Magnolia Astrid Pretell Bocángel

**Estudo genético e molecular da síndrome de
Waardenburg**

Genetic and molecular study of Waardenburg syndrome

São Paulo
2014

Magnolia Astrid Pretell Bocánel

**Estudo genético e molecular da síndrome de
Waardenburg**

Genetic and molecular study of Waardenburg syndrome

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo, para a obtenção do título de Mestre em Ciências, na área de Genética e Biologia Evolutiva. Dissertação corrigida, o original encontra-se disponível no Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo.

Orientador: Prof. Dr. Paulo Alberto Otto

São Paulo
2014

Ficha Catalográfica

Pretell Bocángel, Magnolia Astrid
Estudo genético e molecular da síndrome de Waardenburg

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

1. síndrome de Waardenburg, Genes *PAX3* e *MITF* 2. MLPA, 3. Sequenciamento, 4. ANNOVAR, CADD

Comissão Julgadora:

Prof(a). Dr(a).

Prof(a). Dr(a).

Prof. Dr. Paulo A. Otto
Orientador

A mi papá Mario, en su memoria, por todo su apoyo y consejos

A Forja, o Fogo, o Martelo e a Bigorna

*A Forja aquece,
o Fogo queima,
o Martelo bate, deforma e dá forma,
a Bigorna apoia, rebate, tilinta,
aquece a Forja,
queima o Fogo,
bate o Martelo,
tilinta a Bigorna.*

*Sofre o Ferro,
aquecido pela Forja,
queimado pelo Fogo,
batido pelo Martelo,
importunado pela Bigorna.*

*Em brasa o Ferro,
perdeu sustentação,
fragilidade exposta,
transitória condição.*

*Devolvida a feição,
com nova configuração.*

*Mais forte e bonito,
ativo também,
retorna para a vida,
em busca do que lhe convém.*

(Jorge Francisco)

Agradecimentos

Agradeço,

Ao meu orientador Paulo A. Otto, pela oportunidade e todos os conhecimentos que dele aprendi, os quais serão levados por toda a vida. Um deles foi uma frase dita na aula de populações: “É importante se divertir pra não ficar maluco”, P.A.Otto, 07/06/2012 às 3:47PM.

À Prof. Dra. Regina Mingroni-Netto, pela orientação na área molecular, pela correção da tese e discussão desse trabalho.

À minha família, especialmente a minha mãe Elizabeth e minha tia Lucy, pelo apoio e incentivo na minha decisão de fazer o mestrado no Brasil.

Ao meu namorado Ricardo, “o incrível”, por todo seu apoio, amor, paciência e suporte incondicional.

À Karina Schmidth, “a querubim”, por ser um apoio e um porto seguro durante a fase do mestrado.

Ao Guilherme Yamamoto, por ser um guia na parte de bioinformática e às discussões lógicas que me ensinaram muito.

À Naila Lourenço e Natale Cavaçana, por toda ajuda na técnica de MLPA, suas amizades e boas vibrações.

À Danielle Moreira, pela amizade e pela sua ajuda na análise das técnicas de MLPA.

À Lucas Alvizi, pela ajuda na análises computacionais.

À Daniela Tiaki Uehara, por me ensinar com muito carinho as técnicas de sequenciamento.

À Dra. Eliete Pardono, que executou toda a coleta de amostras e ajudou na continuação do estudo molecular das suas amostras.

À Dra. Angela V. Morgante e Dra. Maria Rita Passos Buenos, pelo apoio e sugestões no projeto.

À Dra. Ana Carla Batissoco, pela ajuda nas muitas dúvidas científicas, interpretações dos resultados e boas vibrações.

À Meire Aguenta, pelo apoio nos sequenciamentos e histórias compartilhadas.

À Alejandra Zevallos, pela amizade, conselhos e revitalização das energias.

Ao departamento de Genética e Biologia evolutiva do IB-USP, pelo uso de suas dependências.

Aos meus colegas do Lab349 e sala341, especialmente ao Renan, Vitor, Leandro, Adriano e Uirá, pelo companheirismo e ajuda neste trabalho.

À meus amigos do laboratório LIAMF no IME-USP pelos momentos compartilhados, pela companhia sempre agradável e ajuda na plataforma LATEX.

A meus amigos espalhados pelo mundo que, apesar da distância, sempre me mandaram

forças para continuar.

Aos amigos no Brasil que fiz ao longo desses anos, que me ensinaram muitas coisas sobre a vida e enriqueceram minha estadia no país.

Aos funcionários do IB, especialmente à Fátima, Mara, Deisy e Paulo, pelas conversas, conselhos e amizade.

À CAPES, pela concessão da bolsa de pesquisa e da verba PROEX.

Ao CEPID-FAPESP, Centro de Estudos do Genoma Humano pelo apoio financeiro.

Resumo

A síndrome de Waardenburg é uma síndrome geneticamente heterogênea, com uma taxa de penetrância muito alta e expressividade extremamente variável.

O objetivo desse estudo foi a caracterização molecular de uma amostra brasileira de pacientes com SW, dando continuidade ao estudo clínico feito em Pardono (2005), por meio do estudo de 48 probandos classificados com a síndrome de Waardenburg tipo 1 ou 2.

Foram estudados os genes *PAX3*, *MITF*, *SOX10*, *SNAI2*, *EDN3* e *EDNRB*, por meio do sequenciamento pelo método de *Sanger*, e investigadas microdeleções e microduplicações dos genes *PAX3*, *MITF* e *SOX10* pela técnica de MLPA (*Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification*). Identificou-se 17 mutações potencialmente patogênicas (35,4% dos probandos). Dessas, seis foram variações de número de cópias (12,5% dos probandos).

Além disso, foi realizado um levantamento na base de dados LOVD (*Leiden Open Variation Database*), no qual constam 105 mutações não sinônimas exônicas consideradas causativas da SW. Diversos algoritmos foram utilizados para avaliar a possível patogenicidade dessas mutações, os quais levam em conta as frequências das mutações na base de dados do projeto 1000 genomas e 6500 exomas, anotam as previsões dadas pelos programas *Polyphen2*, *MutationTaster*, *LRT* e *SIFT* e verificam a conservação em primatas e outros mamíferos. Por meio dessa análise, verificou-se que para 19 mutações não sinônimas (18%) faltam evidências de sua patogenicidade, colocando-se em dúvida a sua relação causal com a síndrome de Waardenburg.

Abstract

Waardenburg syndrome (WS) is a genetically heterogeneous syndrome, with a very high penetrance rate and highly variable expressivity.

The focus of this study was the molecular characterization of a Brazilian sample of patients with WS (48 probands classified with Waardenburg syndrome type 1 or 2).

The analysis of genes *PAX3*, *MITF*, *SOX10*, *SNAI2*, *EDN3* and *EDNRB* were performed by the Sanger sequencing method. Microduplications and microdeletions in genes *PAX3*, *MITF* and *SOX10* were investigated by MLPA technique (Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification). We detected 17 mutations considered as potentially pathogenic in 17 probands of the sample (35,4 % of probands). Among these, six were copy number variations (12,5% of probands).

In addition, we performed a survey using the database of LOVD (Leiden Open Variation Database), which contains 105 non-synonymous exonic mutations considered causative of WS. Several algorithms were used to evaluate the possible pathogenicity of these mutations, taking into account the frequency of mutations in the database project in 1000 genomes and 6500 exomes, and using programs : Polyphen2, MutationTaster, LRT and SIFT. These algorithms also verify the conservation of the variations in primates and another mammals. Through this analysis, lack of evidence was found for the pathogenicity of 19 non-synonymous mutations (18%), and association of these mutations with Waardenburg syndrome are questioned.

Sumário

1	Introdução	16
1.1	Síndrome de Waardenburg	16
1.1.1	Caracterização clínica da síndrome de Waardenburg	16
1.1.2	<i>Dystopia canthorum</i> ou telecanto	18
1.1.3	Caracterização genético-molecular da síndrome de Waardenburg . .	19
1.1.3.1	Gene <i>PAX3</i>	21
1.1.3.2	Gene <i>MITF</i>	24
1.1.3.3	Gene <i>SNAI2 (SLUG)</i>	27
1.1.3.4	Gene <i>SOX10</i>	27
1.1.3.5	Genes <i>EDN3</i> e <i>EDNRB</i>	30
1.1.3.6	Variações do número de cópias (CNV) na SW	33
1.2	Predição de patogenicidade de mutações	33
1.2.1	ANNOVAR	34
1.2.2	CADD	35
2	Objetivos	37
2.1	Objetivo geral	37
2.2	Objetivos específicos	37
3	Material e métodos	38
3.1	Casuística	38
3.2	Análises moleculares	38
3.2.1	Extração de DNA	38
3.2.2	Estratégias de análise das mutações	38
3.2.3	Reações de PCR para sequenciamento	39
3.2.4	Sequenciamento do DNA pelo método de Sanger	43
3.2.5	Pacotes computacionais para análises das sequências	43
3.2.6	MLPA (<i>Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification</i>)	44
4	Resultados e discussão	46
4.1	Descrição da casuística	46

4.2	Resultado da triagem de mutações e análise do efeito das mutações	46
4.3	Descrição dos pacientes com mutações consideradas patogênicas no gene <i>PAX3</i>	52
4.4	Descrição dos pacientes com mutações no gene <i>MITF</i>	59
4.5	Descrição dos pacientes com mutações no gene <i>SOX10</i>	61
4.6	Descrição dos pacientes com mutação no gene <i>EDNRB</i>	64
4.7	Descrição dos pacientes com variações do número de cópias	65
4.7.1	Descrição dos pacientes com deleção no gene <i>PAX3</i>	65
4.7.2	Descrição dos pacientes com deleção no gene <i>SOX10</i>	68
4.7.3	Descrição dos pacientes com deleção no gene <i>MITF</i>	71
4.8	Previsão de patogenicidade das mutações exônicas já descritas no banco de dados da síndrome de Waardenburg - LOVD	72
5	Considerações finais	83
6	Conclusões	84

Lista de Figuras

1	Algumas das características de pacientes com SW.	16
2	Distâncias utilizadas para o calculo do índice W.	18
3	Participação dos genes já conhecidos na etiologia da síndrome de Waardenburg	20
4	Esquema do gene <i>PAX3</i> e as principais mutações no banco de dados LOVD	23
5	Regulação de <i>MITF</i> na expressão e ativação dos genes	25
6	Principais mutações do gene <i>MITF</i> no banco de mutações da SW LOVD .	26
7	Localização das mutações características do gene <i>SOX10</i> no banco de dados LOVD	29
8	Localização das variações no gene <i>EDNRB</i> descritas no banco de dados LOVD	31
9	Localização das mutações no gene <i>EDN3</i> na SW descritas no banco de dados LOVD	32
10	Medianas das pontuações de <i>C score</i> em variações não sinônimas e códon de parada prematuro	36
11	Estratégia da triagem dos genes da síndrome de Waardenburg.	39
12	Heredograma da família do propósito F-7 (II-2).	52
13	Fotografia da região média da face do paciente F-7.	52
14	Resultado do sequenciamento do gene <i>PAX3</i> no paciente F-7	53
15	Heredograma da família do propósito (VI-8) da família F-26.	53
16	Fotografia da região frontal do indivíduo IV-13 notando-se a presença de mecha branca e íris azuis.	54
17	Resultado da comparação das sequências do exon 5 do gene <i>PAX3</i> indicando a deleção c.727-739del	54
18	Heredograma da família F-35.	54
19	Fotografia da propósita notando-se a presença do telecanto.	55
20	Resultado do sequenciamento do paciente F-35	55
21	Heredograma da família do propósito (III-1).	56
22	Fotografia da região frontal do paciente notando-se a presença de telecanto pronunciado, íris azuis e hipoplasia das asas nasais.	56
23	Resultado do sequenciamento do gene <i>PAX3</i> no paciente F-40	56
24	Heredograma da família da propósita F-45. As pessoas indicadas com ? são portadoras da mutação mas não apresentam características clinicas . .	57

25	Fotografia da propósa F-45 notando-se a heterocromia de íris.	57
26	Resultado do sequenciamento do gene <i>PAX3</i> no paciente F-45	57
27	Fotografia da propósa notando-se a presença do telecanto.	58
28	Resultado do sequenciamento do gene <i>PAX3</i> no paciente F-46	58
29	Heredograma da família do propósito F-48.	59
30	Fotografia do propósito notando-se a presença do telecanto e íris hipocrômicas.	59
31	Heredograma da família F-25. Os símbolos parcialmente preenchidos indicam indivíduos com surdez, mas que não foram clinicamente estudados	59
32	Fotografia do propósito F-25 notando-se heterocromia parcial.	60
33	Resultado do sequenciamento do gene <i>MITF</i> no paciente F-25	60
34	Heredograma da família F-33.	60
35	Resultado do sequenciamento do gene <i>MITF</i> no paciente F-33	61
36	Heredograma da família F-14.	61
37	Resultado do sequenciamento do gene <i>SOX10</i> no paciente F-14	61
38	Heredograma da família F-28.	62
39	A propósa (II-3) irmã gêmea (II-4) ambas com olhos azuis hipocrômicos.	62
40	Heredograma da família F-31.	63
41	Fotografia do propósito notando-se os olhos azuis hipoplásicos.	63
42	Heredograma da família F-27.	64
43	Resultado do sequenciamento do gene <i>EDNRB</i> do paciente F-27	64
44	Heredograma da família F-1.	65
45	Resultado do estudo de CNVs do paciente F-1	65
46	Heredograma da família F-5.	66
47	Resultado do estudo de CNVs do paciente F-5	66
48	Heredograma da família F-6.	67
49	Heredograma da família F-11.	67
50	Resultado do estudo de CNVs do paciente F-11	68
51	Heredograma da família F-36.	69
52	Fotografia da propósa F-36	69
53	Resultado do estudo de CNVs do paciente F-36	70

54	Heredograma da familia F-42.	71
55	Resultado do estudo de CNVs do paciente F-36	71

Lista de Tabelas

1	Crêterios para o diagnóstico da SW	17
2	Tipos da síndrome de Waardenburg.	17
3	Comparação da frequência das características clínicas entre SW1 e SW2 . .	18
4	Genes mutados já identificados na síndrome de Waardenburg.	20
5	Pacientes caracterizados clinicamente da casuística do laboratório.	38
6	<i>Primers</i> utilizados na amplificação do gene <i>PAX3</i>	40
7	<i>Primers</i> utilizados na amplificação do gene <i>MITF</i>	40
8	<i>Primers</i> utilizados na amplificação do gene <i>EDN3</i>	41
9	<i>Primers</i> utilizados na amplificação do gene <i>SOX10</i>	41
10	<i>Primers</i> utilizados na amplificação do gene <i>EDNRB</i>	42
11	<i>Primers</i> utilizados na amplificação do gene <i>SNAI2</i>	42
12	Componentes da reação em cadeia da polimerase utilizados para amplifi- ca��o de fragmentos de todos os genes.	43
13	Resultado de investigação de mutações indicando as variações do número de cópias e as mutações do tipo indel e substituições indicadas como deletérias pelos pacotes computacionais	49
14	Alterações consideradas não patogênicas	50
15	Previsão do efeito das mutações encontradas na casuística de pacientes com SW	51
16	Resumo das mutações encontradas em relação � classificação clínica inicial.	51
17	Previsão do efeito das mutações descritas no banco de dados LOVD no gene <i>PAX3</i>	77
18	Previsão do efeito das mutações descritas no banco de dados LOVD no gene <i>MITF</i>	78
19	Previsão do efeito das mutações descritas no banco de dados LOVD no gene <i>SOX10</i>	79
20	Previsão do efeito das mutações descritas no banco de dados LOVD no gene <i>EDNRB</i>	80
21	Previsão do efeito das mutações descritas no banco de dados LOVD no gene <i>EDN3</i>	81
22	mutações que se coloca em dúvida a patogenicidade na casuística de paci- entes com SW	82

1 Introdução

1.1 Síndrome de Waardenburg

1.1.1 Caracterização clínica da síndrome de Waardenburg

A síndrome de Waardenburg (SW) foi descrita pela primeira vez em 1951. Trata-se de uma síndrome geneticamente heterogênea, com uma taxa de penetrância muito alta e com expressividade extremamente variável. É rara e sua frequência na população geral foi estimada em cerca de 1:40.000. Entre deficientes auditivos institucionalizados, estima-se que cerca de 3% apresentem a SW.

