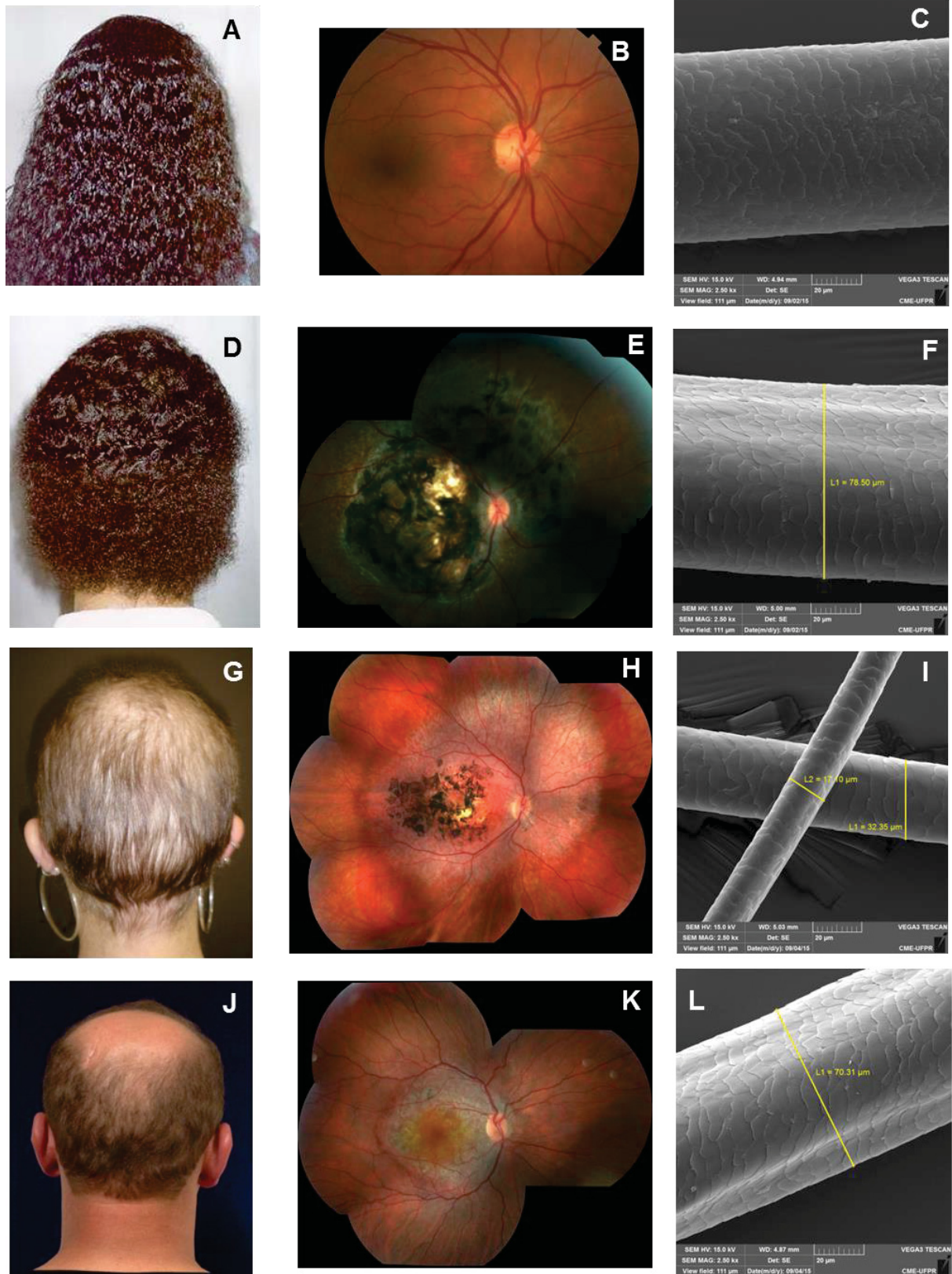


Table S1: Review of macular dystrophy with alopecia

Clinical diagnosis	Molecular/ histological findings	Number of affected individuals	Further clinical information	Inheritance	Country or ethnical origin	Consanguinity	Reference
Tapetoretinal degeneration and alopecia	.	2	.	.	Hungary	No	Ludvig 1965 apud ¹
Hereditary macular degeneration and alopecia congenita	Not investigated	2 from 8 with macular degeneration.	Coarctation of the aorta, congenital aortic stenosis, stabismus, scotoma, pendular nystagmus.	AD (Macular degeneration) and AR (alopecia congenita)	United Kingdom	No	²
Retinal dystrophy combined with alopecia	.	2	Not proposed.	Not proposed.	Sweden	No	¹
	<i>CDH3</i> exon 8, c.965A>T, p.N322I	2	Limb defects.	AR	Denmark	Yes	³ apud ^{4, 5}
	Normal karyotype.	6 (one died in infancy)	Partial anodontia and the small teeth. Ectrodactyly and syndactyly.	AR	Remote island in Japan.	Yes	⁴
	Not investigated	1	Teeth anomaly, split hand complex	AR	Japan	Yes	⁶
Ectodermal dysplasia, ectrodactyly, and macular dystrophy (EEM syndrome)	<i>CDH3</i> exon 7, c.829delG, G277fsX295	2	Syndactyly in both hands, two café-au-lait spots, and small, spaced teeth. One sib with syndactyly, and first cousin with ectrodactyly.	AR or X-linked	Brazil (mixed European (Latin) and native Brazilian descent)	No	^{5,7}
	<i>CDH3</i> exon 7, c.830G>T, p.G277V	2	Patient 1 has developmental delay with a borderline IQ.	AR	Israel (Jewish Yemenite origin)	Possibility of a common ancestor.	^{8,9}
	Not mentioned in abstract.	3	.	AR	Turkey	Yes	¹⁰
	<i>CDH3</i> exon 4 c.353A>G, p.E118G AND exon 8 c.965A>T, P.N322I	5+2	SHFM, Syndactily	AR	Pakistan	Yes	¹¹
Macular degeneration, alopecia areata and growth retardation	Not investigated	1	Short height. Hepatitis, herpes zoster. Paternal aunt with alopecia.	Not proposed.	Germany	Not reported.	¹²

Clinical diagnosis	Molecular/ histological findings	Number of affected individuals	Further clinical information	Inheritance	Country or ethnic origin	Consanguinity	Reference
Retinitis pigmentosa, trichodysplasia (hypotrichosis and structural changes), dental anomalies, and onychodysplasia.	Not investigated	2	Teeth abnormalities. One nonaffected brother has cleft lip.	AR	Brazilian of portuguese and indian ascendance	Yes	13
Hereditary hypotrichosis (Marie-Unna type) and juvenile macular degeneration (Stargardt's maculopathy)	Not investigated	2		AR (Macular degeneration) and AD (Hypotrichosis)	United Kingdom	Yes	14
	Not investigated	2		AR	Portugal	No	15
	Absence of mutations in TIMP-3 gene.	2		AR	Siberia	Yes	16
	<i>CDH3</i> heterozygous for exon 5 (L168X) and an for exon 14 (2112delG)	1		Compound heterozygous	France	Not reported.	17,18
Hypotrichosis with Juvenile Macular Dystrophy (HJMD)	<i>CDH3</i> , exon 8, c.981delG. <i>CDH3</i> mRNA expression in skin biopsy was equivalent to normal control. Immunofluorescence staining demonstrated reduced <i>CDH3</i> expression in skin biopsies.	11		AR	Israel (druze population)	Yes	19
	<i>CDH3</i> exon2 c.160+1G>A	4	LAHS. In three not affected relatives light microscopy and SEM demonstrated some hair shaft alterations.	AR	Brazil	Remote	20 and present study
	<i>CDH3</i> exon 11, c.1508G>A, p.R503H	4		AR	Arab Israeli descent	Yes	21

Clinical diagnosis	Molecular/ histological findings	Number of affected individuals	Further clinical information	Inheritance	Country or ethnic origin	Consanguinity	Reference
	<i>CDH3</i> exon 5 c.462delT (Family 2); exon 7 c.829delG (Family 3) AND exon 11 c. 1508G>A, p.R503H (Families 4 and 5).	9 patients in 5 families (1 described above ¹⁷)		AR	Families 2 and 3 turkey, Families 4 and 5 Arab Israeli (unrelated)	Yes (Families 2-5)	18
	<i>CDH3</i> exon 13 c.1845T>A; p.Y615X	2		AR	Israel (Arab Muslim origin)	Yes	22
	<i>CDH3</i> heterozygous intron 2 c.160 + 1G > A exon 11 c.1510 G > A (Patient 1). <i>CDH3</i> heterozygous for exon 6 c.661 C > T and exon 12 c.1724A > G (Family 2).	4	Patient 1: bilateral bipartite patella and syndactyly. Patients 2-4: teeth and nail defects which resolved as this patient matured with no changes in scalp hair.	Compound heterozygous	P1: English parents, P2-4: Northern American origin	No	23
Hypotrichosis with Juvenile Macular Dystrophy (HJMD)	<i>CDH3</i> exon 5 490insA (Family 1) AND <i>ivs10-1G>T</i> (Families 2 and 3)	4+12+6		AR	Pakistan	Yes	11
	<i>CDH3</i> intron 10 <i>IVS10-1 G>T</i>	6		AR	Pakistan (isolated tribe of Pashtoon origin)	Yes	24
	<i>CDH3</i> intron 10 c. <i>IVS10-1 G>A</i>	6		AR	Pakistan	Yes	25
	<i>CDH3</i> intron 12 <i>ivs12-2A > G</i> (Family A) and intron 10 <i>ivs10-1G>T</i> (Family B).	7		AR	Pakistan	Yes	26
	<i>CDH3</i> intragenic deletion of exons 12 and 13.	2	Original diagnosis Stargardt disease.		United Kingdom	Likely	27
	<i>CDH3</i> exon 7 c.C747A, p.Y249X	1	His medical history includes anemia due to thalassemia minor.	AR	Israel (Arab Muslim origin)	Yes	28
	Mutation in <i>CDH3</i> gene (no details available)	1	Bull's eye maculopathy bilaterally. Procedural history included tympanostomy tube placements in both ears and an adenoidectomy.	AR	USA	Not reported.	29

Clinical diagnosis	Molecular/ histological findings	Number of affected individuals	Further clinical information	Inheritance	Country or ethnic origin	Consanguinity	Reference
	<i>CDH3</i> c.307C>T; p.R103 in two sisters (subjects 1 and 2), c.1859_1862delCTCT in both unrelated males (subjects 3 and 4)	4	One male subject did not have frank hypotrichosis, but review of symptoms revealed relatively slow hair growth and an inability to conceive children. None had dental or digital findings, although one female noted slow nail growth	AR	Saudi Arabia	Yes	30
	<i>CDH3</i> c.1308_1310delACT, (p.255delTyr) (Family A) and c.1454G>A (p.Trp485*) (Family B)	8		AR	Pakistan	Yes	31
Hypotrichosis with Juvenile Macular Dystrophy (HJMD)	<i>CDH3</i> heterozygous for exon2 c.160+1G>A and exon 9 c.G1063T;p.D355Y (Family 2) and exon12 c.1795+1G>C (Family 3) A recurrent homozygous mutation in intron 12 c.1796-2A>G (ivs12-2A>G) in <i>CDH3</i> Not investigated	4 1 1	One of the patients from family 2 has cleft lip and palate. Male relatives from family 3 have androgenetic alopecia.	Compound heterozygous and AR	Brazil	No	Present study
				AR	Singapore	Not reported.	32
				AR	Portugal	Yes	33

Clinical diagnosis	Molecular/ histological findings	Number of affected individuals	Further clinical information	Inheritance	Country or ethnic origin	Consanguinity	Reference
	<p><i>CDH3</i> gene mutations in Patient 1: c.316_317delAA (p.Lys106Glufs*12) and c.1086G>A (p.Trp362*). Patient 2: c.1425-1G>T. Patient 3: c.1568delA (p.Asn523Metfs*14). Patient 4: c.1508G>A (p.Arg503His). Patient 5 and 7: c.830delG (p.Gly277Alafs*20). Patient 6: c.613G>A (p.Val205Met). Patient 8: c.2357delG (p.Gly786Alafs*7). Patient 9: c.2157C>T (p.Arg720*). Patient 10: c.160 + 1G>A.</p>	15 affected, 10 studied (1 described above ¹⁸)	One patient reported nyctalopia. Another patient had 1 had mild webbing between the second and third digits of his left hand and campyloactyly of his feet.	Compound heterozygous and AR	Germany, Pakistan, Jordan, Turkey, Portugal, United Kingdom	8 out of 10 families were consanguineous	³⁴
Hypotrichosis with Juvenile Macular Dystrophy (HJMD)	<p>p.Val2050Leu variant in ABCA4 and heterozygous variants c.613G > A; p.Val205Met and c.830del (p.Gly277Alafs*20) in <i>CDH3</i></p>	1	First suspected diagnosis of Keratosis Follicularis Spinulosa Decalvans and Retinitis Pigmentosa Inversa. Patient presents punctiform follicular keratosis on cheeks, forehead, eyebrows and anterior surface of the arms and posterior surface of the legs, erythema with follicular hyperkeratosis and reduction of hair density on eyebrows. A skin biopsy had been performed, and was informed as presenting a reduction in the number of scalp follicles, absence of sebaceous glands and infundibular cyst with keratin granules.	Compound heterozygous	Spain	No	³⁵

Clinical diagnosis	Molecular/ histological findings	Number of affected individuals	Further clinical information	Inheritance	Country or ethnical origin	Consanguinity	Reference
Macular dystrophy linked to autosomal recessive alopecia universalis	Not investigated	3	.	AR	Australia	No, however parents and grandparents came from the same small town, Kostajnica, in a hilly region of Croatia.	³⁶
Stargardt's macular dystrophy and congenital hypotrichosis	Not investigated	2	Treatment with eye drops of carboxymethylcellulose	AR	Brazil	Not reported.	³⁷

Table S2: WES statistics

Family	#1	#1	#1	#2	#2	#3	#3
Sample	IV-4	IV-5	IV-7	III-1	III-2	III-10	III-11
Total reads	38.136.216	54.439.068	39.428.504	45.498.030	49.441.050	35.223.972	42.371.760
Total yield (bp)	3.851.757.816	5.498.345.868	3.982.278.904	4.595.301.030	4.993.546.050	3.557.621.172	4.279.547.760
Average read length (bp)	101	101	101	101	101	101	101
Target regions (bp)	51.189.318	51.189.318	51.189.318	51.189.318	51.189.318	51.189.318	51.189.318
Average throughput depth of target regions (X)	75,2	107,4	77,8	89,8	97,6	69,5	83,6
Initial mappable reads (mapped to human genome)	37.957.524	54.234.556	39.248.612	45.339.288	49.199.394	35.059.614	42.129.598
% Initial mappable reads (out of total reads)	99,50%	99,60%	99,50%	99,70%	99,50%	99,50%	99,40%
% Coverage of target regions (more than 10X)	94,70%	97,20%	95,40%	97,10%	96,40%	92,90%	94,80%
Number of on-target genotypes (more than 10X)	48.488.234	49.772.438	48.834.769	49.680.867	49.329.007	47.553.260	48.525.012
Mean depth of target regions (X)	47,1	67,7	49	57,3	61,2	43,8	50,9
Number of SNPs	66.908	71.504	68.480	67.522	66.702	60.708	62.670
Number of coding SNPs	21.048	21.231	21.332	20.338	20.152	19.077	19.250
Number of synonymous SNPs	11.229	11.294	11.312	10.778	10.633	10.075	10.211
Number of nonsynonymous SNPs	9.356	9.448	9.517	9.061	9.034	8.561	8.582
Number of indels	5.533	6.461	5.750	6.129	5.838	4.999	5.437
Number of coding indels	453	490	451	467	460	411	429