A síndrome de Waardenburg é caracterizada por anormalidades pigmentares no cabelo, incluindo uma mancha branca frontal no cabelo (Fig. 1A), heterocromia (Fig. 1B) ou hipopigmentação das íris (Fig. 1E), telecanto (Fig. 1C), sinófre (Fig. 1D) e manchas despigmentadas na pele (Fig. 1F). Os principais critérios de diagnóstico são mostrados na Tabela 1.

Figura 1: Algumas das características de pacientes com SW.

A presença de dois critérios principais ou a presença de um critério principal acompanhado de dois critérios secundários são suficientes para caracterizar a síndrome.

A síndrome foi classificada em quatro tipos, apresentados na Tabela 2. Os tipos mais frequentes são os tipos 1 e 2, sendo a presença do telecanto (*dystopia canthorum*) no tipo 1 a principal diferença em relação ao tipo 2 (Tabela 3). Devido à penetrância incompleta do telecanto [Arias e Mota, 1978], o diagnóstico clínico diferencial entre o tipo 1 e 2 pode ser difícil nos casos isolados, que geralmente são classificados no tipo 2.

Tabela 1: Critérios para o diagnóstico da SW (baseada nos critérios propostos pelo consórcio Waardenburg [Farrer *et al.*, 1992, Liu *et al.*, 1995]).

Critérios principais
<ul style="list-style-type: none"> • Perda auditiva neurossensorial congênita • Distúrbios de pigmentação da íris <ul style="list-style-type: none"> (a) heterocromia completa: os dois olhos são de cor diferente (b) heterocromia parcial ou segmentar: segmentos azuis ou marrons num ou nos dois olhos (c) íris azuis hipoplásicas ou brilhantes • Hipopigmentação do cabelo (geralmente mancha branca frontal) • <i>Dystopia canthorum</i> (telecanto): aumento da distância entre os cantos internos dos olhos • Parente em primeiro grau afetado
Critérios secundários
<ul style="list-style-type: none"> • Varias manchas hipopigmentadas na pele • Sinófre • Encanecimento precoce (antes dos 30 anos de idade) • base nasal alargada (tipo 1) • hipoplasia das asas nasais (tipo 1)

Tabela 2: Tipos da síndrome de Waardenburg.

Tipo	Características
Tipo I(SW1)	(OMIM#193500) com telecanto
Tipo II(SW2)	(OMIM#193519) sem telecanto
Tipo III(SW3) ou síndrome de Klein-Waardenburg	(OMIM#148820) presença do telecanto e anormalidades músculo-esqueléticas dos membros superiores
Tipo IV (SW4) ou síndrome de Shah-Waardenburg	(OMIM#277580) megacolo congênito (doença de Hirschsprung) e eventualmente achados neurológicos (neuropatia periférica, deficiência mental e ataxia cerebelar)

Tabela 3: Comparação da frequência das características clínicas entre SW1 e SW2. [Liu *et al.*, 1995, Pardono *et al.*, 2003, Tamayo *et al.*, 2008].

Caraterísticas clínicas	% de afetados SW1	% de afetados SW2
Perda auditiva neurossensorial	47-58	77-80
Iris heterocrômicas	15-31	42-54
Iris azuis hipoplásicas	15-18	3-23
Mecha branca frontal	43-48	16-23
Encanecimento precoce	23-38	14-30
Manchas hipopigmentadas	22-36	5-12
Base nasal larga	52-100	0-14
Sinófre	63-73	7-12
Telecanto	98	ausente

1.1.2 *Dystopia canthorum* ou telecanto

O telecanto é a característica mais frequente da SW1, pois está presente em cerca de 98% dos afetados. O telecanto pode vir acompanhado de blefarofimose (encurtamento longitudinal da fenda palpebral) e, em muitos casos, os orifícios lacrimais encontram-se deslocados lateralmente. Em alguns casos a distância intercantal externa está aumentada (hipertelorismo). Na maioria dos afetados a distopia é claramente reconhecida, mas em alguns casos, a impressão clínica do telecanto não é confiável, pois pacientes com SW2 podem ser diagnosticados de maneira errônea se eles apresentarem hipertelorismo, pois essa característica pode ser confundida com telecanto. Por isso o estudo biométrico é importante, baseado no cálculo do índice W. Este índice auxilia a identificação da SW1, pois na SW1 o índice W é maior que 1,95, e na SW2 o índice é menor que 1,95. O cálculo é mostrado abaixo; os valores de a,b e c são obtidos através das medidas mostradas na Fig.2.

Figura 2: Distâncias utilizadas para o calculo do índice W.

$$x + y + \frac{a}{b}$$

Em que:

$$x = \frac{2a - 0,2119c - 3,909}{c}$$

$$y = \frac{2a - 0,2479c - 3,909}{b}$$

A perda de audição neurossensorial é a característica clínica mais frequente e importante da SW. A frequência do sintoma varia de 50% na SW1 a 80% na SW2. A gravidade da perda auditiva e as demais características variam mesmo entre os membros da mesma família. A variabilidade clínica é elevada dentro dos membros de uma família e entre os tipos distintos da síndrome. Em consequência, a penetrância de cada sinal clínico individualmente pode ser diferente entre os subtipos (Tabela 3). Sem telecanto, os pacientes suspeitos precisam apresentar muitos outros defeitos associados para se suspeitar da SW em casos isolados [Read e Newton, 1997].

1.1.3 Caracterização genético-molecular da síndrome de Waardenburg

A SW resulta claramente de distúrbios ocorridos nas células embrionárias da crista neural. Durante o desenvolvimento embrionário, células pluripotentes da crista neural migram para várias partes do embrião, dando origem a diversas estirpes celulares, que incluem os melanócitos da pele e da orelha interna, as células da glia, os neurônios do sistema nervoso periférico e intramural entérico, e o tecido esquelético crânio-facial [Le Douarin e Kalcheim, 1999].

A associação entre perda auditiva e anormalidades pigmentares características da SW resulta da diferenciação, proliferação, sobrevivência e migração anormais dos melanócitos derivados da crista neural [Jones, 1990]. Os genes já relacionados a estas funções e, conseqüentemente, à SW são: *PAX3* (que codifica fator de transcrição com *Paired BOX 3*) [Hageman e Delleman, 1977], *MITF* (fator de transcrição relacionado à microftalmia) [Tassabehji *et al.*, 1994], *EDN3* (endotelina 3) [Edery *et al.*, 1996], *EDNRB* (receptor da endotelina do tipo B) [Attié *et al.*, 1995], *SOX10* (fator de transcrição relacionado ao SRY BOX10) [Pingault *et al.*, 1998] e *SNAI2* (homólogo de molusco 2) [Sánchez-Martín *et al.*, 2002].

Um banco de dados sobre a síndrome contém todas as mutações já detectadas nos genes já associados à síndrome. O banco de dados é mantido pela universidade de Leiden na Holanda (LOVD-WS, <http://grenada.lumc.nl/LOVD2/WS/>) e conta com contribuição de outros pesquisadores.

Mutações no gene *PAX3* estão presentes na maioria dos pacientes com SW1 e em casos de SW3 (Tabela 4). Já o quadro da SW2 é mais complexo, pois para esse tipo já foram descritas mutações nos genes *MITF*, *SNAI2*, *SOX10*, *EDN3* e *EDNRB* (Figura 3). Em pacientes com o tipo 4 foram descritas mutações nos genes *EDN3*, *EDNRB* e *SOX10*. Em alguns pacientes, no entanto, não se consegue detectar nenhuma mutação por técnicas de sequenciamento convencional do DNA, o que sugere que outros tipos de alterações, como microdeleções e microduplicações, poderiam explicar os quadros, assim como mutações em outros genes ainda desconhecidos.

Em um recente estudo molecular da síndrome de Waardenburg com uma casuística de 119 probandos [Wildhardt *et al.*, 2013] foram utilizadas as técnicas de sequenciamento convencional dos genes *PAX3* e *MITF*, e a técnica de MLPA para detecção de variação de número de cópias nos genes *MITF*, *PAX3* e *SOX10*. Foram detectadas 19 mutações, 14 no gene *PAX3* e 5 no *MITF*. Esse estudo também concluiu que não existe correlação clara entre o tipo de mutação (não sinônima, códon de parada prematura, mudança de

Tabela 4: Genes mutados já identificados na síndrome de Waardenburg.

Tipos	Mecanismo de herança	Genes Mutados
SW1	autossômica dominante	<i>PAX3</i>
SW2	autossômica dominante (d)ou recessiva(r)	<i>MITF</i> (d), <i>SNAI2</i> (r), <i>SOX10</i> (d), <i>EDN3</i> (d), <i>EDNRB</i> (d)
SW3 Klein-Waardenburg	autossômica dominante	<i>PAX3</i>
SW4 Shah-Waardenburg:	principalmente autossômica recessiva	<i>EDN3</i> , <i>EDNRB</i> , <i>SOX10</i>

Figura 3: Participação dos genes já conhecidos na etiologia da síndrome de Waardenburg [Pingault *et al.*, 2010].

matriz de leitura, deleção total do gene ou duplicação) e a gravidade do fenótipo.

1.1.3.1 Gene *PAX3*

O gene *PAX3* é um membro da família de genes *PAX*, conservados evolutivamente e relacionados à codificação de proteínas que atuam como fatores de transcrição durante o desenvolvimento embrionário. Alterações no gene *PAX3* são encontradas em humanos com tumores malignos como sarcomas, melanomas e neuroblastomas [Kubic *et al.*, 2008, Wang *et al.*, 2008]. O *PAX3* está situado em 2q35 e possui 10 exons; a proteína correspondente possui 479 aminoácidos. A proteína *PAX3* possui dois domínios de ligação ao DNA do tipo hélice-alfa-hélice (domínio de pareamento e domínio homeótico).

O gene *PAX3* está envolvido no desenvolvimento do sistema nervoso central, músculo-esquelético, de tecidos cardíacos, de melanócitos e de gânglios entéricos. Um estudo de associação genômica de larga escala (*GWAS* - *Genome Wide Association Study*) mostrou que o *PAX3* exerce influência no desenvolvimento crânio-facial [Paternoster *et al.*, 2012]. Os pesquisadores estudaram 2185 jovens de 15 anos e identificaram uma associação entre o polimorfismo de base única rs7559271 (esta variação está dentro do *intron 2* do gene *PAX3*) e o incremento na distância intercantal dos olhos. Mostraram que variantes comuns intrônicas neste gene se associam a este incremento na população geral.

Em pacientes com SW tipos 1 e 3 foram encontradas mutações pontuais no gene *PAX3* em 90% dos casos. A primeira mutação no gene foi descrita em 1992 [Baldwin *et al.*, 1992]. Desde então, cerca de 114 diferentes mutações foram incluídas na base de dados da síndrome de Waardenburg (<http://grenada.lumc.nl/LOVD2/WS/>) nesse gene, compreendendo 29 deleções de poucas bases, 76 substituições, 7 duplicações de poucas bases e 2 alterações de sítios de *splicing*. As últimas mutações descritas na literatura ocorreram:

- Na Turquia, onde em uma família a mutação c.788T>G foi encontrada em 8 membros com SW1 [Hazan *et al.*, 2012];
- Na Alemanha, onde onze novas mutações foram descritas neste gene em um estudo envolvendo 119 pacientes com a SW [Wildhardt *et al.*, 2013], e;
- Na China, onde três novas mutações (e duas já conhecidas) foram identificadas em cinco pacientes não aparentados com SW1 [Wang *et al.*, 2010a].

Deleções parciais ou totais do gene *PAX3* também foram descritas [Chen *et al.*, 2010, Kozawa *et al.*, 2008, Milunsky *et al.*, 2007, Wang *et al.*, 2010a, Wildhardt *et al.*, 2013]. No banco de dados do *DECIPHER* (<https://decipher.sanger.ac.uk>) foram descritas 3 deleções totais do gene, associadas com algumas características da síndrome como hipertelorismo e heterocromia. Cerca de 95% das mutações em *PAX3* estão localizadas nos exons 2-6. Nesses exons localizam-se os principais domínios (domínio de pareamento e domínio homeótico) funcionais de interação com outras proteínas (Figura 4) e a taxa mais elevada de mutações é encontrada no exon 2.

Estudos têm mostrado que, embora o *PAX3* induza a expressão de *MITF*, ele atua também evitando a ativação de *MITF*, até que estímulos externos tirem os efeitos repressivos de *PAX3* [Krispin *et al.*, 2010, Lang *et al.*, 2005]. Vários produtos dos genes *PAX*, possuem esse efeito “liga-desliga” [Blake e Ziman, 2014].

Tradicionalmente aceita-se que o gene *PAX3* regula os processos de desenvolvimento, operando como um regulador de transcrição. O *PAX3* contém domínios de ligação específicos ao DNA [Chalepakakis *et al.*, 1994b, Phelan e Loeken, 1998]. Camundongos modelo, chamados de “*Spotch*”, possuem mutação pontual no gene *PAX3* e a função da proteína de transativação está ausente [Chalepakakis *et al.*, 1994a]. Vários genes foram identificados como sendo regulados direta ou indiretamente por *PAX3* [Fenby *et al.*, 2008, Kwang *et al.*, 2002, Mayanil *et al.*, 2001, Watanabe *et al.*, 1998]. No entanto, a forma como *PAX3* regula a formação do tubo neural e demais estruturas dependentes das células da crista neural ainda não foi determinada [Wang *et al.*, 2010a].

Em outro estudo [Wang *et al.*, 2010a] foi afirmado que o gene *PAX3* inativa p53, estimulando a sua degradação e ubiquitinação, indicando que todas as mutações nos domínios do *PAX3* devem também prejudicar a estimulação da ubiquitinação de p53, sugerindo assim uma nova causa para o fenótipo de SW. Mais pesquisas serão necessárias para determinar se este é o caso.

Em cavalos conhecidos como *Splashed White* [Hauswirth *et al.*, 2012], caracterizados por ter uma ampla faixa branca em todo o comprimento do rosto e manchas brancas nas patas, muitos deles com surdez e olhos azuis, foram estudados vários genes e entre eles o gene *PAX3*. Os resultados apontaram varias mutações no *PAX3*, uma delas (c.209G>A, p.C70Y) em aminoácido conservado entre humanos e outras espécies. O mesmo grupo de pesquisa investigou 296 cavalos, onde foi encontrada outra mutação, no exon 2, (c.95C>G, p.Pro32Arg), que acarreta surdez, olhos azuis e manchas brancas no pelo. Essa mutação foi transmitida por três gerações [Hauswirth *et al.*, 2013], comprovando assim que a SW tem fenótipo similar em outros mamíferos.

Figura 4: Esquema do gene *PAX3* e as principais mutações descritas no banco de dados LOVD (<http://grenada.lumc.nl/LOVD2/WS/>).

1.1.3.2 Gene *MITF*

O gene *MITF* (*Microphthalmia transcription factor*) está localizado na região cromossômica 3p12 e contém nove exons. A proteína correspondente contém 526 aminoácidos e o RNA mensageiro apresenta pelo menos nove isoformas. A isoforma M é transcrita somente em melanócitos e células pigmentares da retina [Hornyak, 2008].