Supplemental Data References

1. Bjork, A., Jahnberg, P. (1975). Retinal dystrophy combined with alopecia. *Acta Ophthalmol (Copenh)* 53, 781-789.
2. Johnston, S.S., Darragh, J., Nevin, N.C. (1973). Hereditary macular degeneration in three generations. *Br J Ophthalmol* 57, 578-583.
3. Albrechtsen, B., Svendsen, I.B. (1956). Hypotrichosis, syndactyly, and retinal degeneration in two siblings. *Acta Derm Venereol* 36, 96-101.
4. Ohdo, S., Hirayama, K., Terawaki, T. (1983). Association of ectodermal dysplasia, ectrodactyly, and macular dystrophy: the EEM syndrome. *J Med Genet* 20, 52-57.
5. Kjaer, K.W., Hansen, L., Schwabe, G.C., Marques-de-Faria, A.P., Eiberg, H., Mundlos, S., Tommerup, N., Rosenberg, T. (2005). Distinct CDH3 mutations cause ectodermal dysplasia, ectrodactyly, macular dystrophy (EEM syndrome). *J Med Genet* 42, 292-298.
6. Hayakawa, M., Yanashima, K., Kato, K., Nakajima, A., Yamauchi, H. (1989). Association of ectodermal dysplasia, ectrodactyly and macular dystrophy: EEM syndrome (case report). *Ophthalmic Paediatr Genet* 10, 287-292.
7. Balarin Silva, V., Simoes, A.M., Marques-de-Faria, A.P. (1999). EEM syndrome: report of a family and results of a ten-year follow-up. *Ophthalmic Genet* 20, 95-99.
8. Senecky, Y., Halpern, G.J., Inbar, D., Attias, J., Shohat, M. (2001). Ectodermal dysplasia, ectrodactyly and macular dystrophy (EEM syndrome) in siblings. *Am J Med Genet* 101, 195-197.
9. Basel-Vanagaite, L., Pasmanik-Chor, M., Lurie, R., Yeheskel, A., Kjaer, K.W. (2010). CDH3-Related Syndromes: Report on a New Mutation and Overview of the Genotype-Phenotype Correlations. *Mol Syndromol* 1, 223-230.
10. Yildirim, M.S., Ogun, T.C., Kamis, U. (2006). Ectrodactyly, ectodermal dysplasia, macular degeneration syndrome: a further contribution. *Genet Couns* 17, 149-153.
11. Shimomura, Y., Wajid, M., Shapiro, L., Christiano, A.M. (2008). P-cadherin is a p63 target gene with a crucial role in the developing human limb bud and hair follicle. *Development* 135, 743-753.
12. Kuster, W., Majewski, F., Hammerstein, W. (1987). Alopecia, macular degeneration, and growth retardation: a new syndrome? *Am J Med Genet* 28, 477-481.
13. Cecatto-De-Lima, L., Pinheiro, M., Freire-Maia, N. (1988). Oculotrichodysplasia (OTD): a new probably autosomal recessive condition. *J Med Genet* 25, 430-432.
14. Marren, P., Wilson, C., Dawber, R.P., Walshe, M.M. (1992). Hereditary hypotrichosis (Marie-Unna type) and juvenile macular degeneration (Stargardt's maculopathy). *Clin Exp Dermatol* 17, 189-191.
15. Souied, E., Amalric, P., Chauvet, M.L., Chevallier, C., Le Hoang, P., Munnich, A., Kaplan, J. (1995). Unusual association of juvenile macular dystrophy with congenital hypotrichosis: occurrence in two siblings suggesting autosomal recessive inheritance. *Ophthalmic Genet* 16, 11-15.
16. Becker, M., Rohrschneider, K., Tilgen, W., Weber, B.H., Volcker, H.E. (1998). [Familial juvenile macular dystrophy with congenital hypotrichosis capitis]. *Ophthalmologie* 95, 233-240.
17. Raison-Peyron, N., Duval, P.A., Barneon, G., Durand, L., Arnaud, B., Meynadier, J., Hamel, C. (2000). A syndrome combining severe hypotrichosis and macular dystrophy: absence of mutations in TIMP genes. *Br J Dermatol* 143, 902-904.
18. Indelman, M., Hamel, C.P., Bergman, R., Nischal, K.K., Thompson, D., Surget, M.O., Ramon, M., Ganthos, H., Miller, B., Richard, G., et al. (2003). Phenotypic diversity and mutation spectrum in hypotrichosis with juvenile macular dystrophy. *J Invest Dermatol* 121, 1217-1220.
19. Sprecher, E., Bergman, R., Richard, G., Lurie, R., Shalev, S., Petronius, D., Shalata, A., Anbinder, Y., Leib, R., Perlman, I., et al. (2001). Hypotrichosis with juvenile macular dystrophy is caused by a mutation in CDH3, encoding P-cadherin. *Nat Genet* 29, 134-136.
20. Sato, M.T., Marzagão, R., Graff, C., Arana, J., A.T.R., M., Pagnan, N.A.B., Ribeiro, E.M.S.F., Moreira, C.A. (2002). Descrição de nova distrofia macular associada à síndrome dos cabelos anágenos frouxos. *Arq Bras Oftalmol* 65, 249-256.

21. Indelman, M., Bergman, R., Lurie, R., Richard, G., Miller, B., Petronius, D., Ciubutaro, D., Leib, R., Sprecher, E. (2002). A missense mutation in CDH3, encoding P-cadherin, causes hypotrichosis with juvenile macular dystrophy. *J Invest Dermatol* 119, 1210-1213.
22. Indelman, M., Leib, R., Jammal, A., Bergman, R., Sprecher, E. (2005). Molecular basis of hypotrichosis with juvenile macular dystrophy in two siblings. *Br J Dermatol* 153, 635-638.
23. Indelman, M., Eason, J., Hummel, M., Loza, O., Suri, M., Leys, M.J., Bayne, M., Schwartz, F.L., Sprecher, E. (2007). Novel CDH3 mutations in hypotrichosis with juvenile macular dystrophy. *Clin Exp Dermatol* 32, 191-196.
24. Jelani, M., Salman Chishti, M., Ahmad, W. (2009). A novel splice-site mutation in the CDH3 gene in hypotrichosis with juvenile macular dystrophy. *Clin Exp Dermatol* 34, 68-73.
25. Kamran-ul-Hassan Naqvi, S., Azeem, Z., Ali, G., Ahmad, W. (2010). A novel splice-acceptor site mutation in CDH3 gene in a consanguineous family exhibiting hypotrichosis with juvenile macular dystrophy. *Arch Dermatol Res* 302, 701-703.
26. Shimomura, Y., Wajid, M., Kurban, M., Christiano, A.M. (2010). Splice site mutations in the P-cadherin gene underlie hypotrichosis with juvenile macular dystrophy. *Dermatology* 220, 208-212.
27. Halford, S., Holt, R., Nemeth, A.H., Downes, S.M. (2012). Homozygous deletion in CDH3 and hypotrichosis with juvenile macular dystrophy. *Arch Ophthalmol* 130, 1490-1492.
28. Avitan-Hersh, E., Indelman, M., Khamaysi, Z., Leib, R., Bergman, R. (2012). A novel nonsense CDH3 mutation in hypotrichosis with juvenile macular dystrophy. *Int J Dermatol* 51, 325-327.
29. Mason, J.O., 3rd, Patel, S.A. (2015). A case of hypotrichosis with juvenile macular dystrophy. *Retin Cases Brief Rep* 9, 164-167.
30. Khan, A.O., Bolz, H.J. (2016). Phenotypic observations in "hypotrichosis with juvenile macular dystrophy" (recessive CDH3 mutations). *Ophthalmic Genet* 37, 301-306.
31. Ahmad, F., Ali, R.H., Muhammad, D., Nasir, A., Umair, M., Wakil, S.M., Ramzan, K., Basit, S., Ahmad, W. (2016). Novel homozygous sequence variants in the CDH3 gene encoding P-cadherin underlying hypotrichosis with juvenile macular dystrophy in consanguineous families. *Eur J Dermatol* 26, 610-612.
32. Singh, M.S., Broadgate, S., Mathur, R., Holt, R., Halford, S., MacLaren, R.E. (2016). Hypotrichosis and juvenile macular dystrophy caused by CDH3 mutation: A candidate disease for retinal gene therapy. *Sci Rep* 6, 23674.
33. Elfatoiki, F.Z., Cordoliani, F., Pascal Regane, P., Afforitt-Demoge, A. (2016). Hypotrichosis with juvenile macular dystrophy: Portuguese case. *Dermatol Online J* 22,
34. Hull, S., Arno, G., Robson, A.G., Broadgate, S., Plagnol, V., McKibbin, M., Halford, S., Michaelides, M., Holder, G.E., Moore, A.T., et al. (2016). Characterization of CDH3-Related Congenital Hypotrichosis With Juvenile Macular Dystrophy. *JAMA Ophthalmol* 134, 992-1000.
35. Blanco-Kelly, F., Rodrigues-Jacy da Silva, L., Sanchez-Navarro, I., Riveiro-Alvarez, R., Lopez-Martinez, M.A., Corton, M., Ayuso, C. (2017). New CDH3 mutation in the first Spanish case of hypotrichosis with juvenile macular dystrophy, a case report. *BMC Med Genet* 18, 1.
36. Da Cruz, L., McAllister, I.L. (2001). An Australian family with macular dystrophy linked to autosomal recessive alopecia universalis. *Br J Ophthalmol* 85, 239.
37. Frainer, R.H., de Abreu, L.B., Pinto, G.M., de Carvalho, A.V., Meneghello, L.P. (2013). Do you know this syndrome? *An Bras Dermatol* 88, 135-137.

6.2 CAPÍTULO II: HYPOTRICHOSSES ASSOCIATED TO SYNDROMES CAUSED BY MUTATIONS IN CDH3 GENE

Running head: Hypotrichoses in HMJD and EEM

Word count: 1773 (body text)

Table count: 4

Figure count: 1

Authors: JS Schauren¹, PSC Santos², F Mulinari-Brenner³, MT Sato⁴, MG Bicalho¹.

Affiliations:

¹ Departamento de Genética, Universidade Federal do Paraná - UFPR, Curitiba, Paraná, Caixa Postal 19071, Brazil.

² Institute of Evolutionary Ecology and Conservation Genomics, University of Ulm, Ulm, D-89069, Germany.

³ Departamento de Clínica Médica, Hospital de Clínicas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, Paraná, CEP 80.060-900, Brazil.

⁴ Departamento de Oftalmo-Otorrino da Faculdade de Medicina, Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, Paraná, CEP 80060-240, Brazil.

Corresponding author: Maria da Graça Bicalho. Laboratório de Imunogenética e Histocompatibilidade, Departamento de Genética, Setor de ciências biológicas, Universidade Federal do Paraná. Av. Cel. Francisco Heráclito dos Santos, s/n - Jardim das Americas, Curitiba - PR, 80050-540. E-mail: ligh@ufpr.br

Funding sources: CAPES and FUNPAR.

Conflict of interest disclosure: the authors declare no conflict of interest.

What's already known about this topic?

- Hypotrichosis with Juvenile Macular Dystrophy and Ectodermal dysplasia, Ectrodactyly and Macular Dystrophy are both diseases are caused by biallelic mutations in the *CDH3* gene which cause macular dystrophy and hypotrichosis.
- Patients have congenital sparse scalp hair.
- Disease presentation is heterogeneous.

What does this study add?

- There are at least 122 patients with Hypotrichosis with Juvenile Macular Dystrophy and 23 patients with Ectodermal dysplasia, Ectrodactyly and Macular dystrophy reported in literature.
- The predominant feature in both diseases is congenital short scalp hair which fails to grow in the majority of the patients
- There is still no resolved relationship between the clinical, genetic and dermatological data.
- Standard diagnostic criteria for each hereditary hypotrichosis need to be established and should include *CDH3* genotyping.
- Flattening, twisting and both conditions associated (*pili torti*) was the most consistent microscopic observation.

Abstract

Hypotrichosis with Juvenile Macular Dystrophy and Ectodermal dysplasia, Ectrodactyly and Macular Dystrophy are both diseases that are caused by biallelic mutations in the *CDH3* gene which cause macular dystrophy and hypotrichosis. Although the main feature of these diseases is sparse scalp hair and macular dystrophy, there is a considerable phenotypic variability between patients. With the aim of synthesizing the main hair findings of *CDH3* related disorders and discussing hypotrichosis heterogeneity, we reviewed the literature about these diseases. Our search retrieved 35 papers reporting new HJMD or EEM cases, from these, there were 122 patients with HJMD, 23 patients with EEM and 125 *CDH3* confirmed cases. Comparison of the dermatological information between HJMD and EEM patients did not reveal any correlation between a particular hair feature and one of the diseases, confirming that hypotrichosis phenotype is very similar in both diseases. The predominant feature in both diseases is congenital short scalp hair which fails to grow in the majority of the patients. Another common characteristic observed was hair thinning. Only six studies performed Scanning Electron Microscopy and all of them demonstrated hair abnormalities. Flattening, twisting and both conditions associated (*pili torti*) was the most consistent microscopic observation. Other microscopic features as well as eyebrows, eyelashes and body hair growth were not a consensus. There is still no resolved relationship between the clinical, genetic and dermatological data. Standard diagnostic criteria for each hereditary hypotrichosis need to be established and should include *CDH3* genotyping.

Introduction

Hypotrichosis with Juvenile Macular Dystrophy (HJMD [MIM: 601553]) and Ectodermal dysplasia, Ectrodactyly and Macular dystrophy (EEM [MIM: 225280]) are autosomal recessive diseases which cause macular dystrophy and hypotrichosis. EEM patients also have limb abnormalities and, sometimes, teeth are affected too. Both diseases are caused by biallelic mutations in the *CDH3* gene^{1,2}. Several studies have been published about HJMD and EEM, all of them reporting patients with sparse scalp hair and macular dystrophy. Even though these characteristics are common considering a global analysis, there is a considerable phenotypic variability between patients, even between patients of the same family³.

Whilst macular dystrophy has been frequently discussed^{3,4}, hair loss phenotypes was less explored in most investigations⁴⁻⁹. Vision impairment caused by macular dystrophy certainly interfere more in life quality than hypotrichosis. Nevertheless, the latter has also important consequences, such as psychological distress, anxiety and depression¹⁰.

Hypotrichosis is a hair disorder in which hair fails to grow¹¹. There are five groups of hair disorders associated with macular dystrophy: 1) alopecia congenita¹², 2) alopecia areata¹³, 3) congenital hypotrichosis^{14,15}, 4) Marie Unna Hypotrichosis¹⁶ and 5) Loose Anagen Hair Syndrome¹⁷. All of these can be classified in group B of ectodermal dysplasias¹⁸. Here we include the latter three as types of hypotrichoses associated to the HJMD.

Although the causes of HJMD and EEM are known and the effects of mutations in the *CDH3* gene on p-cadherin have already been studied in hair follicles¹⁹, no explanation is available for the clinical heterogeneity presented in the hair growth phenotype of these patients. This review was written aiming at synthesizing the main hair findings of *CDH3* related disorders and discussing hypotrichosis heterogeneity.

Methods

MEDLINE/Pubmed database was searched to identify studies. Online Mendelian Inheritance In Men (OMIM) was also consulted. There was no period restriction and the search was held until January 2017. The keywords searched were: “macular dystrophy”, “retinal dystrophy”, “hypotrichosis”, “Hypotrichosis with Juvenile Macular Dystrophy” and “Ectodermal dysplasia, Ectrodactyly and Macular dystrophy”. The search for the combined terms “(macular dystrophy) and (hypotrichosis)” retrieved 43 results. From these, only 29 were case reports with characteristics of HJMD or EEM. The search was supplemented by reviewing the reference lists of the retrieved articles and OMIM to identify additional studies. Cases with further symptoms, such as growth retardation and/or mental retardation were considered not eligible for this study. Taking into account patients’ phenotypes, we considered three studies^{8,20,21} as EEM or HJMD although the authors do not explicitly state this classification. In this review we included relevant data from our unpublished study. The count of the number of cases included every individual reported in each study, proband or not.

Results and Discussion

Our search retrieved 35 papers reporting new HJMD or EEM cases. The number of reported cases increased in the last 20 years (Fig. 1), which can be assigned to the increase of medical knowledge about these conditions. As given in table 1, there were 122 HJMD, 23 EEM and 125 CDH3 confirmed cases since the first report in 1935. Despite the increased interest on these conditions, the correlation between clinical, genetical and dermatological data is not yet well resolved.

The main dermatological information and microscopy results from each HJMD and EEM paper are summarized in tables 2 and 3, respectively. The number of studies reporting each dermatological feature is presented in table 4. Comparison of the dermatological information between HJMD and EEM patients did not reveal any correlation between a particular hair feature and one of the diseases, confirming that hypotrichosis phenotype is very similar in both diseases.

Out of the thirty three studies with dermatological information (twenty six in HJMD and seven in EEM), the predominant feature in both diseases is congenital short scalp hair which fails to grow in the majority of the patients. Most patients reported seldom or no haircuts needed in their lives. The fact that female patients from five studies stated that they regularly wear wigs is evidential for the concern posed by this condition. In patients from four studies, hair growth improved during the first or second decade of life, although it remained sparse. Another common characteristic observed was hair thinning, which was reported by eleven studies. Diameter variations were observed in a few patients. Hair pull test was performed in eleven studies, from which six had positive and five had negative results. This test did not reveal any significant difference pointing at either direction. The presence of sparse eyelashes and eyebrows is also not a consensus. Out of the seventeen studies that mentioned these characteristics, ten reported normal growth and seven reported sparse eyelashes and eyebrows. Only 10 studies mentioned body and/or pubic and axillary hair phenotype, which is not a unanimity either. Six of them stated that patient's body hair and/or pubic and axillary hair was normal. Unusual findings were cleft lip and palate, dry skin, keratosis pilaris, follicular keratosis, café-au-lait spots and centrofacial lentiginosis. All five studies which performed sweat tests reported normal results.

Only fifteen studies have performed a more detailed analysis of the scalp hair by microscopy of the wires and/or biopsy of the scalp. Three studies reported normal hair in Light

Microscopy. In contrast, all of the six studies which performed Scanning Electron Microscopy demonstrated hair abnormalities, reassuring the importance of this analysis for understanding the relation between the microscopic findings and the phenotype. Flattening, twisting and both conditions associated (*pili torti*) was the most consistent microscopic observation, present in eight of the fifteen studies reviewed. In one of these studies²², some areas of flattening were interpreted as consistent with pseudomonilethrix. Dystrophic hair bulbs were observed in four studies. Trichorrhexis nodosa-like hair was also found in four studies. Canalicular alterations (longitudinal groove) was observed only in our 2 studies from Brazil²³(unpublished). Cuticle clefts, loose cuticle, fragile wires, structural changes in the orifices, abnormal shape (resembling *pili trianguli et canaliculi*), peeling, folding, scaling and clubbing on free ends were isolated findings of which some may be divergent from previous findings due to the lack of nomenclature uniformity. The lack of a standard diagnostic criteria for each hereditary hypotrichosis²⁴ and the phenotypic variation presented in patients makes it difficult to reach a consensus.

In an attempt to analyse a homogeneous subgroup of patients, Bergman and colleagues²⁵ studied the histopathology of the scalp of 6 patients with HJMD bearing the same mutations in *CDH3* gene^{26,27}. More catagen-telogen hair follicles were observed in five cases, and an increased ratio of vellus hair follicles to terminal hair follicles was observed in two cases²⁵. As there were no signs of inflammation or scarring, the most frequently found pattern resembled that of chronic telogen effluvium²⁵. Phenotype varied from mild to notable hair loss. Independently of the degree of hypotrichosis, all patients had short hair leading to a complete abstinence from haircuts. Even in patients bearing the same mutations, the phenotype was not uniform.

A possible hypothesis to explain the heterogeneity in hypotrichosis phenotypes are the variations in hair keratins, as three different hair keratins (KRT36, KRT37, and KRT84) transcription is significantly upregulated by P-cadherin silencing¹⁹. Abnormal hair keratin expression profile may relate to the observed hair shaft inhibition in vitro and/or to the abnormal hair phenotype seen in HJMD patients in vivo¹⁹. Although this remains to be functionally tested in protein assay, the absence of functional P-cadherin signaling may lead to overexpression and/or miscombination of selected hair shaft keratins, impairing hair shaft structure and resilience¹⁹.

Marren et al (1992) described two siblings with Hereditary hypotrichosis (Marie-Unna type) and juvenile macular degeneration (Stargardt's maculopathy)¹⁶. Hair loss pattern, hair

distribution and texture are indicative of Marie-Unna Hypotrichosis (MUH [MIM: 146550 and 612841]). Microscopy shows flattening and twisting, a common finding in HJMD cases with SEM results. Longitudinal ridging (groove) was also observed in this case, although it was not a regular finding in MUH²⁴. The SEM image of this patient¹⁶ was very similar to ours in which we describe abnormal shape resembling pili trianguli et canaliculi (unpublished). This similarity in microscopic alterations between Marren's cases and ours raise a question: could these cases described by Marren be a HJMD case with phenotypic heterogeneity? *CDH3* genotyping could help to answer it. One may question: and what is the relation of Stargardt's maculopathy in Marren's cases with HJMD? Trying to answer this question, we bring another study to the discussion. Frainer and coworkers reported a female patient with hypotrichosis and a previous diagnosis of Stargardt disease²¹. Here we classified this case as HJMD because of the clinical findings and considering that Stargardt disease is also a macular dystrophy. Accordingly, one case with the original diagnostic of Stargardt disease was proved to be HJMD after *CDH3* genotyping⁵. Hence, to answer these questions we suggest that *CDH3* genotyping should be performed in every patient with macular dystrophy and hypotrichosis. Using the same rationale, although macular dystrophies associated with alopecia^{12,13,28} were not included in this review, we suggest that *CDH3* genotyping should be performed in these patients in order to answer if alopecia congenita and childhood onset alopecia are also phenotypic variations of *CDH3* related syndromes.

Conclusions

Although the number of HJMD and EEM reported cases had increased in the last 20 years, there is still no resolved relationship between the clinical, genetic and dermatological data. Standard diagnostic criteria for each hereditary hypotrichosis need to be established and should include *CDH3* genotyping. Further studies are needed to enhance the knowledge of the heterogeneity of *CDH3* related syndromes.

References

- 1 Sprecher E, Bergman R, Richard G *et al.* Hypotrichosis with juvenile macular dystrophy is caused by a mutation in CDH3, encoding P-cadherin. *Nat Genet* 2001; **29**: 134-6.
- 2 Kjaer KW, Hansen L, Schwabe GC *et al.* Distinct CDH3 mutations cause ectodermal dysplasia, ectrodactyly, macular dystrophy (EEM syndrome). *J Med Genet* 2005; **42**: 292-8.
- 3 Hull S, Arno G, Robson AG *et al.* Characterization of CDH3-Related Congenital Hypotrichosis With Juvenile Macular Dystrophy. *JAMA Ophthalmol* 2016; **134**: 992-1000.
- 4 Khan AO, Bolz HJ. Phenotypic observations in "hypotrichosis with juvenile macular dystrophy" (recessive CDH3 mutations). *Ophthalmic Genet* 2016; **37**: 301-6.
- 5 Halford S, Holt R, Nemeth AH *et al.* Homozygous deletion in CDH3 and hypotrichosis with juvenile macular dystrophy. *Arch Ophthalmol* 2012; **130**: 1490-2.
- 6 Mason JO, 3rd, Patel SA. A case of hypotrichosis with juvenile macular dystrophy. *Retin Cases Brief Rep* 2015; **9**: 164-7.
- 7 Singh MS, Broadgate S, Mathur R *et al.* Hypotrichosis and juvenile macular dystrophy caused by CDH3 mutation: A candidate disease for retinal gene therapy. *Sci Rep* 2016; **6**: 23674.
- 8 Da Cruz L, McAllister IL. An Australian family with macular dystrophy linked to autosomal recessive alopecia universalis. *Br J Ophthalmol* 2001; **85**: 239.
- 9 Hayakawa M, Yanashima K, Kato K *et al.* Association of ectodermal dysplasia, ectrodactyly and macular dystrophy: EEM syndrome (case report). *Ophthalmic Paediatr Genet* 1989; **10**: 287-92.
- 10 Hunt N, McHale S. The psychological impact of alopecia. *BMJ* 2005; **331**: 951-3.
- 11 de Berker D. Congenital hypotrichosis. *Int J Dermatol* 1999; **38 Suppl 1**: 25-33.
- 12 Johnston SS, Darragh J, Nevin NC. Hereditary macular degeneration in three generations. *Br J Ophthalmol* 1973; **57**: 578-83.
- 13 Kuster W, Majewski F, Hammerstein W. Alopecia, macular degeneration, and growth retardation: a new syndrome? *Am J Med Genet* 1987; **28**: 477-81.
- 14 Albrechtsen B, Svendsen IB. Hypotrichosis, syndactyly, and retinal degeneration in two siblings. *Acta Derm Venereol* 1956; **36**: 96-101.
- 15 Souied E, Amalric P, Chauvet ML *et al.* Unusual association of juvenile macular dystrophy with congenital hypotrichosis: occurrence in two siblings suggesting autosomal recessive inheritance. *Ophthalmic Genet* 1995; **16**: 11-5.
- 16 Marren P, Wilson C, Dawber RP *et al.* Hereditary hypotrichosis (Marie-Unna type) and juvenile macular degeneration (Stargardt's maculopathy). *Clin Exp Dermatol* 1992; **17**: 189-91.
- 17 Sato MT, Marzagão R, Graff C *et al.* Descrição de nova distrofia macular associada à síndrome dos cabelos anágenos frouxos. *Arq Bras Oftalmol* 2002; **65**: 249-56.
- 18 Freire-Maia N. Ectodermal dysplasias revisited. *Acta Genet Gemellol* 1997; **26**: 121-131.
- 19 Samuelov L, Sprecher E, Tsuruta D *et al.* P-cadherin regulates human hair growth and cycling via canonical Wnt signaling and transforming growth factor-beta2. *J Invest Dermatol* 2012; **132**: 2332-41.
- 20 Cecatto-De-Lima L, Pinheiro M, Freire-Maia N. Oculotrichodysplasia (OTD): a new probably autosomal recessive condition. *J Med Genet* 1988; **25**: 430-2.
- 21 Frainer RH, de Abreu LB, Pinto GM *et al.* Do you know this syndrome? *An Bras Dermatol* 2013; **88**: 135-7.

- 22 Indelman M, Eason J, Hummel M *et al*. Novel CDH3 mutations in hypotrichosis with juvenile macular dystrophy. *Clin Exp Dermatol* 2007; **32**: 191-6.
- 23 Sato MT. Distrofia Retiniana com Onda Rápida Escotópica (DRORE) Associada à Síndrome dos Cabelos Anágenos Frouxos. In: *Programa de Pós-Graduação em Clínica Cirúrgica do Setor de Ciências da Saúde*, Vol. Doutorado. Curitiba: Universidade Federal do Paraná. 2002; 128.
- 24 Al Aboud K, Al Aboud D. Marie-Unna hereditary hypotrichosis or autosomal recessive hereditary hypotrichosis with woolly hair: the diagnostic dilemma of labeling cases with hypotrichosis. *Pediatr Dermatol* 2011; **28**: 750-1; author reply 1-2.
- 25 Bergman R, Sapir M, Sprecher E. Histopathology of hypotrichosis with juvenile macular dystrophy. *Am J Dermatopathol* 2004; **26**: 205-9.
- 26 Indelman M, Bergman R, Lurie R *et al*. A missense mutation in CDH3, encoding P-cadherin, causes hypotrichosis with juvenile macular dystrophy. *J Invest Dermatol* 2002; **119**: 1210-3.
- 27 Indelman M, Hamel CP, Bergman R *et al*. Phenotypic diversity and mutation spectrum in hypotrichosis with juvenile macular dystrophy. *J Invest Dermatol* 2003; **121**: 1217-20.
- 28 Bjork A, Jahnberg P. Retinal dystrophy combined with alopecia. *Acta Ophthalmol (Copenh)* 1975; **53**: 781-9.
- 29 Kroll P. [Congenital dystrophy of the pigment layer of the posterior pole with congenital total hypotrichosis (author's transl)]. *Klin Monbl Augenheilkd* 1981; **178**: 118-20.
- 30 Becker M, Rohrschneider K, Tilgen W *et al*. [Familial juvenile macular dystrophy with congenital hypotrichosis capitis]. *Ophthalmologe* 1998; **95**: 233-40.
- 31 Raison-Peyron N, Duval PA, Barneon G *et al*. A syndrome combining severe hypotrichosis and macular dystrophy: absence of mutations in TIMP genes. *Br J Dermatol* 2000; **143**: 902-4.
- 32 Indelman M, Leibur R, Jammal A *et al*. Molecular basis of hypotrichosis with juvenile macular dystrophy in two siblings. *Br J Dermatol* 2005; **153**: 635-8.
- 33 Shimomura Y, Wajid M, Shapiro L *et al*. P-cadherin is a p63 target gene with a crucial role in the developing human limb bud and hair follicle. *Development* 2008; **135**: 743-53.
- 34 Jelani M, Salman Chishti M, Ahmad W. A novel splice-site mutation in the CDH3 gene in hypotrichosis with juvenile macular dystrophy. *Clin Exp Dermatol* 2009; **34**: 68-73.
- 35 Kamran-ul-Hassan Naqvi S, Azeem Z, Ali G *et al*. A novel splice-acceptor site mutation in CDH3 gene in a consanguineous family exhibiting hypotrichosis with juvenile macular dystrophy. *Arch Dermatol Res* 2010; **302**: 701-3.
- 36 Shimomura Y, Wajid M, Kurban M *et al*. Splice site mutations in the P-cadherin gene underlie hypotrichosis with juvenile macular dystrophy. *Dermatology* 2010; **220**: 208-12.
- 37 Avitan-Hersh E, Indelman M, Khamaysi Z *et al*. A novel nonsense CDH3 mutation in hypotrichosis with juvenile macular dystrophy. *Int J Dermatol* 2012; **51**: 325-7.
- 38 Ahmad F, Ali RH, Muhammad D *et al*. Novel homozygous sequence variants in the CDH3 gene encoding P-cadherin underlying hypotrichosis with juvenile macular dystrophy in consanguineous families. *Eur J Dermatol* 2016; **26**: 610-2.
- 39 Elfatoiki FZ, Cordoliani F, Pascal Regane P *et al*. Hypotrichosis with juvenile macular dystrophy: Portuguese case. *Dermatol Online J* 2016; **22**.