O maior número de mutações no gene *MITF* ocorre nos exons 4, 5 e 6 (Figura 6), consistindo a maioria em substituições de nucleotídeos. Foram descritas 30 mutações na base de dados LOVD (*Leiden Open Variation Database*), das quais 18 são substituições.

No DECIPHER, também foram descritas nove deleções totais do gene *MITF*. Duas deleções parciais foram descritas: uma no estudo de Milunsky et al. (2007) onde os exons 3-10 foram deletados e outra no estudo de pacientes alemães, onde foi encontrada uma deleção parcial, dos exon 1-9 [Wildhardt et al., 2013].

Estima-se que as mutações no gene *MITF* ocorram em 15% dos pacientes com SW2 [Tassabehji et al., 1995]. Esses autores descreveram uma substituição no domínio básico da proteína MITF, revelando que a síndrome de Tietz-Smitz também pode ser causada por mutações em *MITF*.

As mutações mais recentemente descritas na literatura foram detectadas em pacientes chineses com SW2 [Yang et al., 2013]: c.20A>G, c.332C>T, c.647_649delGAA, c.649A>G, e c.763C>T, com a frequência total de mutações no *MITF* de 21,4% (3 dos 14 casos).

MITF é um fator de transcrição crítico e importante para os melanócitos e o epitélio retinal (RPE). O *MITF* é fundamental para a escolha do destino das células da crista neural a melanócitos [Planque et al., 2004]. Ele está envolvido na diferenciação, crescimento e sobrevivência das células pigmentárias, interagindo com várias vias principais de sinalização. É provável que também esteja envolvido no crescimento neoplásico de melanomas [Tachibana, 2000, Widlund e Fisher, 2003]. A perda da função do *MITF* em camundongos com mutação pontual resulta na ausência completa do produto em todas as células pigmentárias, resultando em microftalmia e surdez [Yajima et al., 1999].

O produto do *MITF-M* (expresso somente em melanócitos) ativa regiões promotoras de genes como *TYR*, *DCT* e *TRP1*, responsáveis pela síntese de melanina [Jiao et al., 2004].

Pelo menos quatro fatores de transcrição participam na transativação do gene *MITF* nos melanócitos: *PAX3*, *SOX10*, *LEF-1*, *CREB* (Figura 5). *MITF* tem dois domínios bem definidos de ativação da transcrição e um domínio hélice-alça-hélice. Até agora, nenhuma função específica têm sido associada com a região N-terminal ou com a região C-terminal de *MITF* [Vachtenheim e Borovanský, 2010].

Nos humanos, em estudos de células de melanomas, foi encontrado que, embora vários marcadores de pigmentação tenham parado de se expressar, a expressão do *MITF* continua ativa, mesmo em tumores não pigmentados, sugerindo assim que o *MITF* ajuda na sobrevivência e vascularização dos melanomas [Berra et al., 2006].

Outros estudos sobre melanogênese mostraram a ausência e a redução de proteínas-chave como *MITF*, *SOX10*, *PAX3*, *TRP1* e *TYR* no bulbo de cabelos grisalhos quando

Figura 5: (a)Regulação de *MITF* na expressão e ativação dos genes (b) Representação esquemática de proteína *MITF* humana [Vachtenheim e Borovanský, 2010]

comparados a cabelos pretos. Os cabelos grisalhos são provavelmente causados por uma migração defeituosa de melanócitos no bulbo do cabelo [Choi *et al.*, 2008].

Um dos mais recentes estudos moleculares foi realizado em uma grande família chinesa com SW2 com uma mutação no exon 8 (c.742_743delAAinsT). Esta mutação leva à perda da função do domínio bHLH e à haploinsuficiência [Yan *et al.*, 2011]. As características fenotípicas nessa família são sardas (83,3%), encanecimento precoce (66,7%), surdez neurossensorial (58,3%) e heterocromia de íris (33,3%). Nos ocidentais é comum observar manchas brancas na pele, mas nos orientais, e não é diferente nessa família citada, as sardas marrons são a principal alteração na pele. [Chen *et al.*, 2010, 2008, Feng *et al.*, 2007, Yang *et al.*, 2013]. Além disso, o encanecimento precoce é mais comum nesta família, contrapondo-se a mecha branca frontal frequentemente observadas nas populações ocidentais. Aparentemente a ancestralidade também desempenha um papel na manifestação da SW2 [Yan *et al.*, 2011].

Em estudos aplicando a técnica de MLPA a amostras de pacientes com a síndrome de Waardenburg se observou uma deleção parcial dos exons 3-10 do gene *MITF*. O paciente com a deleção foi classificado como "SW1", destacando o fato de que às vezes é difícil distinguir SW1 da SW2, mesmo quando se utiliza o índice W. Nesse caso não se mencionou se o caso era isolado ou familiar. [Milunsky *et al.*, 2007].

26

1.1.3.3 Gene *SNAI2* (*SLUG*)

O gene *SNAI2* está localizado na região cromossômica 8q11.2, codifica um fator de transcrição membro da família *SNAIL zinc-finger*, uma proteína de 268 aminoácidos. A proteína contém 5 domínios [Cohen *et al.*, 1998].

Foi descrito que este fator de transcrição é um marcador das células da crista neural premigratórias no peixe-zebra e embriões de galinha, e que, provavelmente, tem um papel funcional na formação dessas células [Jiang *et al.*, 1998]. No camundongo, o correspondente gene, *Slug*, é expresso em células da crista neural migratórias mas não nas células premigratórias [Sánchez-Martín *et al.*, 2002].

Camundongos homozigóticos com mutações de perda de função no gene *Slug* (ortólogo de *SNAI2*), apresentam mancha branca frontal e áreas de despigmentação no corpo, cauda e patas [Pérez-Losada *et al.*, 2002], indicando que a função de *Slug* é necessária para o desenvolvimento normal dos melanócitos. Por causa da similaridade fenotípica destes camundongos com pacientes com SW2, começou-se a investigar um possível papel do gene *SNAI2* em humanos em pacientes com a síndrome de Waardenburg [Sánchez-Martín *et al.*, 2002].

Foram detectadas duas deleções em homozigose em dois indivíduos com SW2 de herança recessiva. Ambos apresentaram perda auditiva neurosensorial, heterocromia sem outras características dismórficas nem pigmentares [Sánchez-Martín *et al.*, 2002]. Em outro estudo foi sequenciado o gene *SNAI2* em 18 pacientes chineses com SW mas não foi encontrada nenhuma mutação [Chen *et al.*, 2010].

1.1.3.4 Gene *SOX10*

SOX10 é um gene composto por 5 exons localizado na região cromossômica 22q13, que codifica uma proteína de 466 aminoácidos. Seu papel na especificação da linhagem de melanócitos foi destacado por sua capacidade de regular o gene *MITF* em sinergia com *PAX3* [Bondurand *et al.*, 2000, Verastegui *et al.*, 2000].

Em pacientes com SW dos tipos 2 e 4 foram encontradas mutações pontuais no gene *SOX10*. Desde então, cerca de 79 diferentes mutações foram descritas na base de dados de LOVD da síndrome de Waardenburg nesse gene, compreendendo 20 deleções de poucas bases, 55 substituições, duas inserções de poucas bases e uma deleção total do gene (Fig.7).

SOX10 é o primeiro gene a se expressar no início da migração das células da crista neural dando origem ao sistema nervoso periférico e entérico [Southard-Smith *et al.*, 1998] e posteriormente sua expressão é detectada nos melanócitos, sendo assim um fator de transcrição chave de desenvolvimento, tanto nos gânglios entéricos como nos melanócitos [Kuhlbrodt *et al.*, 1998].

Mutações em heterozigose (mutação espontânea) no gene *SOX10* em camundongos resultam no fenótipo denominado como megacólon dominante (Dom) [Southard-Smith *et al.*, 1998], incluindo aganglionose intestinal congênita e hipopigmentação com manchas brancas nas patas e na barriga [Herbarth *et al.*, 1998]. Os homozigotos *SOX10^{Dom}/SOX10^{Dom}* morreram durante a gestação ou no momento do nascimento devido a defeitos graves em várias partes do sistema nervoso periférico e entérico. Em humanos, mutações em hetero-

zigose causam SW2 e SW4. SW4 é caracterizada pela doença de Hirschsprung, que tem semelhança com o fenótipo do camundongo Dom [Pingault *et al.*, 1998].

A haploinsuficiência do *SOX10* causa defeitos de pigmentação, como foi observado em camundongos *SOX10*^{Dom/+} [Britsch *et al.*, 2001]. Esses camundongos apresentaram disglanglionose em 79% dos casos e deficiência pigmentar em 90% dos casos, e ambos defeitos ocorreram em 68% das vezes dos animais [Brizzolara *et al.*, 2004].

As mutações mais recentemente descritas foram encontradas em 2 pacientes com SW4, no exon 5, em um estudo de pacientes espanhóis; ambas as mutações levam a uma parada prematura da tradução [Fernández *et al.*, 2014]. Na China foi encontrada uma nova mutação, além de outras três já descritas em pacientes com SW4 [Jung *et al.*, 2013].

Figura 7: Localização das mutações características do gene *SOX10* no banco de dados LOVD (<http://grenada.lumc.nl/LOVD2/WS/>).

1.1.3.5 Genes *EDN3* e *EDNRB*

O gene do receptor tipo B da endotelina (*EDNRB*) está no braço longo do cromossomo 13 e codifica um receptor acoplado à proteína G que se liga a endotelinas 1, 2 e 3. O gene *EDNRB* contém sete exons e está localizado em 13q22 [Arai *et al.*, 1993].

Modelos de camundongo demonstraram que o gene *EDNRB* e a expressão gênica de *EDN3* são necessários na fase do desenvolvimento da crista neural, especialmente à migração de neuroblastos entéricos e melanoblastos [Shin *et al.*, 1999].

As endotelinas são peptídeos de 21 aminoácidos derivados das pré-proendotelinas por um processamento em duas etapas: primeiro, ocorre um passo de clivagem da proendotelina por uma endopeptidase não específica; em seguida, ocorre uma clivagem para produzir a endotelina por meio de uma enzima conversora da endotelina (ECE1) [Kurihara *et al.*, 1999].

A preproendotelina 3 (*EDN3*) é codificada por um gene de 5 exons localizado em 20q13.2. Do processamento alternativo do RNA resultam várias isoformas que afetam principalmente os exons 4 e 5.

Embora várias isoformas tenham sido descritas, a sua expressão e função durante o desenvolvimento são desconhecidas.

Atualmente são 15 mutações descritas na base de dados da síndrome de Waardenburg (<http://grenada.lumc.nl/LOVD2/WS/>) nesse gene, compreendendo uma deleção de poucas bases, 13 substituições e uma inserção de poucas bases (Fig.9).

No caso do gene *EDNRB*, 32 mutações foram descritas na mesma base de dados, compreendendo três deleções de poucas bases, 28 substituições e uma deleção completa do gene (Fig.8). Os últimos estudos em 17 probandos paquistaneses com SW4 revelaram 4 mutações no gene *EDNRB*. A maioria destas mutações está no exon 5 [Jabeen *et al.*, 2012]. Outra mutação neste exon também foi encontrada em um paciente libanês com SW4 [Haddad *et al.*, 2011].

Figura 8: Localização das variações no gene *EDNRB* descritas no banco de dados LOVD (<http://grenada.lumc.nl/LOVD2>).

Figura 9: Localização das mutações no gene *EDN3* na SW descritas no banco de dados LOVD (<http://grenada.lumc.nl/LOVD2/WS/>).

1.1.3.6 Variações do número de cópias (CNV) na SW

As variações do número de cópias são alterações cromossômicas que podem ser deleções, duplicações ou triplicações, detectadas em comparação a um genoma de referência [Stankiewicz e Lupski, 2010]. Estas podem englobar parte ou um gene inteiro ou também podem incluir um segmento contendo vários genes. Por isso, podem alterar funções regulatórias e fisiológicas, contribuindo assim ao desenvolvimento de uma doença. Se uma região deletada ou duplicada contiver genes cujos efeitos são sensíveis à dosagem, isso causa uma variação de expressão e efeitos fenotípicos [Miller *et al.*, 2010].

As variações do número de cópias podem ter consequências funcionais similares às mutações de ponto patogênicas [Lee e Scherer, 2010]. As CNVs podem ser herdadas ou ocorrer como mutações novas. Estão catalogadas em bases de dados públicas de casos clínicos, como a DECIPHER (*Database of Chromosomal Imbalance and Phenotype in Humans using Ensembl Resources* - <http://decipher.sanger.ac.uk/>) e também em banco de dados que compilam CNVs presentes na população geral (*DGV- Database of Genomic Variants* - <http://dgv.tcag.ca/dgv/app/home>).

No caso da síndrome de Waardenburg, as deleções totais ou parciais dos genes já descritas resultam em fenótipos similares ao das mutações de ponto. Wildhardt et al. (2013) realizaram um estudo de CNVs nos genes *PAX3*, *MITF* e *SOX10* com 119 probandos e encontraram seis variações: quatro deleções no gene *PAX3*, uma deleção do gene *MITF* e uma duplicação no gene *MITF*. As CNVs estavam, então, presentes em 5% dos probandos. Em outro estudo foram investigadas as variações do número de cópias na síndrome de Waardenburg [Milunsky *et al.*, 2007], em uma casuística de 48 probandos com SW1. Foram encontradas 3 deleções totais do gene *PAX3*, 2 deleções parciais do gene *PAX3* e uma deleção do gene *MITF*. No total foram encontrados 6/48 (12,5%) probandos com variações do número de cópias.

1.2 Predição de patogenicidade de mutações

O número de variações de um nucleotídeo único (SNVs) descritos no genoma humano está crescendo rapidamente, mas comprovar a associação entre uma possível doença e uma dessas variantes é trabalhoso e complicado.

Filtrar as variantes mais provavelmente patogênicas da grande piscina de dados de SNV e diferenciar SNVs não-sinônimas (nsSNVs) patogênicas de polimorfismos neutros usando abordagens computacionais é muito importante no diagnóstico molecular das doenças genéticas.

As previsões computacionais nem sempre fornecem uma visão clara sobre as mudanças associadas aos mecanismos moleculares, mas eles fornecem informação significativa sobre a importância dos resíduos de aminoácidos em posições específicas e se as variações permitem manter os papéis funcionais da proteína correspondente. Também ajudam a determinar o efeito de alterações em aminoácidos com respeito à estabilidade das proteínas.

Vários algoritmos computacionais foram desenvolvidos e implementados para uma previsão precisa do efeito de nsSNVs. Cada um deles envolve métodos que diferem de acordo com as propriedades do tipo da variante. Alguns destes algoritmos avaliam a

conservação dos aminoácidos, e outros avaliam as propriedades estruturais com base em evidências bioquímicas previamente estabelecidas.

Os diferentes *softwares* de previsão de mutações podem classificar as mutações como:

- Patogênica: contribui mecanicamente à doença, mas não é necessariamente totalmente penetrante (ou seja, pode não ser suficiente por si só para causar doença).
- Danosa: altera os níveis normais ou função bioquímica do gene ou do produto do gene.
- Deletéria: reduz a aptidão reprodutiva dos portadores, e seria assim, alvo da seleção natural.

A falta de clareza nos termos utilizados para as variantes causa uma grande confusão na genética humana [MacArthur *et al.*, 2014].

Várias ferramentas foram projetadas para prever a patogenicidade dos nsSNVs como o SIFT (*Sorting Intolerant From Tolerant*) [Kumar *et al.*, 2009]. SIFT é um algoritmo que tem sido amplamente utilizado para identificar os nsSNVs deletérios. Ele fornece uma pontuação de conservação e fornece uma visão sobre efeito de nsSNPs nas propriedades funcionais da proteína. O SIFT faz inferências a partir da similaridade de sequências usando operações matemáticas e calcula a probabilidade de que uma variante não sinônima seja tolerada. O SIFT classifica as variações como danosas (<0.05) ou toleráveis (>0.05).

O *Polyphen2* [Adzhubei *et al.*, 2010] é uma excelente ferramenta para determinar as consequências funcionais da nsSNPs. *PolyPhen2* utiliza uma combinação de atributos da sequência baseados na estrutura, assim ele faz uma previsão do efeito da mutação na proteína e classifica as variações como danosas, provavelmente danosas (maior confiança na predição), possivelmente danosas (menor confiança na predição) e benigna.

LRT *Likelihood Ratio Test* [Chun e Fay, 2009] é um programa que ajuda a identificar as mutações deletérias que modificam os aminoácidos conservados dentro das sequências das proteínas codificadas. O programa as classifica como deletérias ou neutras.

MutationTaster [Schwarz *et al.*, 2010] é um programa rápido de avaliação do potencial das alterações na sequência do DNA que causam doenças. O *MutationTaster* classifica as variações com a ajuda da base de dados dbSNP e clinVAR, classificando as como patogênicas, provavelmente patogênicas e polimórficas.

1.2.1 ANNOVAR

ANNOVAR (*ANNOtation VARiation*) [Wang *et al.*, 2010b] é um *software* com ferramentas para anotações de variantes. As utilidades do ANNOVAR incluem:

- Anotar a previsão dos efeitos da substituição de bases, pequenas inserções e deleções na sequência de aminoácidos das proteínas pelos programas SIFT, Polyphen2, LRT e MutationTaster;
- Anotar as regiões conservadas por meio do GERP++, PhyloP e PhCons;

- Anotar as frequências alélicas conhecidas das variantes, dos bancos dbSNP, do projeto 1.000 Genomas [Consortium *et al.*, 2012a] e do Projeto de Sequenciamento de exomas [Fu *et al.*, 2013].

1.2.2 CADD

Os métodos atuais para anotação e interpretação das variações genéticas humanas tendem a explorar um único tipo de informação (por exemplo, conservação) ou número limitado de informações. O CADD (*Combined Annotation Dependent Depletion*) [Kircher *et al.*, 2014] é um método para integrar as diversas anotações em um único índice (*C score*) para cada variante. CADD é um algoritmo treinado para diferenciar os milhões de alelos humanos de SNPs das variações potencialmente patogênicas.

O *C score* é aplicado para todas as 8,6 bilhões de variantes (SNVs) possíveis, e atribui um índice às variações, inserções e deleções pequenas. Esses índices correlacionam-se com:

- anotar a diversidade de alelos na população;
- as anotações de funcionalidade;
- anotar a previsão dos efeitos da substituição de bases, pequenas inserções e deleções na sequência de aminoácidos das proteínas pelos programas SIFT, Polyphen2, LRT e MutationTaster;
- anotar as observações experimentais dos efeitos reguladores;
- as associações com doenças complexas.

Para gerar os valores de *C score* são utilizados o VEP (*Variant Effect Predictor*) [McLaren *et al.*, 2010], os dados do projeto ENCODE [Consortium *et al.*, 2012b] e as informações do UCSC *Genome Browser* [Meyer *et al.*, 2013]. Esses valores também consideram a conservação das variantes pelos programas *phastCons* [Siepel *et al.*, 2005], *phyloP* [Pollard *et al.*, 2010].

Os valores de *C score* para variações não sinônimas com potencial a serem patogênicas (Figura 10) estão localizados no intervalo de 5 a 25, com a mediana igual a 15. Para o códon de parada prematuro, os valores estão no intervalo de 10 a 60, com mediana igual a 37. Esses valores de *C score* foram obtidos a partir da análise de 905 doenças genéticas com pelo menos 5 mutações patogênicas conhecidas, 74 variações de genes essenciais e 157 variantes associadas a doenças identificadas em estudos de GWAS.

Figura 10: Medianas das pontuações de *C score* em variações não sinônimas patogênicas e códon de parada prematura [Kircher *et al.*, 2014].

2 Objetivos

2.1 Objetivo geral

O objetivo do presente estudo é a identificação de mutações em genes já associados a SW em uma amostra brasileira e caracterização da frequência dos tipos de mutações nessa casuística.

2.2 Objetivos específicos

Para atingir esse objetivo foram executadas as seguintes etapas:

1. Rastreamento de diferentes tipos de mutações nos genes *PAX3*, *MITF*, *SOX10*, *EDN3*, *EDNRB* e *SNAI2*, por meio do sequenciamento Sanger do DNA e comparação dos nossos resultados com estudos realizados em outros países.
2. Investigação da presença de microdeleções e microduplicações nos casos sem mutação detectada nas análises descritas acima, por meio de técnica de MLPA (*Multiplex Ligation-dependent probe Amplification*), empregando o *kit* SALSA P186-B1, que inclui sondas para estudo dos genes *PAX3*, *MITF* e *SOX10*.
3. Classificação dos tipos de SW com base em critérios clínicos e moleculares.
4. Determinação das frequências dos diferentes tipos de mutações detectadas na amostra brasileira.
5. Revisão crítica das mutações descritas como patogênicas associadas a SW no banco de dados LOVD (*Leiden Open Variation Database*).

3 Material e métodos

3.1 Casuística

Nossa casuística é composta por 48 propósitos com diagnóstico da síndrome de Waardenburg. Os pacientes foram classificados em três grupos, de acordo com critérios clínicos, mostrados na Tabela 5. Os estudos clínicos foram realizados utilizando-se uma ficha-padrão [Pardono, 2005] sob a supervisão do Dr. Paulo A. Otto. Parte da casuística (35 famílias) foi averiguada e clinicamente descrita durante o doutorado da Dra. Eliete Pardono [Pardono, 2005]. Novos pacientes com SW também foram averiguados mais recentemente entre os consulentes do Serviço de Aconselhamento Genético do Laboratório de Genética Humana, Departamento de Genética e Biologia Evolutiva, IB-USP.

Tabela 5: Pacientes caracterizados clinicamente da casuística do laboratório.

síndrome de Waardenburg	caso familiar	caso isolado
Tipo I	10	13
Tipo II	5	20

Convém destacar que no grupo de propósitos classificados como pertencendo ao tipo II e que são casos isolados há probabilidade pequena de se tratar de casos do tipo I, porém sem telecanto.

3.2 Análises moleculares

3.2.1 Extração de DNA

A extração de DNA a partir do sangue periférico dos casos mais antigos foi realizada com a técnica fenol-clorofórmio, e nos casos recentes foi realizada por método automatizado no equipamento Autopure LS (*Gentra Systems*, Minneapolis, Minnesota, USA). Posteriormente, cada amostra de DNA foi quantificada com o aparelho Nanodrop ND-1000 (*Nanodrop Technologies*, Rockland, Delaware, USA).

3.2.2 Estratégias de análise das mutações

A triagem de mutações relacionadas à síndrome de Waardenburg foi feita segundo a estratégia ilustrada na Figura 11 e descrita a seguir:

1. Primeiramente foram sequenciados os genes *PAX3* e *MITF* em todas as amostras de probandos;
2. Nas amostras dos propósitos em que não foram encontradas mutações no passo anterior, foi sequenciado o gene *SNAI2*;
3. Nas amostras dos propósitos em que não foram encontradas mutações no passo anterior, sequenciou-se o gene *SOX10*;
4. Nas amostras dos propósitos em que não foram encontradas mutações no passo anterior, aplicou-se o MLPA;

5. Nas amostras dos propósitos em que não foram encontradas mutações no passo anterior, sequenciaram-se os genes *EDN3* e *EDNRB*.

Figura 11: Estratégia da triagem dos genes da síndrome de Waardenburg.

3.2.3 Reações de PCR para sequenciamento

O DNA foi amplificado por meio da reação em cadeia da polimerase (PCR). As sequências completas dos *primers* utilizados para amplificação dos exons 2, 3, 5, 6, 7 e 8 [Baldwin *et al.*, 1992, Macina *et al.*, 1995] e os exons 1, 4, 9 e 10 [Pardono *et al.*, 2006] do gene *PAX3* são listadas na Tabela 6. Os pares utilizados para amplificação dos exons do gene *MITF* [Pardono, 2005] são mostrados na Tabela 7, que mostra também o tamanho dos fragmentos amplificados correspondentes. As demais sequências dos *primers* que foram utilizadas nesse estudo foram projetadas com o programa *Primer 3* (<http://frodo.wi.mit.edu/primer3/input.htm>), que avalia sua especificidade e capacidade de amplificação no genoma humano, disponível na página da Universidade de Califórnia Santa Cruz UCSC In-Silico-PCR (<http://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgPcr>). Os *primers* desenhados para amplificar os genes *EDN3*, *SOX10*, *EDNRB* e *SNAI2* são apresentados nas Tabelas 8, 9, 10 e 11, respectivamente.

Tabela 6: *Primers* utilizados na amplificação do gene *PAX3*.

Nome dos <i>primers</i> exons	Sequência dos <i>primers</i>	Temp.(°C) de hibridação	Fragmento amplificado
<i>PAX3</i> -1F <i>PAX3</i> -1R	TGACCAGCTTTGGGTAAAA GCTGAGGCCCTCCCTTAC	55	500pb
<i>PAX3</i> -2F <i>PAX3</i> -2R	TGTCGAGCAGTTTCAGCG CAGTCTGGGAGCCAGGAG	58	408pb
<i>PAX3</i> -3F <i>PAX3</i> -3R	CAGAGGCGGTGGGGCCGCCGCCAC GTCGACGTGCCGGGGTAATAGCCAC	55	268pb
<i>PAX3</i> -4F <i>PAX3</i> -4R	ACAGCCCTGCTTGTCTCAAC CTCCAAGTCACCCAGCAAGT	55	210pb
<i>PAX3</i> -5F <i>PAX3</i> -5R	GAGAGAACTTGGATTCAATCTCAG CCTGTCTGGACTGAAGTAGGACAC	55	326pb
<i>PAX3</i> -6F <i>PAX3</i> -6R	ACTATTATTTTCATCAGTGAATCC ATAAAATATCCACCAGAGAAATCG	55	280pb
<i>PAX3</i> -7F <i>PAX3</i> -7R	TGCACTGAACTTTCTCTGCTGGCC CTGGTATACAGCAAATCGTCTGTC	55	321pb
<i>PAX3</i> -8F <i>PAX3</i> -8R	CTCTTTTTTTTAGGTAATGGGAC GAGTTTATCTCCCTTCCAGG	57	311pb
<i>PAX3</i> -9F <i>PAX3</i> -9R	CAAGCCTTTGATAGCACGGTA TCAATCACTCTCCTTTGTCTCCT	56	298pb
<i>PAX3</i> -10F <i>PAX3</i> -10R	AGGAGACAAAGGAGAGTGATTGA CTCTCCCCACACAGGAAAGG	57	600pb

Tabela 7: *Primers* utilizados na amplificação do gene *MITF*.

Nome dos <i>primers</i> exons	Sequência dos <i>primers</i>	Temp.(°C) de hibridação	Fragmento amplificado
<i>MITF</i> -1F <i>MITF</i> -1R	AAAAGGCCCTTATGTGAACG TGGCATCAAATAATAAACAGCA	56	393pb
<i>MITF</i> -2F <i>MITF</i> -2R	GGAAGAGGCCGTCTGAAACTC GTGGCCACAAAGGACAAACTA	57	399pb
<i>MITF</i> -3F <i>MITF</i> -3R	GTTGCTGTGCCATCAGCTT AAGGTGTGATCCACCACAAAA	60	247pb
<i>MITF</i> -4F <i>MITF</i> -4R	CCTGTGAATGAAAAAGTAAACATCTC AAAAGTTACGTCCATGAGTTGGA	55	396pb
<i>MITF</i> -5F <i>MITF</i> -5R	TGTGCAACTTCAAACAGTTCC CAGCTGTAGGAATCAACTCTCCC	55	229pb
<i>MITF</i> -6F <i>MITF</i> -6R	AAATGCATACATGGCACTGTT CAAAGGGAGAGGGGAGACTT	57	248pb
<i>MITF</i> -7F <i>MITF</i> -7R	TGAGCCTCAAATCCTAAAAATATC TCTTGAAGTCGGTAAAAAGCA	54	246pb
<i>MITF</i> -8F <i>MITF</i> -8R	AATGACGCGCATCTACCATT GTGTGCTCCGTCTCTTCCAT	58	500pb

Tabela 8: *Primers* utilizados na amplificação do gene *EDN3*.

Nome dos <i>primers</i> exons	Sequência dos <i>primers</i>	Temp.(°C) de hibridação	Fragmento amplificado
<i>EDN3</i> -EN1BF <i>EDN3</i> -EN1BR	GAAAAGCCCGAGCCACAG CGCGACGCACATCTTCT	61	379pb
<i>EDN3</i> -EN2F <i>EDN3</i> -EN2R	CAGACATTTTGCTTGCTCCA CAGGCTCTGGGCTAACTGA	62	528pb
<i>EDN3</i> -EN3F <i>EDN3</i> -EN3R	GGTGGTTCTCGCTCCACAC TGCAGGATGTGACTGAACTATCC	56	372pb
<i>EDN3</i> -EN4F <i>EDN3</i> -EN4R	GGAACGCACTAATGTGCTCA AACGGTCCACCAAAGGC	62	336pb
<i>EDN3</i> -EN5F <i>EDN3</i> -EN5R	ACTTTTCCAGTCTGGTGGT CAGTATTGTTAAGTGGGGACTC	56	458pb

Tabela 9: *Primers* utilizados na amplificação do gene *SOX10*.

Nome dos <i>primers</i> exons	Sequência dos <i>primers</i>	Temp.(°C) de hibridação	Fragmento amplificado
<i>SOX10</i> -1AF <i>SOX10</i> -1AR	GTTGGACTCTTTGCGAGGAC CACCAGCGTCCAGTCGTAG	60	342
<i>SOX10</i> -1BF <i>SOX10</i> -1BR	GATGACAAGTTCCCCGTGTG AATCCACCCGAAGCTAGAGG	61	287
<i>SOX10</i> -2F <i>SOX10</i> -2R	TCCAAGATGGACACTCAGAGG CCTCAGCTCTGTTCATCAGCA	60	388
<i>SOX10</i> -3AF <i>SOX10</i> -3AR	CACCTGCCTCTAACCTGCTT GAGATCCAGGCGGAGTGTC	60	366
<i>SOX10</i> -3BF <i>SOX10</i> -3BR	TTTGATGTGGCTGAGTTGGA ATAGGGTCCTGAGGGCTGAT	59	360
<i>SOX10</i> -3CF <i>SOX10</i> -3CR	CAGCCTTCCCCTCCATCT CAAGGAACAGGGCACACAG	60	298

Tabela 10: *Primers* utilizados na amplificação do gene *EDNRB* .