- 40 Blanco-Kelly F, Rodrigues-Jacy da Silva L, Sanchez-Navarro I *et al.* New CDH3 mutation in the first Spanish case of hypotrichosis with juvenile macular dystrophy, a case report. *BMC Med Genet* 2017; **18**: 1.
- 41 Ohdo S, Hirayama K, Terawaki T. Association of ectodermal dysplasia, ectrodactyly, and macular dystrophy: the EEM syndrome. *J Med Genet* 1983; **20**: 52-7.
- 42 Balarin Silva V, Simoes AM, Marques-de-Faria AP. EEM syndrome: report of a family and results of a ten-year follow-up. *Ophthalmic Genet* 1999; **20**: 95-9.
- 43 Senecky Y, Halpern GJ, Inbar D *et al.* Ectodermal dysplasia, ectrodactyly and macular dystrophy (EEM syndrome) in siblings. *Am J Med Genet* 2001; **101**: 195-7.
- 44 Basel-Vanagaite L, Pasmanik-Chor M, Lurie R *et al.* CDH3-Related Syndromes: Report on a New Mutation and Overview of the Genotype-Phenotype Correlations. *Mol Syndromol* 2010; **1**: 223-30.
- 45 Yildirim MS, Ogun TC, Kamis U. Ectrodactyly, ectodermal dysplasia, macular degeneration syndrome: a further contribution. *Genet Couns* 2006; **17**: 149-53.

Figure legend

Figure 1: Bar graph of HJMD, EEM and CDH3 confirmed cases reported by year

Figure 1 is a bar graph representing the number of new cases by every five years since the first literature report.

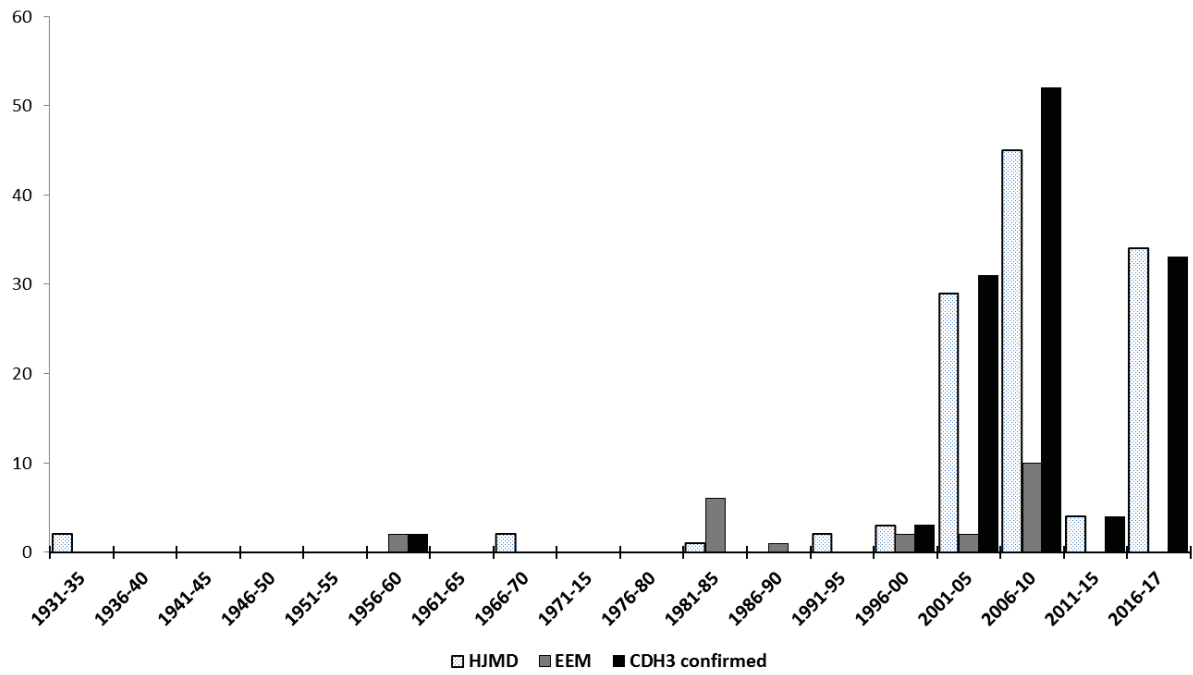


Table 1: Number of HJMD, EEM and CDH3 confirmed cases reported by year

Year	1931	1936	1941	1946	1951	1956	1961	1966	1971	1976	1981	1986	1991	1996	2001	2006	2011	2016	Total
	1935	1940	1945	1950	1955	1960	1965	1970	1975	1980	1985	1990	1995	2000	2005	2010	2015	2017	
HJMD	2	0	0	0	0	0	0	2	0	0	1	0	2	3	29	45	4	34	122
EEM	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0	6	1	0	2	2	10	0	0	23
HJMD+EEM	2	0	0	0	0	2	0	2	0	0	7	1	2	5	31	55	4	34	145
CDH3	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	3	31	52	4	33	125

The number of HJMD and EEM cases reported every 5 years, the sum of EEM and HJMD cases, the number of CDH3 confirmed cases and the total number of patients in each category are depicted in table 1.

Table 2: Dermatological information and microscopy results from HJMD cases reported in literature

Number of affected individuals	CDH3 mutation	Dermatological information	Microscopy	Reference
2	Not investigated	Not available	Not available	Wagner 1935 apud OMIM (601553) ^a
2	Not investigated	Not available	Not available	Yasakura et al. 1967 apud OMIM (601553) ^a
1	Not investigated	Patient was born with hypotrichosis congenital totalis. Scalp hair growth improved from 2 to 5 years old and then remained sparse and lanugo-like. Axillary and pubic hair were sparse. Eyebrows and eyelashes had normal growth.	No	29
2	Not investigated	Siblings had short sparse scalp hair since birth and had never had a haircut. The sister wears a wig. Authors suggest that the hair disorder could be a Marie-Unna type hypotrichosis.	No	15
2	Not investigated	A dermatological examination revealed a markedly thinned, diminished, blond and partly dyed, in both sisters. White, easily plucked terminal hair of the head. The eyelashes and eyebrows were darkblond and distinctly rarefied with the older sister. There was a keratosis pilaris on both upper arms. The remaining hairs of both sisters on legs, arms, axilla and genital region were inconspicuous. Dermatologically, all other family members were inconspicuous.	The microscopic examination of single hairs showed a normal hair shaft, dystrophic hair roots, and, also pigmented hair.	30
1	Yes	Physical examination revealed a fine sparse hair. Patient wears a wig since her second decade. There was no dermatological disease present. The eyebrows were present, the axillary and pubic hair was diminished and there were no eyelashes.	Trichogram and PLM showed no abnormalities. LM of a hairless area of the scalp showed scattered follicles. Most of them were in the catagen or telogen phase with a fibrous band beneath.	27,31
11	Yes	Patients were born with seemingly normal hair but developed alopecia in the scalp at around 3 months. A partial regrowth of short and sparse hair occurred at puberty.	SEM images demonstrated flattening of the shaft. LM showed pili torti with 180° twisting. Skin biopsies from the scalp showed normal histological findings, with the exception of a reduced ratio of terminal versus vellus hair follicles.	1

Number of affected individuals	CDH3 mutation	Dermatological information	Microscopy	Reference
4	Yes	<p>Patients had short sparse hair in childhood without need for frequent cutting. From the second decade of life on, hair was still short but covered the scalp satisfactorily. Hair was easily plucked with gentle traction and the trichogram showed anagen shafts with a uniform thickness, and dystrophic telogen and anagen bulbs. Gentle traction tests were positive with anagen hairs. Body hair, sweat test, teeth and nails were normal. Results were compatible with Loose Anagen Hair Syndrome.</p>	<p>SEM showed canalicular alterations and dystrophic anagen bulbs. Three relatives with no clinical alterations also presented canalicular formations under SEM.</p>	17 and unpublished data
4	Yes	<p>Children were born with sparse hair, which failed to grow thereafter. Examination showed sparse scalp hair that could not be easily pulled. Body hair was normal.</p>	<p>SEM and LM: Periodic angulations along hair shaft (pili torti).^b</p>	26
9 patients in 5 families (1 described above ³¹)	Yes	<p>Abnormal sparse hair at birth that never grew thereafter. Most individuals had short hair and firmly rooted in the scalp, except for two individual whose hair was easily plucked out (family 5). These two patients also displayed centrofacial lentiginosis. Family 3 also presented keratosis pilaris.</p>	<p>Family 2 and 3 samples were not available. Family 4 presented pili torti. Family 5 presented telogen effluvium in 2 of the 3 affected individuals.^b</p>	27
2	Yes	<p>Sparse and short hair without any haircut since birth. Examination showed short, coarse and sparse hair over the scalp only. Hair pull test and scalp skin texture were normal. No other abnormal skin sign was noticed.</p>	No	32
4	Yes	<p>Patient 1 was born with sparse scalp hair, with limited growth throughout his childhood. Hair growth increased during his late teenage years although the hair remains extremely sparse. The hair is fine and curly, and can easily be plucked from the scalp. Patients 2-4 were born with sparse hair. Eyebrows and eyelashes are normal. Primary teeth were discoloured and nail dystrophy was observed early in life in the eldest child, but these defects resolved as this patient matured with no changes in scalp hair.</p>	<p>LM examination of patient 1 showed telogen hairs of varying diameter but without complete 180° twists. Some areas of flattening were interpreted as consistent with pseudomonilethrix.</p>	22
4 (Family 1), 12 (Family 2) and 6 (Family 3)	Yes	<p>Sparse hair that fails to grow.</p>	No	33
6	Yes	<p>Patients were born with sparse scalp hair that had limited growth throughout life. The scalp hair was fine and curly, and easily pulled out. Eyebrows and eyelashes, pelvic and pubic hair, teeth, fingernails and toenails showed normal growth.</p>	No	34

Number of affected individuals	CDH3 mutation	Dermatological information	Microscopy	Reference
6	Yes	Patients were born with sparse scalp hair that had limited growth throughout life. In two affected females, scalp hairs were completely missing at the time of birth. Eyebrows, eyelashes, pubic and pelvic hair were thin and had sparse growth. Skin, fingernails, toenails and teeth were normal.	No	35
7	Yes	Patients had short hair with decreased density since birth. Physical examination demonstrated generalized scalp hypotrichosis, more pronounced in the oldest patients. None of the patients had limb deformities.	No	36
2	Yes .	Patients had very fine, sparse hair that never thickened, with a persistently visible scalp.	No	5
1	Yes	Patient had hypotrichosis with short and slow-growing hair present since birth. There was no family history of hypotrichosis.. The physical examination revealed sparse short hairs over the entire scalp without erythema or scale. The hair pull test was negative. The eyebrows and eyelashes were normal, and there were no associated abnormalities of his teeth, nails, or limbs.	Histopathological examination of scalp biopsy demonstrated a reduced number of hair follicles, with an increased ratio of catagen–telogen follicles.	37
1	Yes	Patient had sparse hair at 4 years old and poor hair growth.	No	6
4	Yes	Subject 1 has scalp hypotrichosis, no eyelashes and wears a wig. Subject 2 has scalp hypotrichosis and slow nail growth. Subject 3 has scalp hypotrichosis. Subject 4 did not have frank hypotrichosis but he reported slow hair growth.	No	4
8	Yes	Family A has sparse, short and curly scalp hair, with stunted growth since birth. Eyebrows were normal. Affected members of family B displayed slow hair growth since birth. Hair was firmly-rooted fine and sparse with persistently visible scalp. Both families nails, teeth and sweating were normal.	No	38
4	Yes	Patients from family 2 were born with thin sparse scalp hair with no growth. Both sisters wear wigs. One of them has cleft lip and palate. Patients from family 3 were born with thin sparse scalp hair. The elder brother is more severely affected. Male relatives present androgenetic alopecia.	LM and SEM from family 2 showed thin hair, bulb dystrophy, cuticle clefts, trichorrhexis nodosa, longitudinal groove, abnormal shape, twists, loose cuticle and diameter variations. LM of hair shafts from family 3 patients demonstrated telogen hairs. SEM evaluation revealed longitudinal groove, bulb dystrophy, abnormal shape (polygonal hair resembling pili trianguli et canalicii), flattening and dystrophic anagen bulb.	Unpublished data
1	Yes	Patient had sparse and short scalp hair.	No	7

Number of affected individuals	CDH3 mutation	Dermatological information	Microscopy	Reference
1	Not investigated	Patient had short and slowly growing hair since birth. Physical examination revealed hypotrichosis, sparse short hairs over the entire scalp without alopecia or erythema. The hair pull test was negative. The eyebrows and eyelashes were normal and no abnormalities of skin, sweating, teeth or nails were noted.	Trichogram analysis demonstrated a reduced diameter of hair and PLM examination showed non-specific hair dystrophy.	39
15 affected, 10 studied (1 described above ²⁷)	Yes	Patients had thin scalp hair from at least early childhood, with normal hair elsewhere, including eyebrows. All patients had normal limbs, except for patient 1 who had limb abnormalities, suggesting EEMS.	No	3
1	Yes	Patient had absence of growing hair since the 1st year of age, pale skin, sparse scalp hair, a reduction of hair density on eyebrows and follicular keratosis in many parts of the body. The suspected diagnosis was Keratosis Follicularis Spinulosa Decalvans and Retinitis Pigmentosa Inversa. Examination at the age of 14 and 15 revealed generalised pale and dry skin, hypotrichosis that was confined to scalp, face (no incipient beard nor moustache at the age of 16) and arms. Scalp hair was blond and brittle (suggestive of pili torti), eyebrows and eyelashes appeared normal.	A skin biopsy demonstrated a reduction in the number of scalp follicles, absence of sebaceous glands and infundibular cyst with keratin granules.	40
3	Not investigated	Patient had marked hair thinning and loss involving the entire head.	No	8 c
2	Not investigated	Patient has thin and brittle hair, with lack of hair growth since her childhood. Patient has never had her hair cut. Scalp examinations shows diffuse capillary rarefaction with short, thin and fragile wires.	LM shows normal telogen hairs	21 d

Legend: ^a as these studies were unavailable in MEDLINE, information was obtained from OMIM; ^b Histopathology study performed ²⁵; ^c Probably HJMD (Macular dystrophy linked to autosomal recessive alopecia universalis); ^d Probably HJMD Stargardt's macular dystrophy and congenital hypotrichosis. Abbreviations: LM, Light Microscopy; PLM, Polarized Light Microscopy; SEM, Scanning Electron Microscopy.