Nome dos <i>primers</i> exons	Sequência dos <i>primers</i>	Temp.(°C) de hibridação	Fragmento amplificado
<i>EDNRB</i> -1AF <i>EDNRB</i> -1AR	GAGGAGTCTGGCGGTGAT ACCGAAGCCCCAGAATAAG	60.2	317
<i>EDNRB</i> -1BF <i>EDNRB</i> -1BR	TCCTGTCTTCCTTCCTCTGC CTTGATCTCGATGGGTCCTT	59.5	372
<i>EDNRB</i> -1CF <i>EDNRB</i> -1CR	GGTGCCTAAAGGAGACAGGA CTCAAGCCCACCATGATTTC	60	310
<i>EDNRB</i> -2F <i>EDNRB</i> -2R	ACCAGAGTTTATCCTACTCTGCAT GCACAGTTTATTTTCTAAGTAACATGG	57.6	298
<i>EDNRB</i> -3F <i>EDNRB</i> -3R	CTGTGCAATTCAATAAACTAAGG GGGAACAGGGGAAAAATAGC	58	339
<i>EDNRB</i> -4F <i>EDNRB</i> -4R	GAAGATAATCATTCCTGATGAA CAAGAAAAAGGAAATATGCTCTGG	59	373
<i>EDNRB</i> -5F <i>EDNRB</i> -5R	AAATGTTCGTTTTAGAAGATAGAATGC AAGATCGATGGAAACACTTCTGA	58.5	277
<i>EDNRB</i> -6F <i>EDNRB</i> -6R	AAGCACAGAAGCTACAATGACTACA GCAGTTTTGAAAGCTTATATTTGA	57	250
<i>EDNRB</i> -7F <i>EDNRB</i> -7R	AACCCTGGAGAGGAGGAAGA TTTGTTTTGGCAAATGTTTCA	60	290

Tabela 11: *Primers* utilizados na amplificação do gene *SNAI2* .

Nome dos <i>primers</i> exons	Sequência dos <i>primers</i>	Temp.(°C) de hibridação	Fragmento amplificado
<i>SNAI2</i> -1F <i>SNAI2</i> -1R	AACCCTCCCAGCCAAAAC TCTTTGGCTCTTTTGTAATGGT	58	365
<i>SNAI2</i> -2AF <i>SNAI2</i> -2AR	TGTGTGTATACTTGCGTGTGGA TATTGCATAAATTGCACTGAAAC	59	400
<i>SNAI2</i> -2BF <i>SNAI2</i> -2BR	AGCTACCCAATGGCCTCTCT CCCAGGGCTTCATTGTATCT	60.2	478
<i>SNAI2</i> -3F <i>SNAI2</i> -3R	AATCAGGTTTTTGCTGCTTCTC CAGGAGAAAATGCCTTTGGA	59	394

A amplificação dos fragmentos foi feita em um volume total de 25 μ l, cujos componentes são descritos na Tabela 12 e as condições de amplificação foram as seguintes: cinco minutos de desnaturação inicial a 94 °C; um minuto à temperatura de hibridação, calculada para cada *primer*; e um minuto a 72 °C, seguidos de uma etapa de extensão de 10 minutos a 72 °C.

Tabela 12: Componentes da reação em cadeia da polimerase utilizados para amplificação de fragmentos de todos os genes.

Solução	μ l por amostra
H ₂ O	16,8
<i>Buffer</i> caseiro	2,5
dNTPs(200 μ M)	2,5
<i>Primer</i> F (0,7 a 2,0 μ M)	0,5
<i>Primer</i> R(0,7 a 2,0 μ M)	0,5
<i>Taq</i> polimerase (1,5 U)	0,2
DNA Genômico (80-200ng)	2
Total	25,0

3.2.4 Sequenciamento do DNA pelo método de Sanger

Os experimentos de sequenciamento convencional dos genes *PAX3*, *MITF*, *SNAI2*, *SOX10*, *EDN3* e *EDNRB* se iniciaram pela PCR. *Primers* específicos a exons de cada gene foram utilizados na sua amplificação. O produto das reações de PCR foi purificado usando Exonuclease I e *Shrimp Alkaline Phosphatase* (USB-ExoSAP-IT, Affymetrix, Santa Clara, CA, USA). De acordo com o protocolo sugerido pelo fabricante foram preparadas reações de sequenciamento nas seguintes condições: 30-60 ng de DNA (amplificado e purificado), 0,5 μ l (1 μ l) de *primer*, 2 μ l de *BidDye Terminator v3.1* (*Applied Biosystems*, Foster City, CA, USA), 1 μ l de tampão (que acompanha o *kit*) e água até completar o volume de reação de 10 μ l. A mistura foi submetida a 30 ciclos de desnaturação de 20s a 95°C, hibridação de 15s à temperatura correspondente a cada fragmento e extensão de 1 minuto a 60°C. Depois, os produtos foram precipitados com *Sephadex* (*Amersham Biosciences*, Buckinghamshire, UK). No procedimento de precipitação por meio de *Sephadex*, colocou-se o *Sephadex* nos poços de uma placa de purificação (Millipore, Billerica, IR) e adicionou-se 300 μ l de água milli-Q. Depois de aguardar por 3 horas para permitir a hidratação do *Sephadex*, centrifugou-se por 5 minutos a 2100 rpm para remover toda a água. Foram adicionados 150 μ l de água e centrifugou-se duas vezes (uma centrifugação por 5 minutos e outra por 2 minutos) com a finalidade de remover a água. As amostras de sequenciamento foram dispensadas na placa de purificação contendo o *Sephadex* hidratado e centrifugadas novamente por 5 minutos a 2100rpm. Após a purificação por *Sephadex*, elas foram incubadas por 20 minutos a 95°C e em seguida analisadas no equipamento ABI3730 (*Applied BioSystem*, Foster City, CA, USA).

3.2.5 Pacotes computacionais para análises das sequências

Os *softwares* usados para análise do alinhamento das sequências obtidas foram:

- *Chromas* (<http://chromas-lite.software.informer.com/2.1/>)
- *Bioedit* (<http://www.mbio.ncsu.edu/bioedit/bioedit.html>)

- *Codon Aligner* (<http://www.codoncode.com/aligner/>)

Para avaliar os possíveis efeitos das mutações foram utilizados os seguintes *softwares* preditivos:

- *PolyPhen2* (<http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/>);
- *MutationTaster* (<http://www.mutationtaster.org/>);
- *SIFT* (<http://sift.jcvi.org/>);
- *LRT- Likelihood Ratio Test* (https://www.princeton.edu/Likelihood-ratio_test.html).

No presente trabalho avaliou-se se as sequências onde ocorreram mutações eram conservadas em outras espécies por meio dos programas GERP++ [Cooper *et al.*, 2005] e phastCons [Siepel *et al.*, 2005]. A frequência dessas mutações foi também pesquisada nas bases de dados de bioinformática atualizadas de 1000 genomas (2012) [Consortium *et al.*, 2012a], ESP6500 [Fu *et al.*, 2013], dbSNP135, ANNOVAR [Wang *et al.*, 2010b] e CADD [Kircher *et al.*, 2014]. Assim, se a frequência da mutação na população normal é maior ou igual a 1%, independente da natureza da mutação (substituição de aminoácido ou não), postula-se que esta é uma variação polimórfica com baixa probabilidade de patogenicidade.

Também no presente trabalho buscaram-se as mutações relacionadas à síndrome de Waardenburg descritas na bases de dados LOVD (<http://grenada.lumc.nl/LOVD2/WS/>) nos genes *PAX3*, *MITF*, *SOX10*, *EDN3* e *EDNRB* verificando-se a sua frequência, a conservação da região e a probabilidade de patogenicidade.

3.2.6 MLPA (*Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification*)

A técnica de MLPA foi aplicada nas amostras dos pacientes que não revelaram mutações após sequenciamento dos genes correspondentes aos tipos de SW que apresentam. A técnica de MLPA permite detectar alterações no número de cópias em até 50 sequências diferentes de DNA em uma única reação de amplificação. A técnica possibilita a identificação de duplicações e deleções em um grande número de sequências simultaneamente. A identificação do número de cópias de uma dada sequência é efetuada por meio da hibridação de sondas específicas a essa sequência. A empresa que desenvolveu a técnica de MLPA, MRC-Holland (<http://www.mrc-holland.com/>), disponibiliza centenas de *kits* de sondas para o estudo de diversas doenças genéticas ou síndromes conhecidas, incluindo o *kit* de sondas para os genes *PAX3* e *MITF*, cujas mutações são responsáveis pela síndrome de Waardenburg, que foi empregado nesse estudo (*kit* SALSA P186-B1). O protocolo para a execução da reação de MLPA encontra-se disponível na página eletrônica da MRC-Holland (<http://www.mlpa.com>). Após a amplificação por PCR, os produtos obtidos foram separados juntamente com um padrão de peso molecular por eletroforese em capilar pelo aparelho ABI 3730xl DNA Analyzer (*Applied Biosystems*, Carlsbad, California, USA). Os resultados foram analisados no software GeneMarker (*SoftGenetics*, State College, Pennsylvania, USA) que foi utilizado para ler picos de fluorescência e interpretar os resultados. Na análise dos resultados, as alturas dos picos de fluorescência de cada sonda amplificada, referentes a cada indivíduo, foram normalizadas de modo a

indicar um valor que permite estimar o número de cópias do gene dessa amostra. Os dados foram normalizados da seguinte maneira:

- Normalização intra-amostra: a altura do pico referente ao produto da amplificação de uma sonda de um indivíduo foi dividida pela média das alturas dos picos de todas as sondas do mesmo indivíduo testado;
- Normalização final: o valor obtido na normalização intra-amostra foi dividido pela média das alturas dos picos referentes à mesma sonda de todas as amostras controle. O valor obtido nessa divisão foi utilizado para estimar o número de cópias. Valores abaixo de 0,7 foram considerados como indicativos de deleção do gene. Os indivíduos com número normal de cópias de um gene apresentam um valor bem próximo de 1,0. Valores acima de 1,5 são indicativos de duplicação.

Foram utilizados 6 indivíduos normais como controle em cada bateria de reações de MLPA.

4 Resultados e discussão

4.1 Descrição da casuística

Foi estudada molecularmente uma casuística de 48 propósitos com SW, os quais já haviam sido clinicamente avaliados. Nesse total, 35 famílias foram descritas na tese de doutorado de Pardono (2005). Embora na tese [Pardono, 2005] tenha se apresentado resultados preliminares sobre rastreamento de mutações, todas as análises anteriormente feitas foram repetidas nesse estudo. Os novos casos incluídos no estudo foram averiguados entre os pacientes encaminhados ao serviço de aconselhamento genético do Laboratório de Genética Humana (Departamento de Genética e Biologia Evolutiva IB-USP) e foram examinados nas instalações do Centro de Estudos do Genoma Humano.

4.2 Resultado da triagem de mutações e análise do efeito das mutações

A triagem molecular dos pacientes foi executada de acordo com a estratégia mostrada na Figura 11 (na página 39).

No total foram encontradas 25 alterações (seis microdeleções e 19 alterações do tipo substituição de nucleotídeos e indels).

Dessas 25 alterações, só 19 (Tabela 13) (seis microdeleções e 13 substituição de nucleotídeos e indels) foram estudadas mais cautelosamente porque as outras seis foram consideradas não patogênicas (Tabela 14), pela elevada frequência na casuística.

Dentre as 19 variações, foram estudadas cuidadosamente as 13 substituição de nucleotídeos e indels (não CNVs) com os algoritmos ANNOVAR e CADD. Os critérios que se usaram para decidir quais eram as variantes patogênicas foi a previsão com base nos *softwares* *PolyPhen2* (danosa, provavelmente danosa ou benigna), *MutationTaster* (patogênica ou polimórfica), *SIFT* (danosa ou tolerável) e *LRT* (deletéria ou neutra). Além disso, as variações foram analisadas em relação a suas frequências na população (1000 genomas, 6500ESP). Também se realizou o estudo da conservação de aminoácidos em relação a outras espécies (PhyloP e PhCon). Os resultados estão apresentados na Tabela 15.

Das 13 mutações, oito são não sinônimas, três levam à mudança de matriz de leitura e duas a códon de parada prematuro. Dentre as oito nsSNVs (variações de um nucleotídeo único não sinônimas), duas mutações (c. 944C>A no gene *PAX3* e c. 914G>A no gene *EDNRB*) foram descritas pelo ESP (*Exome Study Projet*) e as mesmas estão descritas no banco de dados 1000 Genomas com frequências iguais a 1% e 2%, respectivamente. O estudo da patogenicidade das oito mutações não sinônimas (nsSNVs) em vários programas de predição da patogenicidade utilizados sugerem que:

- 6/8 são deletérias e 2/8 não são deletérias segundo o LRT;
- 6/8 são patogênicas e 2/8 polimórficas, segundo o *MutationTaster*;
- 6/8 são danosas e 2/8 como benignas, segundo o *PolyPhen2*;
- 6/8 são danosas e 2/8 como toleráveis, segundo o SIFT;

- 7/8 são conservadas nos primatas, 6/8 conservadas em mamíferos e 7/8 nos vertebrados, segundo o *PhastCons*;
- 6/8 são conservadas e 2/8 não são conservadas, segundo o *PhyloP*.

O valor *C score* das variações sugere que 4/8 delas tem potencial patogênico. As mutações c.944C>A no gene *PAX3*, c.914G>A no gene *EDNRB*, possivelmente não são patogênicas, principalmente por causa da sua frequência aumentada observada no 1000 genomas e 6500ESP. Embora os *softwares* tenham determinado que essas mutações possam ser deletérias, danosas ou patogênicas, elas ocorrem com frequência superior a 1% na população em geral. A mutação c.944C>A no gene *PAX3* possui uma frequência de 2%, por isso é mais provável que não seja a causa da SW1. A mutação c.914G>A no gene *EDNRB* possui uma frequência de cerca de 1%. Estas frequências sugerem que estas mutações podem ser polimorfismos sem efeito clínico. As demais 17 mutações não foram detectadas como variações presentes em pessoas normais nos bancos de dados, o que eleva a probabilidade de serem realmente patogênicas.

O caso F-33 é muito particular. A mutação foi encontrada no gene *MITF* (c.1067C>T) e a propósa é um caso isolado na família, apresenta telecanto ($W = 2,11$) e foi classificada com SW1. Porém, não foram encontradas mutações no gene *PAX3* e em nenhum outro gene responsável pela SW1. A mutação encontrada no gene *MITF* não está presente nos pais e é uma mutação não descrita e nem associada a SW. No estudo computacional esta mutação foi apontada como benigna pelo *Polyphen2*, tolerável pelo *SIFT*, neutra pelo programa *LRT* e polimórfica pelo *MutationTaster*, além de envolver um aminoácido não conservado, colocando-se assim em dúvida sua patogenicidade e associação com a síndrome. No entanto, o fato de ser mutação nova torna razoável atribuir a síndrome a sua presença.

Em resumo, 17 mutações podem ser consideradas associadas ao SW dentro de nossa casuística de 48 probandos (35,4%), sendo dez no gene *PAX3* (20,8%), três no gene *MITF* (6,3%) e quatro mutações no gene *SOX10* (8,3%). Deleções totais e parciais nos genes *PAX3*, *MITF* e *SOX10* foram encontradas em seis pacientes (12,5%). Nos genes *SNAI2* e *EDN3* nenhuma mutação patogênica foi encontrada.

Em um estudo similar feito na Alemanha [Wildhardt *et al.*, 2013] com uma casuística de 119 probandos, onde investigaram as CNVs dos genes *PAX3*, *MITF* e *SOX10* e foram sequenciados os genes *PAX3* e *MITF*, foram encontradas 19 mutações associadas à SW (16%). A maioria foi encontrada no gene *PAX3* (12%), e o restante no gene *MITF* (4%). Os demais genes associados à SW não foram estudados. Em outro estudo de CNVs nos genes *PAX3*, *MITF* e *SOX10* [Milunsky *et al.*, 2007], foram estudados 109 pacientes (48 com SW1 ou SW3, 41 SW2 e 20 casos isolados) foram encontradas três deleções totais no gene *PAX3* (2 SW1; 1 SW3), duas deleções parciais no *PAX3* (SW1, exon 1; SW1, exons 5-9) e uma deleção parcial no gene *MITF* (classificado como "SW1", exons 3-10). No total, nesse estudo de 109 pacientes, foram encontradas seis microdeleções (5,5%). Mas o estudo aponta que a maioria das deleções foram encontradas dentro do grupo classificado como SW1 (48 probandos), estimando-se assim a frequência de 5/48 (10,6%). No presente estudo foram encontrados seis CNVs em uma casuística de 48 (12,5%), sendo a maioria microdeleções não herdadas que corresponderam a cerca de (35%) das mutações detetadas.