Table 3: Dermatological information and microscopy results from EEM cases reported in literature

Number of affected individuals	CDH3 mutation	Dermatological information	Microscopy	Reference
2	Yes	Two siblings with sparse, thin and short hair.	No	14 apud ^{41, 2}
6 (one died in infancy)	Not investigated	All the five patients examined had very sparse, thin and short hair. Eyebrows and eyelashes from patients 1, 3, 4 and 5 were also thin and sparse.	No	41
2	Not investigated	The sister was born with hypotrichosis. Examination at 28 years showed generalized hypotrichosis with sparse scalp, axillary and pubic hair. Eyelashes were scanty and eyebrows were sparse in the distal two thirds. She had normal sweating and her skin was dry and scaling. Her brother had less severe hypotrichosis.	SEM: sister had structural changes in the orifices, peeling, scaling, dystrophic bulbs and clubbing on free ends. Brother hair presented only folding and scaling.	20 a
1	Not investigated	Scalp hair failed to grow and remained the same as during infancy. The patient wears a wig.	No	9
2	Yes	Partial hypotrichosis with sparse eyebrows and eyelashes. Nails, sweating, and body hair were normal. Café-au-lait spots.		2,42
2	Yes	The sister was born with sparse scalp hair. The brother presented sparse hair at the age of one year. Re-evaluation 10 years later showed that the hair was still sparse and slow growing with normal and eyebrows and eyelashes.	SEM: Pili torti. LM: flattening and angulations. PLM: shaft twisting of 180°, flattening and angulations.	43,44
3	No	Patients' hair was very sparse, thin and short. Eyebrows and eyelashes were also sparse and thin. Axillary hair and pubic hair were normal.	No	45
5 (Family 4) and 2 (Family 5)	Yes	Family 4 patients have sparse hair. In family 5, the younger patient exhibits severe hypotrichosis with trichorrhexis nodosa-like hair shaft. The elder patient shows mild hypotrichosis with pili torti-like hair shaft twisting.	Trichorrhexis nodosa-like hair shaft and pili torti-like hair shaft twisting.	33

Legend: ^a Probably EEM (Retinitis pigmentosa, trichodysplasia, dental anomalies and onychodysplasia). Abbreviations: LM, Light Microscopy; PLM, Polarized Light Microscopy; SEM, Scanning Electron Microscopy.

Table 4: Number of studies reporting the dermatological features in HJMD and EEM

Feature	HJMD	EEM	Total
Growth improved but remained sparse	4	0	4
Fail to grow/limited growth	16	3	19
Never had haircut	3	0	3
Wig	4	1	5
Thinning	9	3	12
Varying diameter	2	0	2
Sparse eyebrows and eyelashes	7	2	9
Normal eyebrows and eyelashes	10	1	11
Sparse axillary and pubic hair	3	1	4
Normal axillary and pubic hair	2	1	3
Normal body hair	3	1	4
Not easily plucked/firmly rooted	3	0	3
Easily plucked	5	0	5
Pull test normal/negative	3	0	3
Reduced ratio terminal versus vellus hair	1	0	1
Gentle traction anagen	1	0	1
Cleft lip and palate	1	0	1
Centrofacial lentiginosis	1	0	1
Café-au-lait spots	0	1	1
Normal sweat	3	2	5
Dry skin	1	1	2
Keratosis pilaris	2	0	2
Follicular keratosis	1	0	1
Telogen efluvium	1	0	1
Increased ratio catagen telogen	1	0	1
Pili torti or twists or flattening	6	2	8
Pseudomoniletrix	1	0	1
Dystrophyc hair roots/bulb	3	1	4
Trichorrhexis nodosa-like hair	3	1	4
Canalicular alterations/longitudinal groove	2	0	2
Normal hair under light microscopy	3	0	3
Cuticle clefts, abnormal shape, loose cuticle	1	0	1
Fragile wires	1	0	1
Structural changes in the orifices, peeling, scaling, clubbing on free ends. Brother hair presented only folding and scaling.	0	1	1

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Neste trabalho realizamos uma investigação genética e clínica de três famílias com distrofia macular associada à hipotricose. Essa investigação levou ao diagnóstico de HJMD nas três famílias, todas portadoras de mutações bialélicas no gene *CDH3*. Duas destas mutações são variantes novas e foram submetidas em uma base de dados internacional (ClinVar). Esta é a primeira descrição de HJMD com confirmação genética de HJMD na América Latina. A análise por sequenciamento de exomas nos permitiu descartar uma série de genes candidatos supostamente envolvidos na patogênese da doença. Os resultados aqui apresentados reforçam que a presença de mutações no gene *CDH3* são o principal critério para confirmar o diagnóstico de HJMD. Além disso, descrevemos pela primeira vez uma variante deste gene segregando com a síndrome dos cabelos anágenos frouxos em uma das famílias.

Na tentativa de compreender a heterogeneidade apresentada nas hipotricoses associadas a distrofias maculares e sintetizar suas principais características fenotípicas, realizamos uma revisão sistemática da literatura. Nessa revisão, foram encontrados 122 pacientes com HJMD e 23 pacientes com EEM, um número bem maior do que o previamente conhecido. Apesar do crescimento no número de casos de HJMD e EEM publicados, ainda não existe uma relação direta entre os dados clínicos, genéticos e dermatológicos. A principal característica clínica encontrada foi a presença de cabelos curtos ao nascimento que falham em crescer, geralmente finos e, quando observados por microscopia, apresentam-se torcidos e/ou achatados. Poucos estudos realizaram análises mais detalhadas, como a microscopia dos fios de cabelo e a biópsia de couro cabeludo, o que dificulta a definição das características fenotípicas específicas destas hipotricoses. Para tanto, critérios diagnósticos padronizados para as hipotricoses associadas a distrofias maculares precisam ser estabelecidos e devem incluir o sequenciamento para identificar a presença de mutação no gene *CDH3*.

Os resultados encontrados nesse trabalho contribuem para o aumento do conhecimento clínico e genético das distrofias maculares associadas a alopecias causadas por mutações no gene *CDH3*, no entanto, mais estudos são necessários

para compreensão da variabilidade inter e intrafamiliar e da fisiopatologia da HJMD e das demais distrofias retinianas associadas a alopecias. Por ser uma doença rara e pouco conhecida no Brasil, desenvolvemos um folheto para divulgar a HJMD para os médicos brasileiros, principalmente para os dermatologistas que recebem as crianças com hipotricose antes de desenvolverem a perda de visão.

REFERÊNCIAS

ABDEL-RAOUF, H., et al. **Loose anagen hair syndrome in children of Upper Egypt.** J Cosmet Dermatol, v.8, n.2, Jun, p.103-7. 2009.

AHMAD, F., et al. **Novel homozygous sequence variants in the CDH3 gene encoding P-cadherin underlying hypotrichosis with juvenile macular dystrophy in consanguineous families.** Eur J Dermatol, v.26, n.6, Dec 01, p.610-612. 2016.

ALEXANDER, P., et al. **Retinal pigment epithelium transplantation: concepts, challenges, and future prospects.** Eye (Lond), v.29, n.8, Aug, p.992-1002. 2015.

AVITAN-HERSH, E., et al. **A novel nonsense CDH3 mutation in hypotrichosis with juvenile macular dystrophy.** Int J Dermatol, v.51, n.3, Mar, p.325-7. 2012.

BALARIN SILVA, V., A. M. SIMOES e A. P. MARQUES-DE-FARIA. **EEM syndrome: report of a family and results of a ten-year follow-up.** Ophthalmic Genet, v.20, n.2, Jun, p.95-9. 1999.

BAMSHAD, M. J., et al. **Exome sequencing as a tool for Mendelian disease gene discovery.** Nat Rev Genet, v.12, n.11, Nov, p.745-55. 2011.

BAR-YOSEF, U., et al. **CHX10 mutations cause non-syndromic microphthalmia/anophthalmia in Arab and Jewish kindreds.** Hum Genet, v.115, n.4, Sep, p.302-9. 2004.

BASEL-VANAGAITE, L., et al. **CDH3-Related Syndromes: Report on a New Mutation and Overview of the Genotype-Phenotype Correlations.** Mol Syndromol, v.1, n.5, p.223-230. 2010.

BAYLOR, D. A. e M. E. BURNS. **Control of rhodopsin activity in vision.** Eye (Lond), v.12 (Pt 3b), p.521-5. 1998.

BECKER, M., et al. **[Familial juvenile macular dystrophy with congenital hypotrichosis capitis].** Ophthalmologe, v.95, n.4, Apr, p.233-40. 1998.

BJORK, A. e P. JAHNBERG. **Retinal dystrophy combined with alopecia.** Acta Ophthalmol (Copenh), v.53, n.5, Nov, p.781-9. 1975.

BLANCO-KELLY, F., et al. **New CDH3 mutation in the first Spanish case of hypotrichosis with juvenile macular dystrophy, a case report.** BMC Med Genet, v.18, n.1, Jan 07, p.1. 2017.

BUJAKOWSKA, K., et al. **CRB1 mutations in inherited retinal dystrophies.** Hum Mutat, v.33, n.2, Feb, p.306-15. 2011.

BURKE, J. M., et al. **Expression of E-cadherin by human retinal pigment epithelium: delayed expression in vitro.** Invest Ophthalmol Vis Sci, v.40, n.12, Nov, p.2963-70. 1999.

BURKE, T. R. e S. H. TSANG. **Allelic and phenotypic heterogeneity in ABCA4 mutations.** Ophthalmic Genet, v.32, n.3, Sep, p.165-74. 2011.

BURSTEDT, M. S. e I. GOLOVLEVA. **Central retinal findings in Bothnia dystrophy caused by RLBP1 sequence variation.** Arch Ophthalmol, v.128, n.8, Aug, p.989-95. 2010.

CAILLIEZ, F. e R. LAVERY. **Cadherin mechanics and complexation: the importance of calcium binding.** Biophys J, v.89, n.6, Dec, p.3895-903. 2005.

CANTATORE-FRANCIS, J. L. e S. J. ORLOW. **Practical guidelines for evaluation of loose anagen hair syndrome.** Arch Dermatol, v.145, n.10, Oct, p.1123-8. 2009.

CAVENDER, J. C. **Hereditary macular dystrophies.** Philadelphia: J.B. Lippincott Company, v.3. 1990 (Duane's Clinical Ophthalmology)

CECATTO-DE-LIMA, L.,M. PINHEIRO e N. FREIRE-MAIA. **Oculotrichodysplasia (OTD): a new probably autosomal recessive condition.** J Med Genet, v.25, n.6, Jun, p.430-2. 1988.

CHAPALAIN, V., et al. **Is the loose anagen hair syndrome a keratin disorder? A clinical and molecular study.** Arch Dermatol, v.138, n.4, Apr, p.501-6. 2002.

COE. **Centro de Oftalmologia Especializada** Disponível em: <<http://www.coemaria.com.br/dicas.html>>. Acesso em: 17/10/2014.

DA CRUZ, L. e I. L. MCALLISTER. **An Australian family with macular dystrophy linked to autosomal recessive alopecia universalis.** Br J Ophthalmol, v.85, n.2, Feb, p.239. 2001.

DHURAT, R. P. e D. J. DESHPANDE. **Loose anagen hair syndrome**. Int J Trichology, v.2, n.2, Jul, p.96-100. 2010.

ELFATOIKI, F. Z., et al. **Hypotrichosis with juvenile macular dystrophy: Portuguese case**. Dermatol Online J, v.22, n.5, May 15. 2016.

ELLINGFORD, J. M., et al. **Molecular findings from 537 individuals with inherited retinal disease**. J Med Genet, May 11. 2016.

FARALDO, M. M., et al. **beta-Catenin regulates P-cadherin expression in mammary basal epithelial cells**. FEBS Lett, v.581, n.5, Mar 6, p.831-6. 2007.

FERDA PERCIN, E., et al. **Human microphthalmia associated with mutations in the retinal homeobox gene CHX10**. Nat Genet, v.25, n.4, Aug, p.397-401. 2000.

FRAINER, R. H., et al. **Do you know this syndrome?** An Bras Dermatol, v.88, n.1, Jan-Feb, p.135-7. 2013.

FUSE, N., et al. **Molecular cloning of cDNA encoding a novel microphthalmia-associated transcription factor isoform with a distinct amino-terminus**. J Biochem, v.126, n.6, Dec, p.1043-51. 1999.

GEMENETZI, M. e A. J. LOTERY. **Phenotype/genotype correlation in a case series of Stargardt's patients identifies novel mutations in the ABCA4 gene**. Eye (Lond), Aug 16. 2013.

GUYTON, A. C. e J. E. HALL. **Tratado de Fisiologia Médica**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan S.A., v.9. 1996. 1014 p. (Nona edição)

HALFORD, S., et al. **Homozygous deletion in CDH3 and hypotrichosis with juvenile macular dystrophy**. Arch Ophthalmol, v.130, n.11, Nov, p.1490-2. 2012.

HANSEN, L. K., F. BRANDRUP e O. CLEMMENSEN. **Loose anagen hair syndrome associated with colobomas and dysmorphic features**. Clin Dysmorphol, v.13, n.1, Jan, p.31-2. 2004.

HAYAKAWA, M., et al. **Association of ectodermal dysplasia, ectrodactyly and macular dystrophy: EEM syndrome (case report)**. Ophthalmic Paediatr Genet, v.10, n.4, Dec, p.287-92. 1989.

HEUBERGER, J. e W. BIRCHMEIER. **Interplay of cadherin-mediated cell adhesion and canonical Wnt signaling**. Cold Spring Harb Perspect Biol, v.2, n.2, Feb, p.a002915. 2010.

HEVER, A. M.,K. A. WILLIAMSON e V. VAN HEYNINGEN. **Developmental malformations of the eye: the role of PAX6, SOX2 and OTX2**. Clin Genet, v.69, n.6, Jun, p.459-70. 2006.

HUELSKEN, J., et al. **beta-Catenin controls hair follicle morphogenesis and stem cell differentiation in the skin**. Cell, v.105, n.4, May 18, p.533-45. 2001.

HULL, S., et al. **Characterization of CDH3-Related Congenital Hypotrichosis With Juvenile Macular Dystrophy**. JAMA Ophthalmol, v.134, n.9, Sep 01, p.992-1000. 2016.

HUNT, N. e S. MCHALE. **The psychological impact of alopecia**. BMJ, v.331, n.7522, Oct 22, p.951-3. 2005.

IDT. **OligoAnalyzer® program**. Coralville, USA,2012. Disponível em: <http://www.idtdna.com/Scitools>

INDELMAN, M., et al. **A missense mutation in CDH3, encoding P-cadherin, causes hypotrichosis with juvenile macular dystrophy**. J Invest Dermatol, v.119, n.5, Nov, p.1210-3. 2002.

INDELMAN, M., et al. **Novel CDH3 mutations in hypotrichosis with juvenile macular dystrophy**. Clin Exp Dermatol, v.32, n.2, Mar, p.191-6. 2007.

INDELMAN, M., et al. **Phenotypic diversity and mutation spectrum in hypotrichosis with juvenile macular dystrophy**. J Invest Dermatol, v.121, n.5, Nov, p.1217-20. 2003.

INDELMAN, M., et al. **Molecular basis of hypotrichosis with juvenile macular dystrophy in two siblings**. Br J Dermatol, v.153, n.3, Sep, p.635-8. 2005.

JELANI, M.,M. SALMAN CHISHTI e W. AHMAD. **A novel splice-site mutation in the CDH3 gene in hypotrichosis with juvenile macular dystrophy**. Clin Exp Dermatol, v.34, n.1, Jan, p.68-73. 2009.

JOHNSTON, S. S.,J. DARRAGH e N. C. NEVIN. **Hereditary macular degeneration in three generations**. Br J Ophthalmol, v.57, n.8, Aug, p.578-83. 1973.

JONES, B. W., et al. **Retinal remodeling**. Jpn J Ophthalmol, v.56, n.4, Jul, p.289-306. 2012.

JONES, B. W., et al. **Retinal remodeling triggered by photoreceptor degenerations**. J Comp Neurol, v.464, n.1, Sep 08, p.1-16. 2003.

JONES, S. E., C. JOMARY e M. J. NEAL. **Expression of TIMP3 mRNA is elevated in retinas affected by simplex retinitis pigmentosa**. FEBS Lett, v.352, n.2, Sep 26, p.171-4. 1994.

JUNQUEIRA, L. C. U. e J. CARNEIRO. Pele e anexos. In: G. Koogan (Ed.). Histologia Básica. Rio de Janeiro, 2004. Pele e anexos, p.359-371

KAMRAN-UL-HASSAN NAQVI, S., et al. **A novel splice-acceptor site mutation in CDH3 gene in a consanguineous family exhibiting hypotrichosis with juvenile macular dystrophy**. Arch Dermatol Res, v.302, n.9, Nov, p.701-3. 2010.

KHAN, A. O. e H. J. BOLZ. **Phenotypic observations in "hypotrichosis with juvenile macular dystrophy" (recessive CDH3 mutations)**. Ophthalmic Genet, v.37, n.3, Sep, p.301-6. 2016.

KJAER, K. W., et al. **Distinct CDH3 mutations cause ectodermal dysplasia, ectrodactyly, macular dystrophy (EEM syndrome)**. J Med Genet, v.42, n.4, Apr, p.292-8. 2005.

KORESSAAR, T. e M. REMM. **Enhancements and modifications of primer design program Primer3**. Bioinformatics, v.23, n.10, May 15, p.1289-91. 2007.

KREMMIDIOTIS, G., et al. **Localization of human cadherin genes to chromosome regions exhibiting cancer-related loss of heterozygosity**. Genomics, v.49, n.3, May 1, p.467-71. 1998.

KROLL, P. **[Congenital dystrophy of the pigment layer of the posterior pole with congenital total hypotrichosis (author's transl)]**. Klin Monbl Augenheilkd, v.178, n.2, Feb, p.118-20. 1981.

KUDO, S., et al. **Structural and thermodynamic characterization of the self-adhesive properties of human P-cadherin**. Mol Biosyst, v.8, n.8, Aug, p.2050-3. 2012.

KUSTER, W.,F. MAJEWSKI e W. HAMMERSTEIN. **Alopecia, macular degeneration, and growth retardation: a new syndrome?** Am J Med Genet, v.28, n.2, Oct, p.477-81. 1987.

LAHIRI, D. K. e J. I. NURNBERGER, JR. **A rapid non-enzymatic method for the preparation of HMW DNA from blood for RFLP studies.** Nucleic Acids Res, v.19, n.19, Oct 11, p.5444. 1991.

LAMBA, D. A., et al. **Generation, purification and transplantation of photoreceptors derived from human induced pluripotent stem cells.** PLoS One, v.5, n.1, Jan 20, p.e8763. 2010.

LEK, M., et al. **Analysis of protein-coding genetic variation in 60,706 humans.** Nature, v.536, n.7616, Aug 18, p.285-91. 2016.

LI, H. e R. DURBIN. **Fast and accurate long-read alignment with Burrows-Wheeler transform.** Bioinformatics, v.26, n.5, Mar 01, p.589-95. 2010.

LIUTKEVICIENE, R., et al. **Inherited macular dystrophies and differential diagnostics.** Medicina (Kaunas), v.48, n.9, p.485-95. 2012.

MALANSON, K. M. e J. LEM. **Rhodopsin-mediated retinitis pigmentosa.** Prog Mol Biol Transl Sci, v.88, p.1-31. 2009.

MAO, C. A., et al. **Eomesodermin, a target gene of Pou4f2, is required for retinal ganglion cell and optic nerve development in the mouse.** Development, v.135, n.2, Jan, p.271-80. 2008.

MARC, R. E., et al. **Neural remodeling in retinal degeneration.** Prog Retin Eye Res, v.22, n.5, Sep, p.607-55. 2003.

MARREN, P., et al. **Hereditary hypotrichosis (Marie-Unna type) and juvenile macular degeneration (Stargardt's maculopathy).** Clin Exp Dermatol, v.17, n.3, May, p.189-91. 1992.

MASON, J. O., 3RD e S. A. PATEL. **A case of hypotrichosis with juvenile macular dystrophy.** Retin Cases Brief Rep, v.9, n.2, Spring, p.164-7. 2015.

MATSUSHIMA, D.,W. HEAVNER e L. H. PEVNY. **Combinatorial regulation of optic cup progenitor cell fate by SOX2 and PAX6.** Development, v.138, n.3, Feb, p.443-54. 2011.

MCCAA, C. S. **The eye and visual nervous system: anatomy, physiology and toxicology.** Environ Health Perspect, v.44, Apr, p.1-8. 1982.

MELLOUGH, C. B.,D. H. STEEL e M. LAKO. **Genetic basis of inherited macular dystrophies and implications for stem cell therapy.** Stem Cells, v.27, n.11, Nov, p.2833-45. 2009.

MICHAELIDES, M.,D. M. HUNT e A. T. MOORE. **The genetics of inherited macular dystrophies.** J Med Genet, v.40, n.9, Sep, p.641-50. 2003.

MOLDAY, R. S. e K. ZHANG. **Defective lipid transport and biosynthesis in recessive and dominant Stargardt macular degeneration.** Prog Lipid Res, v.49, n.4, Oct, p.476-92. 2010.

MORIMURA, H., et al. **Mutations in RGR, encoding a light-sensitive opsin homologue, in patients with retinitis pigmentosa.** Nat Genet, v.23, n.4, Dec, p.393-4. 1999.

MURPHY, M. F.,F. G. MCGINNITY e G. E. ALLEN. **New familial association between ocular coloboma and loose anagen syndrome.** Clin Genet, v.47, n.4, Apr, p.214-6. 1995.

NAG, T. C. e S. WADHWA. **Ultrastructure of the human retina in aging and various pathological states.** Micron, v.43, n.7, Jul, p.759-81. 2012.

NAKAZAWA, M.,Y. WADA e M. TAMAI. **Arrestin gene mutations in autosomal recessive retinitis pigmentosa.** Arch Ophthalmol, v.116, n.4, Apr, p.498-501. 1998.

OHDO, S.,K. HIRAYAMA e T. TERAWAKI. **Association of ectodermal dysplasia, ectrodactyly, and macular dystrophy: the EEM syndrome.** J Med Genet, v.20, n.1, Feb, p.52-7. 1983.

PAGNAN, N. A. e A. F. VISINONI. **Update on ectodermal dysplasias clinical classification.** Am J Med Genet A, Aug 6. 2014.

PAREDES, J., et al. **Epithelial E- and P-cadherins: role and clinical significance in cancer.** Biochim Biophys Acta, v.1826, n.2, Dec, p.297-311. 2012.

PAUS, R. e G. COTSARELIS. **The biology of hair follicles**. N Engl J Med, v.341, n.7, Aug 12, p.491-7. 1999.

PEPE, I. M. **Recent advances in our understanding of rhodopsin and phototransduction**. Prog Retin Eye Res, v.20, n.6, Nov, p.733-59. 2001.

PHAM, C. M. e J. KREJCI-MANWARING. **Loose anagen hair syndrome: an underdiagnosed condition in males**. Pediatr Dermatol, v.27, n.4, Jul-Aug, p.408-9. 2010.

PORTER, R. M., et al. **Keratin K6irs is specific to the inner root sheath of hair follicles in mice and humans**. Br J Dermatol, v.145, n.4, Oct, p.558-68. 2001.

PRICE, V. H. e C. L. GUMMER. **Loose anagen syndrome**. J Am Acad Dermatol, v.20, n.2 Pt 1, Feb, p.249-56. 1989.

RAISON-PEYRON, N., et al. **A syndrome combining severe hypotrichosis and macular dystrophy: absence of mutations in TIMP genes**. Br J Dermatol, v.143, n.4, Oct, p.902-4. 2000.

SAARI, J. C. e J. W. CRABB. **Focus on molecules: cellular retinaldehyde-binding protein (CRALBP)**. Exp Eye Res, v.81, n.3, Sep, p.245-6. 2005.

SAMTOOLS. **SAM Tools - Utilities for the Sequence Alignment/Map (SAM) format**. Disponível em: <<http://samtools.sourceforge.net/samtools.shtml>>. Acesso em: 28/10/2014.

SAMUELOV, L., et al. **P-cadherin regulates human hair growth and cycling via canonical Wnt signaling and transforming growth factor-beta2**. J Invest Dermatol, v.132, n.10, Oct, p.2332-41. 2012.

SANGER, F.,S. NICKLEN e A. R. COULSON. **DNA sequencing with chain-terminating inhibitors**. Proc Natl Acad Sci U S A, v.74, n.12, Dec, p.5463-7. 1977.

SATO, M. T. Distrofia Retiniana com Onda Rápida Escotópica (DRORE) Associada à Síndrome dos Cabelos Anágenos Frouxos. Programa de Pós-Graduação em Clínica Cirúrgica do Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2002. 128 p.

SATO, M. T., et al. **Loose anagen hair syndrome associated with macular dystrophy: a family description.** Anais Brasileiros de Dermatologia, v.79, n.6, p.725-731. 2004.

SATO, M. T., et al. **Descrição de nova distrofia macular associada à síndrome dos cabelos anágenos frouxos.** Arq Bras Oftalmol, v.65, p.249-56. 2002.

SATO, M. T., R. MARZAGÃO e C. A. MOREIRA JÚNIOR. **Distrofia retiniana com onda rápida escotópica (DRORE) associada à síndrome dos cabelos anágenos frouxos (SCAF). Parte I: Achados oftalmológicos.** Arq Bras Oftalmol, v.67, p.491-9. 2004.

SATO, M. T., et al. **Distrofia retiniana com onda rápida escotópica (DRORE) associada à síndrome dos cabelos anágenos frouxos (SCAF). Parte II: Genética.** Arq Bras Oftalmol, v.67, n.4, p.621-30. 2004.

SEMALTY, M., et al. **Hair growth and rejuvenation: an overview.** J Dermatolog Treat, v.22, n.3, Jun, p.123-32. 2011.

SENECKY, Y., et al. **Ectodermal dysplasia, ectrodactyly and macular dystrophy (EEM syndrome) in siblings.** Am J Med Genet, v.101, n.3, Jul 1, p.195-7. 2001.

SENGILLO, J. D., et al. **Correction of Monogenic and Common Retinal Disorders with Gene Therapy.** Genes (Basel), v.8, n.2, Jan 27. 2017.

SHAO, J., P. Y. ZHOU e G. H. PENG. **Experimental Study of the Biological Properties of Human Embryonic Stem Cell-Derived Retinal Progenitor Cells.** Sci Rep, v.7, Feb 13, p.42363. 2017.

SHIMOMURA, Y. **Congenital hair loss disorders: rare, but not too rare.** J Dermatol, v.39, n.1, Jan, p.3-10. 2012.

SHIMOMURA, Y. e A. M. CHRISTIANO. **Biology and genetics of hair.** Annu Rev Genomics Hum Genet, v.11, p.109-32. 2010.

SHIMOMURA, Y., et al. **Splice site mutations in the P-cadherin gene underlie hypotrichosis with juvenile macular dystrophy.** Dermatology, v.220, n.3, p.208-12. 2010.

SHIMOMURA, Y., et al. **P-cadherin is a p63 target gene with a crucial role in the developing human limb bud and hair follicle.** *Development*, v.135, n.4, Feb, p.743-53. 2008.

SHIMOYAMA, Y., et al. **Cadherin cell-adhesion molecules in human epithelial tissues and carcinomas.** *Cancer Res*, v.49, n.8, Apr 15, p.2128-33. 1989.

SHIMOYAMA, Y., et al. **Molecular cloning of a human Ca²⁺-dependent cell-cell adhesion molecule homologous to mouse placental cadherin: its low expression in human placental tissues.** *J Cell Biol*, v.109, n.4 Pt 1, Oct, p.1787-94. 1989.

SINGH, H. P., et al. **Homozygous null mutations in the ABCA4 gene in two families with autosomal recessive retinal dystrophy.** *Am J Ophthalmol*, v.141, n.5, May, p.906-13. 2006.

SINGH, M. S., et al. **Hypotrichosis and juvenile macular dystrophy caused by CDH3 mutation: A candidate disease for retinal gene therapy.** *Sci Rep*, v.6, May 09, p.23674. 2016.

SOUIED, E., et al. **Unusual association of juvenile macular dystrophy with congenital hypotrichosis: occurrence in two siblings suggesting autosomal recessive inheritance.** *Ophthalmic Genet*, v.16, n.1, Mar, p.11-5. 1995.

SPRECHER, E., et al. **Hypotrichosis with juvenile macular dystrophy is caused by a mutation in CDH3, encoding P-cadherin.** *Nat Genet*, v.29, n.2, Oct, p.134-6. 2001.

TANG, P. H., et al. **RPE65 is present in human green/red cones and promotes photopigment regeneration in an in vitro cone cell model.** *J Neurosci*, v.31, n.50, Dec 14, p.18618-26. 2011.

THOMPSON, D. A., et al. **Mutations in the gene encoding lecithin retinol acyltransferase are associated with early-onset severe retinal dystrophy.** *Nat Genet*, v.28, n.2, Jun, p.123-4. 2001.