No presente estudo, no grupo dos casos familiares com SW1 encontramos mutação

considerada patogênica no gene *PAX3* em 4/10 casos. No grupo dos casos isolados com SW1 encontramos mutação patogênica no gene *PAX3* em 6/14. Para nossa surpresa encontramos mutação patogênica no gene *MITF* em um dos pacientes desse grupo, o que nos fez reclassifica-lo em SW2. Supomos que o índice W aumentado nesse paciente ($W = 2, 11$) seja uma característica familiar, desvinculada da ocorrência de SW.

No grupo dos casos familiares com SW2 encontramos mutação patogênica no gene *MITF* em 1/5 dos casos. No grupo dos casos isolados com SW2 encontramos 7/19 mutações patogênicas nos genes *MITF* e *SOX10*.

No total foram encontradas onze mutações consideradas patogênicas nos pacientes com a classificação clínica SW1, e oito mutações em pacientes com a classificação clínica SW2, como mostra a Tabela 16.

Tabela 13: Resultado da triagem molecular indicando em negrito as variações do número de cópias e as mutações indicadas como deletérias ou patogênicas pelos pacotes computacionais (Seq: sequenciamento; N: normal; NR: não realizado; del.: deleção). O indivíduo F-33 (Tipo II*) foi reclassificado após detecção da substituição no gene *MITF*

Registro	História familiar	tipo	PAX3		MITF		SOX10		SLUG		EDN3		EDNRB	
			Seq	MLPA	Seq	MLPA	Seq	MLPA	Seq	Seq	Seq	Seq	Seq	Seq
RG-F1	isolado	sw1	N	del. Total	N	N	N	N	NR	NR	NR	NR	NR	NR
RG-F2	isolado	sw2	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
RG-F3	familiar	sw2	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
RG-F4	isolado	sw2	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
RG-F5	isolado	sw1	N	del.Parcial	N	N	N	N	NR	NR	NR	NR	NR	NR
RG-F6	isolado	sw1	N	del. Total	N	N	N	N	NR	NR	NR	NR	NR	NR
RG-F7	isolado	sw1	c.142G>T	N	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR
RG-F8	familiar	sw2	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
RG-F9	familiar	sw1	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
RG-F10	isolado	sw1	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
RG-F11	familiar	sw1	N	del.total	N	N	N	N	NR	NR	NR	NR	NR	NR
RG-F12	familiar	sw1	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
RG-F13	isolado	sw2	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
RG-F14	isolado	sw2	N	N	N	N	c.1091delA	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR
RG-F15	isolado	sw1	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
RG-F16	isolado	sw2	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
RG-F17	familiar	sw2	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
RG-F18	familiar	sw2	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
RG-F19	isolado	sw2	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
RG-F20	isolado	sw2	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
RG-F21	isolado	sw2	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
RG-F22	isolado	sw2	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
RG-F23	isolado	sw1	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
RG-F24	isolado	sw2	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
RG-F25	isolado	sw2	N	N	c.328C>T	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR
RG-F26	familiar	sw1	c.727-739delN	N	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR
RG-F27	isolado	sw2	N	N	N	N	N	N	N	c.914G>A	N	N	N	N
RG-F28	familiar	sw2	N	N	N	N	c.430delC	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR
RG-F29	isolado	sw1	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
RG-F30	isolado	sw1	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
RG-F31	isolado	sw2	N	N	N	N	c.403A>C	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR
RG-F32	isolado	sw2	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
RG-F33	isolado	sw2	N	N	c.1067C>T	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR
RG-F34	isolado	sw2	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
RG-F35	familiar	sw1	c.1195C>G	N	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR
RG-F36	isolado	sw2	N	N	N	N	N	del.Total	NR	NR	NR	NR	NR	NR
RG-F37	isolado	sw2	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
RG-F38	familiar	sw1	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
RG-F39	isolado	sw2	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
RG-F40	familiar	sw1	c.124G>C	N	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR
RG-F41	familiar	sw1	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
RG-F42	isolado	sw2	N	N	N	del.parcial	N	N	NR	NR	NR	NR	NR	NR
RG-F43	isolado	sw1	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
RG-F44	familiar	sw1	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
RG-F45	isolado	sw1	c.944C>A	N	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR
RG-F46	isolado	sw1	c.790C>T	N	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR
RG-F47	familiar	sw1	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
RG-F48	isolado	sw1	c.142G>C	N	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR
TOTAL			7	4	2	1	3	1	1	0	0	1	0	1

Tabela 14: Alterações consideradas não patogênicas (em azul estão as encontradas em homozigose).

Registro	História familiar	tipo	PAX3 Seq	MITF Seq	SOX10 Seq	SLUG		EDN3		EDNRB	
						Seq	Seq	Seq	Seq	Seq	Seq
RG-F1	isolado	sw1	c.129C>T	N	N	NR	NR	NR	NR	NR	NR
RG-F2	isolado	sw2	c.129C>T	N	c.927T<C	N	N	N	N	c.552T>C e c.561c>t c.831A>G	c.552T>C e c.831A>G
RG-F3	familiar	sw2	c.129C>T	N	c.927T<C	N	N	N	N	c.552T>C e c.831A>G	c.552T>C e c.831A>G
RG-F4	isolado	sw2	c.129C>T	N	Nc.927T<C	N	N	N	N	c.552T>C e c.831A>G	c.552T>C e c.831A>G
RG-F5	isolado	sw1	c.129C>T	N	c.927T<C	NR	NR	NR	NR	NR	NR
RG-F6	isolado	sw1	c.129C>T	N	c.927T<C	NR	NR	NR	NR	NR	NR
RG-F7	isolado	sw1	c.129C>T	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR
RG-F8	familiar	sw2	c.129C>T	N	c.927T<C	N	N	N	N	c.552T>C	c.552T>C
RG-F9	familiar	sw1	c.129C>T	N	c.927T<C	N	N	N	N	c.552T>C e c.831A>G	c.552T>C e c.831A>G
RG-F10	isolado	sw1	c.129C>T	N	c.927T<C	N	N	N	N	c.552T>C	c.552T>C
RG-F11	familiar	sw1	c.129C>T	N	c.927T<C	NR	NR	NR	NR	NR	NR
RG-F12	familiar	sw1	c.129C>T	N	c.927T<C	N	N	N	N	c.831A>G	c.831A>G
RG-F13	isolado	sw2	c.129C>T	N	c.927T<C	N	N	N	N	c.831A>G	c.831A>G
RG-F14	isolado	sw2	c.129C>T	N	c.927T<C e c.249C	NR	NR	NR	NR	NR	NR
RG-F15	isolado	sw1	c.129C>T	N	c.927T<C	N	N	N	N	c.552T>C e c.831A>G	c.552T>C e c.831A>G
RG-F16	isolado	sw2	c.129C>T	N	c.927T<C	N	N	N	N	c.552T>C e c.831A>G	c.552T>C e c.831A>G
RG-F17	familiar	sw2	c.129C>T	N	c.927T<C	N	N	N	N	c.552T>C	c.552T>C
RG-F18	familiar	sw2	c.129C>T	N	c.927T<C	N	N	N	N	c.552T>C	c.552T>C
RG-F19	isolado	sw2	c.129C>T	N	c.927T<C e c.249C	N	N	N	N	c.552T>C e c.831A>G	c.552T>C e c.831A>G
RG-F20	isolado	sw2	c.129C>T	N	c.927T<C	N	N	N	N	c.552T>C	c.552T>C
RG-F21	isolado	sw2	c.129C>T	N	c.927T<C	N	N	N	N	c.552T>C	c.552T>C
RG-F22	isolado	sw2	c.129C>T	N	c.927T<C	N	N	N	N	c.552T>C	c.552T>C
RG-F23	isolado	sw1	c.129C>T	N	c.927T<C	N	N	N	N	c.552T>C e c.831A>G	c.552T>C e c.831A>G
RG-F24	isolado	sw2	c.129C>T	N	c.927T<C	N	N	N	N	c.552T>C e c.831A>G	c.552T>C e c.831A>G
RG-F25	isolado	sw2	c.129C>T	N	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR
RG-F26	familiar	sw1	c.129C>T	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR
RG-F27	isolado	sw2	c.129C>T	N	c.927T<C	N	N	N	N	c.552T>C	c.552T>C
RG-F28	familiar	sw2	c.129C>T	N	c.927T<C	NR	NR	NR	NR	NR	NR
RG-F29	isolado	sw1	c.129C>T	N	c.927T<C	N	N	N	N	c.552T>C	c.552T>C
RG-F30	isolado	sw1	c.129C>T	N	N	N	N	N	N	c.552T>C e c.831A>G	c.552T>C e c.831A>G
RG-F31	isolado	sw2	c.129C>T	N	N	NR	NR	NR	NR	NR	NR
RG-F32	isolado	sw2	c.129C>T	N	c.927T<C	N	N	N	N	c.552T>C	c.552T>C
RG-F33	isolado	sw2	c.129C>T	N	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR
RG-F34	isolado	sw2	c.129C>T	N	c.927T<C	N	N	N	N	c.552T>C	c.552T>C
RG-F35	familiar	sw1	c.129C>T	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR
RG-F36	isolado	sw2	c.129C>T	N	c.927T<C	NR	NR	NR	NR	NR	NR
RG-F37	isolado	sw2	c.129C>T	N	c.927T<C	N	N	N	N	c.552T>C	c.552T>C
RG-F38	familiar	sw1	c.129C>T	N	c.927T<C	N	N	N	N	c.552T>C e c.831A>G	c.552T>C e c.831A>G
RG-F39	isolado	sw2	c.129C>T	N	c.927T<C	N	N	N	N	c.552T>C	c.552T>C
RG-F40	familiar	sw1	c.129C>T	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR
RG-F41	familiar	sw1	c.129C>T	N	c.927T<C	N	N	N	N	c.552T>C	c.552T>C
RG-F42	isolado	sw2	c.129C>T	N	c.927T<C	NR	NR	NR	NR	NR	NR
RG-F43	isolado	sw1	c.129C>T	N	c.927T<C	N	N	N	N	c.552T>C	c.552T>C
RG-F44	familiar	sw1	c.129C>T	N	c.927T<C	N	N	N	N	c.552T>C	c.552T>C
RG-F45	isolado	sw1	c.129C>T	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR
RG-F46	isolado	sw1	c.129C>T	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR
RG-F47	familiar	sw1	c.129C>T	N	c.927T<C	N	N	N	N	c.552T>C	c.552T>C
RG-F48	isolado	sw1	c.129C>T	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR

Tabela 15: Previsão do efeito das mutações encontradas na casuística de pacientes com SW e a frequência das mutações encontradas nos bancos de dados 1000 genomas, dbSNP135 e ESP6500 (ND: Não descrita). TG_AF: Média da frequência para alelos alternativos na posição; TG_ASN: Média da frequência na população asiática em 1.000 Genomas; TG_AMR: Média da frequência na população Sul-americana em 1.000 Genomas; TG_AFR: Média da frequência na população Africana em 1.000 Genomas; TG_EUR: Média da frequência na população Europeia em 1.000 Genomas. Programas para previsão da patogenicidade: LRT (D:deletéria N:neutra NA: não analisado), MutationTaster (P:patogênica; PP:polimórfica), Polyphen2 (D:danosa; P:provavelmente danosa; B: benigna) e SIFT (D: danosa; T: tolerável; NA: não analisado). Programas para estudo de conservação: PhastCons e PhyloP (C: conservado; N: não conservado; priPhCons: pontuação da conservação em primatas; mamPhCons: pontuação da conservação em mamíferos; verPhCons: pontuação da conservação em vertebrados); *C score*: índice calculado (5-25); os dados destacados em vermelho não falam a favor da patogenicidade dos SNVs; e em azul são destacadas as variantes não sinônimas.

Reg	Função	Gene	mutação	efeito de AA	Efeito	Tipo	ESP6500	1000g2012	dbSNP135	TG_AF	TG_ASN	TG_AM	TG_AFR	TG_EUR	SIFT	PolyPhen2	LRT_Pred	MutationTas	priPhCons	mamPhCon	verPhCons	PhyloP	Cscore
F-40	exônica	PAX3	c.124G>C *	p.G42R	não sinônima	SNV	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	D	D	D	P	0.959	0.776	1	C	31
F-7	exônica	PAX3	c.142G>T	p.G48C	não sinônima	SNV	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	D	D	D	P	0.989	1	1	C	31
F-48	exônica	PAX3	c.142G>C	p.G48R	não sinônima	SNV	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	D	D	D	P	0.989	1	1	C	33
F-26	exônica	PAX3	c.727-739del	p.242_245del	mudança de matriz de leitura	DEL	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	NA	NA	NA	NA	0.991	1	1	NA	37
F-46	exônica	PAX3	c.790C>T *	p.Q264X	códon de parada prematuro	SNV	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	NA	NA	D	P	0.79	0.963	1	C	40
F-45	exônica	PAX3	c.944C>A	p.T315K	não sinônima	SNV	0.027833	0.02	rs2234675	0.02	ND	0.03	0.004	0.04	D	D	D	P	0.972	0.983	1	N	21
F-35	exônica	PAX3	c.1195C>G *	p.H399D	não sinônima	SNV	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	D	D	N	P	0.99	1	1	C	18.68
F-27	exônica	EDNRB	C.914G>A	p.S305N	não sinônima	SNV	0.009842	0.01	rs5352	0.01	ND	0.02	0.002	0.01	T	B	D	PP	0.97	0.999	1	C	8.656
F-33	exônica	MITF	c.1067C>T *	p.T356I	não sinônima	SNV	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	T	B	N	PP	0.013	0.002	0.002	N	4.216
F-25	exônica	MITF	c.328C>T *	p.R110X	códon de parada prematuro	SNV	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	NA	NA	D	P	0.771	0.736	0.941	N	23.1
F-31	exônica	SOX10	c.403A>C *	p.S135R	não sinônima	SNV	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	D	D	D	P	0.995	1	1	C	25.3
F-28	exônica	SOX10	c.430delC *	p.L144fs	mudança de matriz de leitura	DEL	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	NA	NA	NA	NA	0.755	1	1	C	12.23
F-14	exônica	SOX10	c.1091delA *	p.Q364fs	mudança de matriz de leitura	DEL	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	NA	NA	NA	NA	0.99	1	1	C	34

Tabela 16: Resumo das mutações encontradas em relação à classificação clínica inicial.

síndrome de Waardenburg	Número de propósitos	Mutações encontradas
Tipo 1 isolado	13	7 (54%)
Tipo 1 familiar	10	4 (40%)
Tipo 2 isolado	20	6 (30%)
Tipo 2 familiar	5	1 (20%)

4.3 Descrição dos pacientes com mutações consideradas patogênicas no gene *PAX3*

RG F-7

O caso é isolado na família. O heredograma é apresentado na Fig.12. O propósito (II-2) apresenta encanecimento precoce, sinófre, telecanto pouco conspícuo, íris azuis hipocrômicas, palato alto, deficiência auditiva profunda bilateral (perda de 70 a 80%), base nasal alta e larga (Fig.13), hipoplasia das asas nasais, narinas pequenas, apresentou temporariamente uma mancha hipopigmentada no braço e problema de permeabilidade no canal lacrimal.