TUSON, M., G. MARFANY e R. GONZALEZ-DUARTE. **Mutation of CERKL, a novel human ceramide kinase gene, causes autosomal recessive retinitis pigmentosa (RP26).** *Am J Hum Genet*, v.74, n.1, Jan, p.128-38. 2004.

UCHIDA, C. **The retinoblastoma protein: functions beyond the G1-S regulator.** *Curr Drug Targets*, v.13, n.13, Dec, p.1622-32. 2012.

UNTERGASSER, A., et al. **Primer3--new capabilities and interfaces**. *Nucleic Acids Res*, v.40, n.15, Aug, p.e115. 2012.

VAZQUEZ-CHONA, F. R., A. M. CLARK e E. M. LEVINE. **Rlbp1 promoter drives robust Muller glial GFP expression in transgenic mice**. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, v.50, n.8, Aug, p.3996-4003. 2009.

WAGNER, K. D., et al. **The Wilms' tumor gene Wt1 is required for normal development of the retina**. *EMBO J*, v.21, n.6, Mar 15, p.1398-405. 2002.

WANG, K., M. LI e H. HAKONARSON. **ANNOVAR: functional annotation of genetic variants from high-throughput sequencing data**. *Nucleic Acids Res*, v.38, n.16, Sep, p.e164. 2010.

WANG, Z., et al. **Type II epithelial keratin 6hf (K6hf) is expressed in the companion layer, matrix, and medulla in anagen-stage hair follicles**. *J Invest Dermatol*, v.121, n.6, Dec, p.1276-82. 2003.

WEBER, B. H., et al. **Mutations in the tissue inhibitor of metalloproteinases-3 (TIMP3) in patients with Sorsby's fundus dystrophy**. *Nat Genet*, v.8, n.4, Dec, p.352-6. 1994.

WEISHAUPT, J. H., N. KLOCKER e M. BAHR. **Axotomy-induced early down-regulation of POU-IV class transcription factors Brn-3a and Brn-3b in retinal ganglion cells**. *J Mol Neurosci*, v.26, n.1, p.17-25. 2005.

WELLIK, D. M. e M. R. CAPECCHI. **Hox10 and Hox11 genes are required to globally pattern the mammalian skeleton**. *Science*, v.301, n.5631, Jul 18, p.363-7. 2003.

XU, L., P. A. OVERBEEK e L. W. RENEKER. **Systematic analysis of E-, N- and P-cadherin expression in mouse eye development**. *Exp Eye Res*, v.74, n.6, Jun, p.753-60. 2002.



XUE, L., et al. **A palmitoylation switch mechanism in the regulation of the visual cycle**. *Cell*, v.117, n.6, Jun 11, p.761-71. 2004.

YAMAKI, K., et al. **Structural organization of the human S-antigen gene. cDNA, amino acid, intron, exon, promoter, in vitro transcription, retina, and pineal gland**. *J Biol Chem*, v.265, n.34, Dec 5, p.20757-62. 1990.

YE, J., et al. **Primer-BLAST: a tool to design target-specific primers for polymerase chain reaction.** BMC Bioinformatics, v.13, p.134. 2012.

YILDIRIM, M. S., T. C. OGUN e U. KAMIS. **Ectrodactyly, ectodermal dysplasia, macular degeneration syndrome: a further contribution.** Genet Couns, v.17, n.2, p.149-53. 2006.

APÊNDICE 1 - Termo de consentimento livre e esclarecido.

	LIGH – UFPR: Laboratório de Imunogenética e Histocompatibilidade do Departamento de Genética da Universidade Federal do Paraná	
---	---	---

**Laboratório de Imunogenética e Histocompatibilidade (LIGH) do
Departamento de Genética da Universidade Federal do Paraná**
Av. Cel. Francisco Heráclito dos Santos 100
Caixa Postal 19071, CEP 81530-900, Curitiba-PR
Diretora: Profa. Dra. Maria da Graça Bicalho
Coordenador científico: Dr. Pablo Sandro Carvalho Santos
Fone/Fax (41) 3361-1729 ; Email: ligh@ufpr.br

Identificação

**Termo de Consentimento Livre e Esclarecido:
Informações para Participantes do Projeto Achados Clínicos e Genéticos de
Doenças Oftalmológicas Hereditárias**

Prezada senhora, prezado senhor,

nós, Mario Teruo Sato, Maria da Graça Bicalho, Pablo Sandro Carvalho Santos, Juliana da Silveira Schauen e Ana Claudia Gomes Torres, pesquisadores da Universidade Federal do Paraná (UFPR), estamos convidando o(a) senhor(a), portador de doença oftalmológica, familiar ou voluntário para o grupo controle, a participar do estudo intitulado "Achados clínicos e genéticos de doenças oftalmológicas hereditárias".

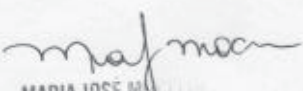
Este estudo está sendo conduzido em Curitiba, e tem o Laboratório de Imunogenética e Histocompatibilidade (LIGH) do Departamento de Genética da UFPR, juntamente com a clínica Retina e Vítreo Consultoria e o Centro Hospitalar de Reabilitação Ana Carolina Moura Xavier como instituições responsáveis. Alguns passos do projeto serão conduzidos por alunos de pós-graduação do UFPR.

Resumo sobre genética e estudos genéticos:

Todas as pessoas carregam toda sua informação genética em cada célula do seu corpo. Esta informação genética serve de modelo para o funcionamento de todas as nossas células e está presente sob a forma de um ácido chamado DNA. As pequenas sequências que compõem o DNA são os genes do genoma humano, que contém cerca de 30.000 genes. Com base em estudos anteriores, temos razões para supor que alterações em certos genes envolvidos com a visão possam causar doenças ou síndromes que afetem os olhos.

Objetivo e duração deste trabalho:

Este estudo vai investigar se as pessoas que possuem alterações em determinados genes são mais propensas a ter certas doenças que afetam os olhos com o objetivo de aumentar o conhecimento das bases genéticas das doenças oftalmológicas hereditárias e contribuir para o avanço científico. O estudo começou em maio de 2013 e tem fim previsto para 2023, podendo ser prorrogado por mais 5 anos caso haja necessidade.



MARIA JOSÉ M. S. L. M.
Membro do Comitê de Ética em Pesquisa
em Seres Humanos do HU UFPR
Matrícula 7462

Rubricas:
 Sujeito da Pesquisa/ responsável legal _____
 Pesquisador Responsável ou quem aplicou o
 TCLE _____



LIGH – UFPR: Laboratório de Imunogenética e
Histocompatibilidade do Departamento de Genética da
Universidade Federal do Paraná



Caso você participe da pesquisa, será necessário:

Responder ao questionário que será aplicado pelos pesquisadores e doar uma amostra de sangue (10 mL). A coleta de sangue será realizada um única vez, neste local, após o esclarecimento de eventuais dúvidas, a leitura e a assinatura deste documento. É possível que o(a) senhor(a) experimente algum desconforto, devido à dor pela picada da agulha utilizada para a coleta de sangue, bem como pequenos hematomas que possam vir a ocorrer mas que não causam dano.

Se o(a) senhor(a) é paciente ou familiar, também poderá ser convidado a realizar os exames oftalmológicos e dermatológicos necessários para estabelecer um diagnóstico, caso este ainda não tenha sido feito. Estes exames serão realizados na clínica Retina e Vítreo Consultoria (Rua Mateus Leme, 2285, Centro Cívico, Curitiba), no Centro Hospitalar de Reabilitação Ana Carolina Moura Xavier (R. Quintino Bocaiúva, 329, Cabral, Curitiba) ou no Hospital de Clínicas da UFPR (R. Gen. Carneiro, 181 - Alto da Glória, Curitiba). É possível que o(a) senhor(a) experimente algum desconforto decorrente dos exames oftalmológicos, em especial do uso da lente de contato rígida no exame do eletrorretinograma. Além disso, há risco de efeitos colaterais relacionados ao uso de colírios dilatadores da pupila e do corante fluoresceína.

Seus dados pessoais:

Neste estudo, fotografias e dados pessoais que lhe dizem respeito serão coletados. Estes dados ficarão acessíveis somente para os membros deste projeto de pesquisa que assinam este documento. Ao longo de todo o estudo, a confidencialidade dos seus dados será estritamente mantida. Seu nome não aparecerá de modo algum em relatórios ou publicações decorrentes deste estudo. Seu sangue será descartado imediatamente após a extração do DNA. Seu DNA será usado exclusivamente para o propósito deste estudo.

Outras considerações:

As despesas necessárias para a realização da pesquisa não são de sua responsabilidade e pela sua participação no estudo você não receberá qualquer valor em dinheiro.

Pessoas de contato:

Durante todo o tempo de atividade deste projeto de pesquisa, você pode esclarecer dúvidas ou pedir mais informações contactando uma ou mais das seguintes pessoas:

Dr. Mário Sato (médico oftalmologista, sato.mario@gmail.com, telefone: 041 9979-9588) ou
Dr. Pablo S. Carvalho Santos (coordenador científico do LIGH, pablo.ligh@gmail.com, telefone: 99077102) ou

Sra. Juliana Schauben (doutoranda, julianaschauben@gmail.com, telefone: 041 9784-9155) ou
Sra. Ana Cláudia M. B. G. Torres (mestranda, anaclaudiambraga@gmail.com, telefone: 041 8821-7914) ou

Profa. Dra. Maria da Graça Bicalho (diretora do LIGH, ligh@ufpr.br, telefone: 041 3361-1546).

Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos - CEP do Hospital de Clínicas/UFPR (Rua General Carneiro, 181 - Curitiba/PR. Telefone: 041 3360-1041).

Se o(a) senhor(a) não tem mais nenhuma pergunta, e concorda em participar desta pesquisa, por favor rubricue todas as folhas deste documento e assine uma cópia do Termo de Consentimento. O(a) senhor(a) pode ficar com uma cópia do Termo e com uma cópia deste folheto informativo.

Em nome de todos os membros do projeto, muito obrigado ☺


MARIA JOSE M. B. G. TORRES
Membro do Comitê de Ética em Pesquisa
em Seres Humanos de
Maturidade 7462

Rubricas:

Sujeito da Pesquisa/ responsável legal _____

Pesquisador Responsável ou quem aplicou o
TCLE _____

**Termo de Consentimento Livre e Esclarecido:
Achados Clínicos e Genéticos de Doenças Oftalmológicas Hereditárias**

Com este documento, **eu**,

Nome e sobrenome

_____/_____/_____
Data de Nascimento

RG ou CPF

() _____
telefone fixo

() _____
telefone celular

E-mail

declaro que estou disposto(a) a participar voluntariamente da investigação científica citada acima. **Eu** fui informado(a) sobre o projeto "Achados clínicos e genéticos de doenças oftalmológicas hereditárias", e não tenho dúvidas a respeito do mesmo. **Eu** fui informado(a) oralmente e por escrito sobre o significado, os objetivos e os riscos associados às pesquisas e coletas de material biológico para o projeto. **Eu** tive oportunidade de esclarecer minhas dúvidas sobre o projeto e sobre o tratamento que será dado às minhas amostras e informações pessoais. **Eu** li as informações presentes neste termo de consentimento, compreendi a natureza e objetivo do estudo do qual concordei em participar e recebi uma cópia do mesmo. **Eu** estou ciente da minha possibilidade de anular o meu consentimento a qualquer momento. Dessa forma, as informações coletadas sobre mim e meu material biológico coletado serão prontamente descartados. **Eu** entendo que os meus dados pessoais e minhas amostras biológicas estão sob a responsabilidade do laboratório LIGH da Universidade Federal do Paraná.

_____/_____/_____
Cidade e data de hoje

Assinatura da(o) participante da pesquisa

Para uso da equipe de pesquisa

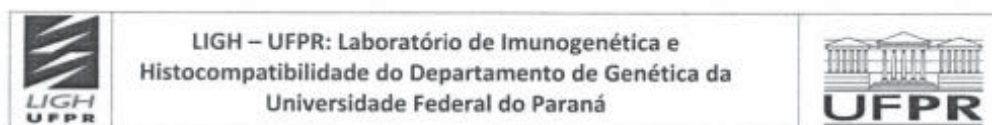
Declaro ter informado por escrito e oralmente o participante (ou representante legal) do estudo "Achados clínicos e genéticos de doenças oftalmológicas hereditárias" sobre as consequências e os riscos associados às pesquisas, tendo-lhe dado uma cópia deste termo de consentimento e ter obtido voluntariamente seu consentimento.

_____/_____/_____
Cidade e data de hoje

Assinatura do membro do projeto de pesquisa


MARIA JOSE M.
Membro do Comitê de Ética em Seres Humanos do F...
Método 7462

APÊNDICE 2 - Termo de assentimento informado livre e esclarecido.



Identificação

Laboratório de Imunogenética e Histocompatibilidade (LIGH) do
Departamento de Genética da Universidade Federal do Paraná
Av. Cel. Francisco Heráclito dos Santos 100
Caixa Postal 19071, CEP 81530-900, Curitiba-PR
Diretora: Profa. Dra. Maria da Graça Bicalho
Coordenador científico: Dr. Pablo Sandro Carvalho Santos
Fone/Fax (41) 3361-1729 ; Email: ligh@ufpr.br

Termo de Assentimento Informado Livre e Esclarecido (para participantes da pesquisa menores de 18 anos)

Título do Projeto: Achados Clínicos e Genéticos de Doenças Oftalmológicas Hereditárias

Investigadores: Mario Teruo Sato, Maria da Graça Bicalho, Pablo Sandro Carvalho Santos, Juliana da Silveira Schauern e Ana Cláudia Gomes Torres.

Local da Pesquisa: Laboratório de Imunogenética e Histocompatibilidade (LIGH) do Departamento de Genética da Universidade Federal do Paraná (UFPR).

O que significa assentimento?

O assentimento significa que você concorda em fazer parte de um grupo de crianças ou adolescentes, da sua faixa de idade, para participar de uma pesquisa. Serão respeitados seus direitos e você receberá todas as informações por mais simples que possam parecer.

Pode ser que este documento denominado TERMO DE ASSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO contenha palavras que você não entenda. Por favor, peça ao responsável pela pesquisa ou à equipe do estudo para explicar qualquer palavra ou informação que você não entenda claramente.

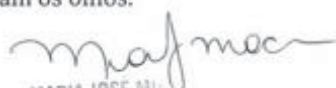
INFORMAÇÃO AO PACIENTE:

O que é uma pesquisa?

Pesquisa é um conjunto de ações que visam a descoberta de novos conhecimentos em uma determinada área.

Você está sendo convidado(a) a participar de uma pesquisa, com o objetivo de:

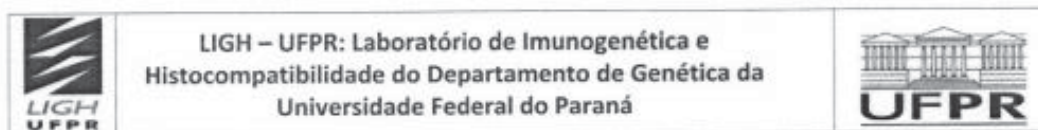
investigar se as pessoas que possuem alterações em determinados genes (partes do nosso DNA que determinam como vamos ser) têm tendência a ter certas doenças que afetam os olhos.