O paciente foi estudado clinicamente e classificado como portador de SW1, com índice $W = 2,07$. Foi detectada a mutação no gene *PAX3* c.142 G>T (Fig.14). Esta mutação já foi descrita no banco de dados LOVD, mas não foi descrita pelo 1000 genomas e nem em exomas. No estudo da previsão apontou a mutação como danosa (*Polyphen2* e *SIFT*), deletéria (*LRT*) e patogênica (*MutationTaster*).

Foi coletado DNA dos pais e detectou-se que o pai do paciente também é portador da mesma mutação, mas ele não foi avaliado clinicamente.

Figura 12: Heredograma da família do propósito F-7 (II-2).

Figura 13: Fotografia da região média da face do paciente F-7.

Figura 14: Resultado do sequenciamento do paciente F-7 indicando a mutação c.142 G>T em heterozigose (análise no *Bioedit*).

RG F-26

O caso é familiar. O heredograma é apresentado na Figura 15. O propósito (VI-8) era uma criança com olhos azuis claros que apresenta surdez profunda bilateral, sem outros sinais que indicassem ser ele portador da SW. O pai da criança declarou que vários parentes afastados, que residiam no Maranhão, eram claramente afetados pela síndrome. Eles foram avaliados pela Dra. Eliete Pardono e o estudo molecular dos afetados revelou a presença de uma deleção de 13 pares de bases no gene *PAX3*. O afetado IV-13 apresenta encanecimento precoce, mecha branca frontal, sinófre, base nasal alta, telecanto, íris azuis hipoplásicas e surdez profunda neurossensorial bilateral. Alguns dos sinais descritos podem ser observados na Fig. 16. Os afetados da família (III-5, IV-2, IV-13, IV-14, V-1, V-2, V-3, V-6, e V-8) foram estudados clínica e molecularmente, todos classificados com a síndrome de Waardenburg tipo 1. Foi detectada uma deleção de 13 bases (c.727-739del) no exon 5 do gene *PAX3*. Essa deleção foi publicada em Pardono et al.(2006), no entanto, ficou claro no nosso estudo realizado em dois dos afetados que a localização da mutação esta descrita com imprecisão no artigo.

Figura 15: Heredograma da família do propósito (VI-8) da família F-26.

Figura 16: Fotografia da região frontal do indivíduo IV-13 notando-se a presença de mecha branca e íris azuis.

Figura 17: Resultado da comparação das sequências do exon 5 do gene *PAX3* indicando a deleção c.727-739del em heterozigose no programa *CodonCode Aligner*.

RG F-35

O caso é familiar. O heredograma é apresentado na Figura 18. A propósito apresenta sinófre, telecanto, íris azuis hipoplásicas, base nasal larga e deficiência auditiva neurossensorial bilateral (Figura 19). O diagnóstico clínico foi SW de tipo 1. O estudo molecular mostrou uma mutação no exon 8 do gene *PAX3* c.1195C>G na propósito e em seu pai (Fig. 20). Esta nsSNV não foi descrita, sendo considerada como uma mutação nova. Na análise de previsão, foi apontada como danosa (*Polyphen2* e *SIFT*), patogênica (*MutationTaster*) e o índice CADD (18.68) também a indica com um alto potencial de patogenicidade.

Figura 18: Heredograma da família F-35.

Figura 19: Fotografia da propósita notando-se a presença do telecanto.

Figura 20: Resultado do sequenciamento do paciente F-35 indicando a mutação c.1195C>G em heterozigose no gene *PAX3* no programa *ChromasLite*.

RG F-40

O heredograma é apresentado na Figura 21. O propósito (III-1) (Fig. 22) apresenta as seguintes características: íris azuis hipocromáticas, sinófre, telecanto e hipoplasia das asas nasais. Trata-se clinicamente de um caso de SW1. Foram detectados dois tipos de mutações no propósito. A primeira é a mutação c.35delG no gene da Conexina 26 (*GJB2*). Essa mutação é triada rotineiramente no Laboratório de Genética Humana (IB-USP), porque é frequentemente associada a distúrbio de audição. No paciente F-40 está presente na forma homozigota. A mãe do paciente apresenta a mutação c.35delG na forma homozigota e é surda, o pai a apresenta na forma heterozigota (portador) e é surdo. O segundo tipo de mutação é a c. 124G>C no exon 2 do gene *PAX3* (Fig. 23). Esta mutação não foi descrita antes, e a análise de previsão apontou a mutação como danosa (*Polyphen2* e *SIFT*), deletéria (*LRT*) e patogênica (*MutationTaster*). A análise realizada pelos programas *PhCons* e *PhyloP* indicou ser um aminoácido conservado. O pai do paciente apresenta a mesma mutação e sinais clínicos da SW. Portanto, a deficiência auditiva do propósito pode decorrer tanto da mutação c.35delG em homozigose no gene *GJB2* como da mutação da c. 124G>C no gene *PAX3*. Já a surdez do pai é provavelmente devida à mutação do gene *PAX3*.

Figura 21: Heredograma da família do propósito (III-1).

Figura 22: Fotografia da região frontal do paciente notando-se a presença de telecanto pronunciado, íris azuis e hipoplasia das asas nasais.

Figura 23: Resultado do sequenciamento do paciente F-40 indicando a mutação c. 124G>C em heterozigose no programa Chromas.

RG F-45

O caso é isolado na família. O heredograma é apresentado na Figura 24. A propósito (IV-2) apresenta heterocromia das íris, hipoplasia de estroma de íris, telecanto e deficiência auditiva (Fig. 25). Foi diagnosticada como SW1. A propósito é portadora da mutação c.944C>A (Fig. 26), já associada à SW1 [Tassabehj *et al.*, 1994]. Foi colhido o material de seus pais a fim de descobrir se um deles é portador. A mãe da criança também possui a mesma mutação, mas sem nenhum sinal da síndrome. No entanto, a pesquisa de sua frequência revelou que esta mutação está presente em 2% na população em geral, segundo os bancos de dados 1000 genomas, ESP6500 e dbSNP137, o que nos faz duvidar da sua patogenicidade. A análise de previsão apontou a mutação como danosa (*Polyphen2* e *SIFT*), deletéria (*LRT*) e patogênica (*MutationTaster*). A mutação consta no banco de dado do LOV-WS (*Leiden Open variation database-Waardenburg*

syndrome (<http://grenada.lumc.nl/LOVD2/WS/>) e na HGMD (*Human gene mutation database* (<http://www.hgmd.cf.ac.uk/>)). O estudo molecular dos genes *MITF*, *SOX10*, *SNAI2*, *EDN3* e *EDNRB* não revelou nenhuma mutação que pudesse explicar o caso.

Figura 24: Heredograma da família da propósita F-45. As pessoas indicadas com ? são portadoras da mutação mas não apresentam características clínicas

Figura 25: Fotografia da propósita F-45 notando-se a heterocromia de íris.

Figura 26: Resultado do sequenciamento do paciente F-45 indicando a mutação c.944C>A em heterozigose no programa *Chromas*.

RG F-46

O caso é isolado na família. A propósita apresenta surdez bilateral, íris heterocrômicas, telecanto, encanecimento precoce, epicanto e sínófre (Fig.27). Os sinais clínicos permitem concluir que trata-se de um caso de SW1. Foi detectada uma mutação no exon 5 do gene *PAX3* c.790C>T (Fig 28). Esta mutação não foi descrita antes, e acarreta em um códon de parada prematuro. Não foram obtidas amostras de DNA de outros familiares.

Figura 27: Fotografia da propósita notando-se a presença do telecanto.

Figura 28: Resultado do sequenciamento do paciente F-46 indicando a mutação c.790C>T em heterozigose no programa *Chromas*.

RG F-48

O caso é isolado na família. O heredograma é apresentado na Figura (Fig 29). O propósito é portador de hipoacusia neurosensorial profunda bilateral, íris hipocrômicas, sinófre, telecanto e hipoplasia das asas nasais (Fig. 30). Também apresenta uma mancha café com leite na região cervical e outra no hipocôndrio esquerdo. Apresentou, ao nascimento, mecha frontal branca. Os sinais físicos indicaram o diagnóstico clínico de SW1. Foi detectada uma mutação em heterozigose no exon 2 do gene *PAX3* (c.142G>C). Foi testado o DNA da mãe, que não apresentou esta variação, e não foi possível obter o DNA paterno. Esta mutação já havia sido descrita [DeStefano *et al.*, 1998]. O estudo da previsão apontou a mutação como danosa (*Polyphen2* e *SIFT*), deletéria (*LRT*) e patogênica (*MutationTaster*). A análise pelos programas *PhCons* e *PhyloP* indicou ser um aminoácido conservado.

Figura 29: Heredograma da família do propósito F-48.

Figura 30: Fotografia do propósito notando-se a presença do telecanto e íris hipocrômicas.

4.4 Descrição dos pacientes com mutações no gene *MITF*

RG F-25

O caso é isolado. O heredograma é apresentado na Figura 31. O paciente (IV-1) apresenta implantação baixa de cabelos, sinófre, medidas oculares normais, índice $W = 1,70$, base nasal alargada, epicanto, íris azuis hipoplásicas, heterocromia parcial (Fig. 32), surdez neurossensorial profunda bilateral, lábio superior em forma de arco de cupido, palato ogival e mancha hipopigmentada no braço direito. Apresenta deficiência mental e não aprendeu a ler e nem a escrever. O diagnóstico foi de SW tipo 2. Foi detectada a mutação no exon 3 do gene *MITF* c.328C>T (Fig.33). Esta mutação não foi descrita antes e resulta em um códon de parada prematuro. O pai do propósito (III-3) também apresenta a mesma mutação e é também surdo.

Figura 31: Heredograma da família F-25. Os símbolos parcialmente preenchidos indicam indivíduos com surdez, mas que não foram clinicamente estudados

Figura 32: Fotografia do propósito F-25 notando-se heterocromia parcial.

Figura 33: Resultado do sequenciamento do paciente F-25 indicando a mutação c.328C>T em heterozigose no programa *Chromas*.

RG F-33

O caso é isolado na família. O heredograma é apresentado na Figura 34. A propó-sita (II-1) apresenta sinófre discreta, várias efélides (face), medidas oculares aumentadas (porém dentro dos limites normais), íris hipoplásicas e surdez profunda neurosensorial bilateral sem dar impressão de telecanto ou hipertelorismo. Também apresenta uma mancha café com leite (cerca de 6cm de diâmetro maior). O índice W tem um valor de 2,11 que indica telecanto. Tratar-se-ia de um caso de SW1, mas o estudo molecular do gene *MITF* mostrou uma mutação no exon 8 c.1067C>T (Fig.35). Esta mutação ainda não foi descrita e existem dúvidas se ela é patogênica, pois os programas de previsão indicam a mutação como tolerável e benigna (*Polyphen2* e *SIFT*), neutra (*LRT*) e polimórfica (*MutationTaster*).

Figura 34: Heredograma da família F-33.

RG F-14

Figura 36: Heredograma da familia F-14.

RG F-28

O caso é familiar. O heredograma é apresentado na Figura 38. A propósita (II-3) sem telecanto (índice W = 1,26), apresenta sinófre, íris azuis hipocrômicas, surdez profunda

bilateral, lábio superior em forma de arco de cupido, encanecimento precoce, palato alto e ogival, anosmia e mancha de vitiligo no abdômen.

Sua irmã gêmea (II-4), também sem telecaneto (índice $W = 1,80$), apresenta íris azuis hipocrômicas, surdez profunda bilateral, sinófre, palato alto e ogival. Nenhum outro membro da família apresenta íris azuis ou surdez. O índice W médio das afetadas é 1,53, o que indica com segurança o diagnóstico de SW2. Foi detectada uma deleção de uma base no exon 2 do gene *SOX10* (c.430delC) nas duas irmãs. Esta mutação não foi descrita antes e acarreta uma mudança na matriz de leitura. Foi realizado o estudo no DNA dos pais e nenhum deles apresentava a mutação, porém como são possivelmente irmãs gêmeas dizigóticas, esta deveria ser provavelmente uma mutação herdada. Faz-se necessário um estudo mais detalhado da família, mas por enquanto não foi possível obter mais amostras para estudos de zigosidade.

Figura 38: Heredograma da família F-28.

Figura 39: A propósita (II-3) irmã gêmea (II-4) ambas com olhos azuis hipocrômicos.

RG F-31

O caso é isolado na família. O heredograma é apresentado na Figura 40. O propósito apresenta medidas oculares normais (índice $W = 1,57$), íris azuis hipoplásicas (Fig. 41) e surdez profunda bilateral. As medidas dos indivíduos dessa família (afetado e genitores) são normais. O estudo molecular mostrou uma mutação no exon 1 do gene *SOX10* c.403A>C, não descrita anteriormente. Esta mutação não-sinônima é indicada pelos 4 programas de previsão como danosa (*Polyphen2* e *SIFT*), deletéria (*LRT*) e patogênica

Figura 40: Heredograma da família F-31.

Figura 41: Fotografia do propósito notando-se os olhos azuis hipoplásicos.

(*MutationTaster*). A análise nos programas *PhCons* e *PhyloP* indicou ser um aminoácido conservado. O estudo molecular dos pais mostrou que eles não apresentam a mutação.

4.6 Descrição do pacientes com mutação no gene *EDNRB*

RG F-27

O caso é isolado na família. O heredograma é apresentado na Figura 42. O propósito apresenta deficiência auditiva unilateral, mecha branca frontal. Não apresenta telecanto (índice $W = 1,82$). Foi detectada uma mutação no exon 4 do gene *EDNRB* c.914G>A (Figura 43). Não foi colhido o DNA dos pais e, portanto, não se sabe se foi herdada. Esta mutação já foi descrita [Auricchio *et al.*, 1996]. No entanto, a pesquisa da sua frequência revelou que 1% da população em geral apresenta esta mutação, segundo os bancos de dados 1000 genomas, ESP6500 e dbSNP137. Isso indica que provavelmente não é patogênica e que foi erroneamente interpretada em estudos anteriores. O estudo de previsão apontou a mutação como tolerável e benigna (*Polyphen2* e *SIFT*), deletéria (*LRT*) e polimórfica (*MutationTaster*). A análise pelos programas *PhCons* e *PhyloP* indicou ser um aminoácido conservado.

Figura 42: Heredograma da família F-27.

Figura 43: Resultado do sequenciamento do paciente F-27 indicando a mutação c.914G>A em heterozigose no programa *Chromas*.

4.7 Descrição dos pacientes com variações do número de cópias

4.7.1 Descrição dos pacientes com deleção no gene *PAX3*

RG F-1

O caso é isolado na família. O heredograma é apresentado na Figura 44. O propósito apresenta surdez congênita bilateral, heterocromia total, telecanto evidente, hiperplasia da raiz do nariz, mecha branca na região frontal e sínófre. Foi diagnosticado como SW1. O estudo molecular de CNV mostrou uma deleção total do gene *PAX3* (Fig. 45). Foi realizado o MLPA em amostras de outros membros da família como o pai, mãe e irmã gêmea e todos revelaram resultados normais.

Figura 44: Heredograma da família F-1.

P186_6192.fsa -- Dye: Blue

Figura 45: Resultado do estudo de CNVs do paciente F-1 observando-se, em vermelho, a deleção total do gene *PAX3*, de acordo com o *GeneMarker*.

RG F-5

O caso é isolado na família. O heredograma é apresentado na Figura 46. A propósito apresenta surdez neurossensorial bilateral profunda, mecha branca frontal, íris azuis hipocrômicas, telecanto e hipoplasia das asas nasais. O estudo molecular de CNV mostrou uma deleção parcial dos exons 6, 7 e 8 do gene *PAX3* (Figura 47). Os progenitores não mostraram nenhuma alteração após a análise de MLPA.

Figura 46: Heredograma da família F-5.