MARIA JOSE M.
Membro do Comitê de Ética
em Seres Humanos do P-
Matrícula 7462

Rubricas:

Sujeito da Pesquisa/ responsável legal _____

Pesquisador Responsável ou quem aplicou o TCLE _____



Para que fazer a pesquisa?

Para aumentar o conhecimento dos genes que podem causar doenças nos olhos e contribuir para o avanço da ciência.

Como a pesquisa será feita?

Se você quiser participar desta pesquisa, você deverá preencher um questionário e depois iremos coletar uma pequena amostra de sangue do seu braço, uma única vez. Você vai sentir uma picada parecida com picada de mosquito. Utilizaremos esta amostra para estudar seus genes que estão presentes nas células do seu sangue. Se você ou seus familiares tiverem alguma doença nos olhos, vamos pedir que você vá, acompanhado de seus pais ou um adulto responsável à clínica oftalmológica em Curitiba, para fazer alguns exames nos olhos.

Quais os benefícios esperados com a pesquisa?

Entender mais sobre os genes que causam doenças nos olhos.

Que você deve fazer se concordar voluntariamente em participar da pesquisa?

Caso você aceite participar, deverá rubricar todas as folhas deste termo e assinar no final. Após a assinatura, iremos fazer a coleta de sangue explicada acima.

Seu nome não será divulgado em lugar algum. Apenas os pesquisadores poderão saber que a amostra colhida é sua. Mais ninguém terá acesso à sua amostra e a seus dados coletados.

A sua participação é voluntária. Caso você opte por não participar, nós descartaremos as suas amostras, sem nenhuma consequência ou prejuízo a você.

Contato para dúvidas:

Se você ou os responsáveis por você tiver(em) dúvidas com relação ao estudo, direitos do participante, ou no caso de riscos relacionados ao estudo, você deve contatar o(a) investigador(a) do estudo ou membro de sua equipe através dos telefones de contato a seguir: Mario Sato (041 3018-3063, 3078-4800 ou 9979-9588), Maria da Graça Bicalho (041 3361-1729), Juliana Schauen (041 3361-1729 ou 9266-3331), Ana Cláudia Torres (041 3361-1729 ou 8821-7914) ou Pablo Carvalho Santos (041 3361-1729 ou 9707-7102).

Se você tiver dúvidas sobre seus direitos como um participante da pesquisa, você pode contatar o Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos – CEP (Rua General Carneiro, 181 - Curitiba/PR. Telefone: (041) 3360-1041).

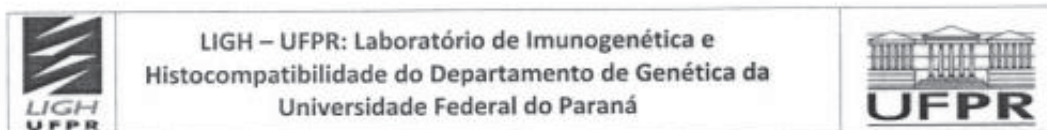
Em nome de todos os membros do projeto, muito obrigado! ☺


 MARIA JOSE N.
 Membro do Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos do LIGH UFPR
 Matrícula 7462

Rubricas:

Sujeito da Pesquisa/ responsável legal _____

Pesquisador Responsável ou quem aplicou o TCLE _____



DECLARAÇÃO DE ASSENTIMENTO DO PARTICIPANTE

Eu li e discuti com o investigador responsável pelo presente estudo os detalhes descritos neste documento. Entendo que eu sou livre para aceitar ou recusar, e que posso interromper a minha participação a qualquer momento sem precisar dar uma razão. **Eu** concordo que os dados coletados para o estudo sejam usados para o propósito descrito acima.

Eu entendi a informação apresentada neste TERMO DE ASSENTIMENTO. Eu tive a oportunidade para fazer perguntas e todas as minhas perguntas foram respondidas.

Eu receberei uma via original assinada, rubricada e datada deste Documento de ASSENTIMENTO INFORMADO.

Nome do(a) menor de 18 anos

____/____/_____
Data de Nascimento

RG ou CPF

____, ____/____/_____
Cidade e data de hoje

Assinatura do(a) menor de 18 anos

Para uso da equipe de pesquisa



Declaro ter informado por escrito e oralmente o participante (ou representante legal) do estudo "Achados clínicos e genéticos de doenças oftalmológicas hereditárias" sobre as consequências e os riscos associados às pesquisas, tendo-lhe dado uma cópia deste termo e ter obtido voluntariamente seu assentimento.

____, ____/____/_____
Cidade e data de hoje

Assinatura do membro do projeto de pesquisa


MARIA JOSE
 Membro do Comitê de Ética em Seres Humanos do H...
 Matrícula 7462

APÊNDICE 3 - Questionário

	LIGH – UFPR: Laboratório de Imunogenética e Histocompatibilidade do Departamento de Genética da Universidade Federal do Paraná	
---	---	---

**Laboratório de Imunogenética e Histocompatibilidade (LIGH) do
Departamento de Genética da Universidade Federal do Paraná**
 Av. Cel. Francisco Heráclito dos Santos 100
 Caixa Postal 19071, CEP 81530-900, Curitiba-PR
 Diretora: Profa. Dra. Maria da Graça Bicalho
 Coordenador científico: Dr. Pablo Sandro Carvalho Santos
 Fone/Fax (41) 3361-1729 ; Email: ligh@ufpr.br

Identificação

Nome

**Questionário para o Projeto de Pesquisa:
Achados clínicos e genéticos de doenças oftalmológicas**


Prezada senhora, prezado senhor,

Nós agradecemos pelo seu interesse em participar na nossa pesquisa! Este questionário é parte do projeto intitulado "Achados clínicos e genéticos de doenças oftalmológicas hereditárias" que tem como objetivo a descoberta das bases genéticas de várias doenças e síndromes que afetam os olhos. Este estudo está sendo conduzido em Curitiba, e tem o Laboratório de Imunogenética e Histocompatibilidade (LIGH) do Departamento de Genética da Universidade Federal do Paraná, juntamente com a clínica Retina e Vítreo Consultoria e o Centro Hospitalar de Reabilitação Ana Carolina Moura Xavier como instituições responsáveis. Alguns passos do projeto serão conduzidos por alunos de pós-graduação do UFPR.

Por favor responda o questionário seguindo a ordem das perguntas. Pule uma pergunta apenas nos casos em que uma seta pedir para que você faça isso.

Caso você deseje fazer algum comentário ou sugestão, você encontrará espaço para isso no final do questionário. Quando tiver respondido a todas as perguntas, por favor devolva o questionário à pessoa responsável.

Em nome de todos os membros do projeto, muito obrigado! 😊


MARIA JOSE MUCELIN
 Membro do Comitê de Ética em Pesquisa
 em Seres Humanos do HC/UFPR
 Membro 2462



LIGH – UFPR: Laboratório de Imunogenética e
Histocompatibilidade do Departamento de Genética da
Universidade Federal do Paraná



01. Em que mês de que ano você nasceu?


Mês do ano de


02. De qual região da Terra vem a sua família (ou seus antecedentes)? *Aqui, várias respostas são possíveis. Marque um (X) na(s) resposta(s) correta(s)*

- () Europa (Branços)
() Países Árabes (Branços)
() África (Negros)
() América do Sul (Indígenas)
() Ásia (Orientais)
() Outro:



03. Você é

() Uma mulher 

() Um homem 

04. Você é paciente de distrofia retiniana?

Sim Não → **Continuar com pergunta 7**

05. Você é PARENTE de um paciente de distrofia retiniana?

Sim Não → **Fim do questionário.**

06. Qual o seu grau de parentesco com a ou o paciente de distrofia retiniana?

07. Que tipo de distrofia foi diagnosticada?

Handwritten mark



LIGH – UFPR: Laboratório de Imunogenética e
Histocompatibilidade do Departamento de Genética da
Universidade Federal do Paraná



08. Quais são os principais sintomas que você ou seu parente apresentam? *Aqui você deve responder todos os sintomas relacionados à visão (dificuldade, nistagmo, estrabismo, etc), à pele (quantidade de pelos, problemas no cabelo), a malformações congênitas (polidactília, ectrodactília, fenda palatina, etc) e a outros sintomas que você lembre.*

09. Quando estes sintomas apareceram? *De preferência citar a idade de surgimento.*

10. Se você tiver mais alguma observação, poderá utilizar o espaço abaixo para escrever.

Agora o(a) pesquisador(a) irá fazer algumas perguntas sobre sua família.

5

APÊNDICE 4 - Resumo apresentado na forma de pôster no ELAG course 2015.

Title: Investigação das bases genéticas de distrofias retinianas associadas a alopecias
(Investigation of the genetic basis of retinal dystrophies associated with alopecias)

Authors: Schauern JS, Torres ACMBG, Santos PSC, Brenner FAM, Shiokawa N, Sato MT, Bicalho MG.

Abstract:

Macular dystrophy is a rare disease which causes slow progressive retinal degeneration. There are some reports of patients who present macular dystrophy associated with alopecia (MDA), but they are clinically heterogeneous. The best known are Hypotrichosis associated with Juvenile Macular Dystrophy (HJMD) and Ectodermal dysplasia, Ectrodactyly and Macular dystrophy (EEM) which are caused by mutations in *CDH3* gene, that codifies p-cadherin, a cell adhesion glycoprotein. Recently three families were diagnosed with MDA in the South region of Brazil, all of them clinically heterogeneous. We hypothesize that variations in *CDH3* gene cause the disease and that the phenotypic variability results from the effect of modifier genes. DNA from the families was extracted (salting out) and two patients from each family plus one control were selected for exome sequencing. SNPs and Indels will be compared between patients and with the control. Up to now we have variant annotation from 3 patients (PT01, PT03 and PT08). Our preliminary approach was the search of unknown, missense or nonsense variations in *CDH3* gene. A splicing site and a missense variation were found as follows: exon2 c.160+1G>A and exon9 c.G1063T:p.D355Y. PT01 and PT03 are sisters and were both heterozygous for the two variations. PT08 is a patient from other family and presented only the splicing site variation in homozygosity. This variation disrupts a highly conserved consensus donor splice site and has been already described by Indelman et al. (2007) in one English patient with HJMD. Exon9 c.G1063T:p.D355Y is a new variation that causes an amino acid change from aspartic acid to tyrosine in the EC3 extracellular domain of CDH3. Our preliminary conclusion is that exon2 c.160+1G>A and exon9 c.G1063T:p.D355Y variations are the main cause of MDA in PT01 and PT03 (compound heterozygous) and exon2 c.160+1G>A homozygous variation in PT08.

APÊNDICE 5 - Resumo apresentado na forma de pôster no 62º Congresso Brasileiro de Genética, 2016.

Hypotrichosis with Juvenile Macular Dystrophy: report of a Brazilian family with a new splice site mutation in *CDH3* gene

Schauren JS¹, Torres ACMBG¹, Santos PSC², Mulinari-Brenner F³, Lima LH⁴, Zago Filho LA⁵, Shiokawa N⁵, Sato MT⁵, Bicalho MG¹.

1 Laboratório de Imunogenética e Histocompatibilidade, UFPR, Curitiba-PR, Brazil. 2 Institute of Evolutionary Ecology and Conservation Genomics, University of Ulm, Germany. 3 Serviço de Dermatologia, Hospital de Clínicas, UFPR, Curitiba-PR, Brazil. 4 Departamento de Retina e Vítreo, UNIFESP, São Paulo-SP, Brazil. 5 Departamento de Oftalmo-Otorrino da Faculdade de Medicina, UFPR, Curitiba-PR, Brazil.

julianaschauren@gmail.com

Keywords: *CDH3*, HJMD, hypotrichosis, macular dystrophy, P-cadherin

Hypotrichosis with Juvenile Macular Dystrophy (HJMD, OMIM 601553) is a rare disease with autosomal recessive inheritance that impairs vision and hair growth. This disease is caused by mutations in *CDH3* gene which locus codifies p-cadherin, a cell adhesion glycoprotein expressed during hair and retina development. Up to now, no HJMD case has been described in Brazil. The family reported here has two patients (III-10 and III-11) who were born with thin sparse scalp hair and presented visual impairment from seven years (III-10) and nineteen years (III-11). Patient III-10 is more severely affected than III-11. The father (II-4) and his male relatives present alopecia in an androgenetic pattern. The main purpose of this work was to confirm HJMD diagnosis through clinical and molecular data. A complete clinical evaluation was performed in patients. Ophthalmological findings were compatible with macular dystrophy and hair shaft microscopy showed a diversity of alterations. In addition, next generation whole exome sequencing was performed in both patients and results were validated by Sanger sequencing. A new variant was identified in the *CDH3* gene, exon12 c.1795+1G>C. Sanger sequencing confirmed segregation of this variant with the disease. The homozygous genotype (C/C) is present only in patients and the genotyped relatives were heterozygous (G/C). This variation is in a splicing region, which may lead to a premature stop codon 10 bp downstream of intron 12. Another hypothesis is that this variation can lead to exon 12 skipping, both assumptions may lead to a non-functional protein. Regarding alopecia phenotype presented by male relatives, clinical and genetic findings support androgenetic alopecia (OMIM 109200) hypothesis. Moreover, hair findings in patients are different from androgenetic alopecia findings, supporting that the alopecia presented by patients is a more severe form caused by *CDH3* mutation. In conclusion, we performed a complete clinical and genetic investigation of this family which led to HJMD diagnosis and the description of a novel *CDH3* variant leading to the disease. This is the first report of HJMD in Brazil. Our findings reinforce *CDH3* mutations as major diagnostic criteria for HJMD. Further studies are needed to unravel the cause of intra and interfamilial heterogeneity of this disease.

Finacial support: CAPES, FUNPAR-LIGH and Clínica Retina e Vitreo Consultoria.

APÊNDICE 6 - Folder para auxiliar profissionais no diagnóstico das distrofias maculares associadas a hipotricoses.

Seu paciente tem hipotricose congênita?

Recomende uma consulta oftalmológica para avaliação de distrofia retiniana.

Existe uma doença muito rara chamada Distrofia Macular Juvenil associada à Hipotricose que causa hipotricose congênita e progressiva perda visual devido à distrofia macular. Essa distrofia começa geralmente entre a primeira e a segunda década de vida, podendo levar à perda visual. Por mais que não exista tratamento, seu paciente pode buscar acompanhamento médico e psicológico para lidar com essa situação.

Quais os sintomas da doença?

A criança nasce com cabelos curtos e esparsos que costumam a crescer ou nunca crescem. Ao passar dos anos, o paciente começa a ter dificuldade de visão que geralmente piora. O uso de óculos não corrige o problema.

Existe tratamento?

Até o momento não, mas os estudos são promissores. Recomenda-se que o paciente tenha acompanhamento psicológico e médico. Também é importante encaminhar o paciente para um programa de reabilitação visual.



Fonte: Pinterest

Autores: Juliana S Schauern, Mario T Sato, Naoye Shiokawa, Fabiane Mulinari-Brenner, Luiz H Lima, Luiz A Zago Filho, Maria da Graça Bicalho.