P186_11105.fsa -- Dye: Blue

Figura 47: Resultado do estudo de CNVs do paciente F-5 observando-se, em vermelho, a deleção parcial do gene *PAX3*, de acordo com o programa *GeneMarker*.

RG F-6

O caso é isolado na família. O heredograma é apresentado na Figura 48. A propó-sita apresenta telecanto, sinófre, aumento de todas as medidas oculares (com exceção da distância bipupilar), distopia lacrimal inferior, agenesia de conduto lacrimal, base nasal alta e larga, hipoplasia das asas nasais e narinas pequenas, palato alto e ogival e lábio superior em forma de arco de cupido. Seus genitores não apresentam dismorfias faciais ou pigmentares. O MLPA mostrou uma deleção total do gene *PAX3* e esta deleção está presente somente na propósita. Os pais não apresentaram nenhuma variação de número de cópias após a análise do MLPA.

Figura 48: Heredograma da família F-6.

RG F-11

O Caso é familiar. O heredograma é apresentado na Figura 49. A propósita apresenta surdez congênita associada, mecha branca frontal de nascença (que desapareceu depois), íris azuis hipocrômicas, sinófre, telecanto, base nasal alta, hipoplasia das asas nasais, narinas pequenas, palato alto e mancha hipocrômica de contorno irregular em todos os lados do antebraço direito. Foi sugerido inicialmente que se trata clinicamente de um caso de SW1 (índice $W = 2,07$). O MLPA mostrou uma deleção total do gene *PAX3*. A irmã (IV-2), também afetada, mostrou a mesma deleção total do gene (Fig.50).

Figura 49: Heredograma da família F-11.

P186_13458.fsa -- Dye: Blue

Figura 50: Resultado do estudo de CNVs do paciente F-11 observando-se, em vermelho, a deleção total do gene *PAX3* de acordo com o programa *GeneMarker*.

4.7.2 Descrição dos pacientes com deleção no gene *SOX10*

RG F-36

O caso é isolado na família de SW tipo 2. O heredograma é apresentado na Figura 51. Sugeriu-se ser um caso de SW2. A propósito apresenta sinófre, surdez profunda bilateral, hipoplasia das asas nasais e íris azuis hipoplásicas hipocrômicas (Fig. 52). O estudo de CNV mostrou uma deleção total do gene *SOX10* (Fig. 53), que não foi herdada dos progenitores.

Figura 51: Heredograma da família F-36.

Figura 52: Fotografia da propósita F-36, notando-se íris azuis hipoplásicas.

P186_17750.fsa -- Dye: Blue

	Probe Name	Bin Size	P186_17750		Probe Name	Bin Size	P186_17750
1	Ctrl_04q31	241.0	2	21	MITF_ex14	326.3	2
2	Ctrl_05q31	126.7	2	22	MITF_ex15	420.7	2
3	Ctrl_06q15	270.0	2	23	PAX3_ex01	303.7	2
4	Ctrl_06q22	171.7	2	24	PAX3_ex03A	165.8	2
5	Ctrl_07q22	470.8	2	25	PAX3_ex03B	276.5	2
6	Ctrl_08q22	318.2	2	26	PAX3_ex04A	355.2	2
7	Ctrl_09q21	373.8	2	27	PAX3_ex04B	202.0	2
8	Ctrl_12q23	157.6	2	28	PAX3_ex05A	183.6	2
9	Ctrl_15q21	189.3	2	29	PAX3_ex05B	235.3	2
10	Ctrl_16p13	429.9	2	30	PAX3_ex06A	382.4	2
11	MITF_ex01A	142.0	2	31	PAX3_ex06B	410.9	2
12	MITF_ex01B	195.5	2	32	PAX3_ex07A	401.6	2
13	MITF_ex05A	248.6	2	33	PAX3_ex07B	282.8	2
14	MITF_ex05B	458.4	2	34	PAX3_ex08A	364.5	2
15	MITF_ex07	336.2	2	35	PAX3_ex08B	264.0	2
16	MITF_ex09	390.1	2	36	PAX3_ex09	177.9	2
17	MITF_ex10	296.2	2	37	SOX10_ex01	441.4	1
18	MITF_ex11	346.0	2	38	SOX10_ex02	310.0	1
19	MITF_ex12	211.8	2	39	SOX10_ex03	133.4	1
20	MITF_ex13	289.6	2	40	SOX10_ex04A	257.2	1
				41	SOX10_ex04B	226.6	1

Figura 53: Resultado do estudo de CNVs do paciente F-36 observando-se, em vermelho, a deleção total do gene *SOX10* de acordo com o programa *GeneMarker*.

4.7.3 Descrição dos pacientes com deleção no gene *MITF*

RG F-42

O caso é isolado na família. O heredograma é apresentado na Figura 54. Trata-se de um caso isolado de SW2, assim classificado pela ausência de telecanto. O propósito apresenta íris azuis hipocrômicas, surdez profunda bilateral, lábio em forma de cupido e epicanto. Nenhum outro membro da família apresenta características semelhantes (Fig. 54). No estudo de CNV foi detectada uma deleção no exon 12 do gene *MITF* (Fig. 55). Não se conseguiu obter o DNA dos pais para verificar se apresentam a mesma deleção.

Figura 54: Heredograma da família F-42.

18856.fsa -- Dye: Blue

	Probe Name	Bin Size	18856		Probe Name	Bin Size	18856
1	Ctrl_04q31	241.0	2	21	MITF_ex14	326.3	2
2	Ctrl_05q31	126.7	2	22	MITF_ex15	420.7	2
3	Ctrl_06q15	270.0	2	23	PAX3_ex01	303.7	2
4	Ctrl_06q22	171.7	2	24	PAX3_ex03A	165.8	2
5	Ctrl_07q22	470.8	2	25	PAX3_ex03B	276.5	2
6	Ctrl_08q22	318.2	2	26	PAX3_ex04A	355.2	2
7	Ctrl_09q21	373.8	2	27	PAX3_ex04B	202.0	2
8	Ctrl_12q23	157.6	2	28	PAX3_ex05A	183.6	2
9	Ctrl_15q21	189.3	2	29	PAX3_ex05B	235.3	2
10	Ctrl_16p13	429.9	2	30	PAX3_ex06A	382.4	2
11	MITF_ex01A	142.0	2	31	PAX3_ex06B	410.9	2
12	MITF_ex01B	195.5	2	32	PAX3_ex07A	401.6	2
13	MITF_ex05A	248.6	2	33	PAX3_ex07B	282.8	2
14	MITF_ex05B	458.4	2	34	PAX3_ex08A	364.5	2
15	MITF_ex07	336.2	2	35	PAX3_ex08B	264.0	2
16	MITF_ex09	390.1	2	36	PAX3_ex09	177.9	2
17	MITF_ex10	296.2	2	37	SOX10_ex01	441.4	2
18	MITF_ex11	346.0	2	38	SOX10_ex02	310.0	2
19	MITF_ex12	211.8	1	39	SOX10_ex03	133.4	2
20	MITF_ex13	289.6	2	40	SOX10_ex04A	257.2	2
				41	SOX10_ex04B	226.6	2

Figura 55: Resultado do estudo de CNVs do paciente F-42 observando-se, em vermelho, a deleção do exon 12 do gene *MITF* de acordo com o programa *GeneMarker*.

4.8 Previsão de patogenicidade das mutações exônicas já descritas no banco de dados da síndrome de Waardenburg - LOVD

No presente estudo foi encontrada uma mutação no paciente F- 45, no gene *PAX3*, c. 944C>A. Após a análise de banco de dados 1000 genomas e ESP, observou-se que a frequência dessa mutação na população normal esta ao redor de 2%, levando a suspeitar que esta mutação não poderia ser a causa da SW. Esta mutação está descrita na base de dados atualizada da LOVD da síndrome, mas esta base de dados não mostra a frequência da variação nem a probabilidade da patogenicidade. Isso motivou a iniciativa de analisar todas as mutações exônicas já descritas nesse banco de dados afim de descobrir se há mais mutações com frequência de 1% ou mais na população, ou com fraca base de apoio para sua patogenicidade. Assim, estudou-se a conservação das sequências e foi feita uma análise de patogenicidade.

Para o gene *PAX3* foram encontradas 75 mutações exônicas na base de dados LOVD, das quais 42 são mutações não sinônimas, 18 levam à mudança de matriz de leitura e 15 são mutações de códon de parada prematuro. Como as mutações de códon de parada e mudança de matriz de leitura são geralmente patogênicas, se realizou a análise somente das 42 nsSNVs.

Dentre as 42 SNVs estudadas (Tabela 17), a mutação c.944C>A foi a única descrita pelo ESP (*Exome Study Projet*) com uma frequência de 2,7% e a mesma mutação foi descrita no banco de dados 1000 Genomas com uma frequência igual a 2% (3% na população nativa americana e 4% em populações europeias).

O estudo da patogenicidade das 42 mutações não sinônimas nos vários programas de predição da patogenicidade utilizados sugerem que:

- 40/42 são deletérias e 2/42 são neutras, segundo o LRT;
- 40/42 são patogênicas e 2/42 são polimórficas, segundo o *MutationTaster*;
- 39/42 são danosas e 3/42 como benignas, segundo o *PolyPhen2*;
- 39/42 são danosas e 3/42 como toleráveis, segundo o SIFT;
- 42/42 são conservadas nos primatas, 39/42 conservadas em mamíferos e 41/42 nos vertebrados, segundo o *PhastCons*;
- 27/42 são conservadas e 15/42 não são conservadas, segundo o *PhyloP*.

O valor *C score* das variações sugere que 16/42 variações tem alto potencial para serem patogênicas, pois o valor esta entre 5 e 25. Concluindo, com base nessas análises computacionais, acredita-se que a mutação c.944C>A não seja patogênica devido a sua frequência elevada. Sugere-se que as mutações c.586G>A e c.1121>T provavelmente não sejam patogênicas já que ambas mutações foram indicadas pelos 4 programas de predição como benignas ou toleráveis, mas nenhuma das duas foi descrita no banco de dados de 1000 genomas e ESP. Em resumo, colocamos em dúvida a patogenicidade de três das 42 nsSNVs estudadas.

Para o gene *MITF* (Tabela 18) foram encontradas 27 mutações exônicas descritas no LOVD, das quais 17 são mutações não sinônimas, 6 levam à mudança de matriz de leitura e 4 são mutações de códon de parada prematuro.

Dentre as 17 nsSNVs, duas mutações (C.332C>T e c.892T>C) foram descritas pelo ESP e 1000 Genomas respectivamente, mas ocorreram em menos de quatro pessoas no projeto 1000 genomas e exomas. Para essas nsSNVs, os programas de predição sugerem que:

- 17/17 são deletérias, segundo o LRT;
- 16/17 são patogênicas, e 1/17 é polimórfica segundo o *MutationTaster*;
- 12/17 são possivelmente danosas, 3/17 são benignas e para 2/17 o resultado da análise não estava disponível, segundo o *PolyPhen2*;
- 12/17 são danosas, 3/17 são toleráveis e para 2/17 o resultado da análise não estava disponível segundo o SIFT;
- 17/17 são conservadas nos primatas, nos mamíferos e vertebrados, segundo o *PhastCons*;
- 16/17 são conservadas e 1/17 não é conservada, segundo o *PhyloP*.

O valor *C score* das variações sugere que 7/17 variações têm alto potencial para serem patogênicas pois seu valor está entre 5 e 25. Desse estudo computacional sugere-se que as mutações c.892T>C, c.483A>T e c.332C>T possivelmente não são patogênicas devido ao fato que 2 programas dos 4 programas de predição de patogenicidade (*PolyPhen2* e SIFT) as indicaram como benignas e toleráveis. Dentre as 17, consideramos 14 apresentando forte evidência de patogenicidade.

Para o gene *SOX10* (Tabela 19) foram encontradas 46 mutações exônicas descritas, das quais 15 são mutações não sinônimas, 16 levam à mudança de matriz de leitura, 12 são mutações de códon de parada prematuro e 3 levam a perda do códon de parada.

Dentre as 15 snSNVs estudadas, unicamente uma mutação (c.274G>C) foi descrita com uma frequência de 0,000231 pelas bases de dados dos 6500exomas (6500ESP) e está presente em menos de quatro pessoas nesse banco. Essa ocorrência pode ser decorrente de um problema de qualidade e cobertura do sequenciamento) mas julgamos mais razoável considerar incerta a patogenicidade. Para estas mutações, os programas de predição sugerem:

- 14/15 são deletérias e 1/15 é neutra, segundo o LRT;
- 14/15 são patogênicas e 1/15 é polimórfica, segundo o *MutationTaster*;
- 14/15 são possivelmente danosas e 1/15 é benigna, segundo o *PolyPhen2*;
- 14/15 são danosas e 1/15 é tolerável, segundo o SIFT;
- 14/15 são conservadas em primatas, 15/15 em mamíferos e 15/15 em vertebrados, segundo o *PhastCons*;

- 15/15 são conservadas, segundo o *PhyloP*.

O valor *C score* dessas variações sugere que 8/15 são potencialmente patogênicas. Sugere-se que a mutação c.961G>C não seja patogênica devido a análise de previsão de patogenicidade, pois esta mutação foi indicada como benigna pelos quatro programas de previsão. Em resumo, das 15 nsSNVs, há suporte para patogenicidade de 13 delas.

Para o gene *EDNRB* (Tabela 20) foram encontradas 29 mutações exônicas descritas, das quais 22 são mutações não sinônimas, três levam a mudança de matriz de leitura e quatro são mutações de códon de parada prematuro.

Dentre as 22 nsSNVs, nove mutações já foram descritas no banco de dados 1000 Genomas ou no ESP6500, das quais sete possuem uma frequência elevada na população:

- c.13C>A descrita nos dois bancos (1000 genomas e 6500ESP)
- c.49C>T descrita nos dois bancos (1000 genomas e 6500ESP), com uma frequência de 1% no 1000 genomas;
- c.169G>A descrita nos dois bancos (1000 genomas e 6500ESP);
- c.227G>T descrita nos dois bancos (1000 genomas e 6500ESP);
- c.731C>T descrita nos dois bancos (1000 genomas e 6500ESP);
- c.778G>T descrita no ESP6500, encontrada em 18 pessoas ;
- c.914G>A descrita nos dois bancos (1000 genomas e 6500ESP) e com uma frequência de 1% no projeto 1000 genomas.

Para as 22 nsSNVs, os programas de predição sugerem:

- 14/22 são deletérias e 8/22 neutras segundo o LRT;
- 15/22 são patogênicas e 7/22 são polimórficas, segundo o *MutationTaster*;
- 10/22 são danosas, 3/22 são possivelmente danosas e 9/22 são benignas, segundo o *PolyPhen2*;
- 15/22 são danosas e 7/22 são toleráveis, segundo o SIFT;
- 13/22 são conservadas nos primatas, 15/22 em mamíferos e 14/22 nos vertebrados, segundo o *PhastCons*;
- 14/22 são conservadas e 8/22 não são conservadas, segundo o *PhyloP*.

O valor *C score* das variações sugere que 16/22 delas tem elevado potencial patogênico. Concluímos que as mutações c.13C>A, c.49C>T, c.169G>A, c.227G>T, c.731C>T, c.778G>T e c.914G>A não são patogênicas pois apresentam uma frequência elevada comparada a incidência da SW. Também se sugere que as seguintes mutações provavelmente não sejam patogênicas:

- c.20T>C, os 4 programas sugerem que é benigna;
- c.178G>A, os 4 programas sugerem que é benigna;

Em resumo, colocamos em dúvida a patogenicidade de 9 das 22 mutações tipo nsSNVs descritas no LOVD no gene *EDNRB*.

Para o gene *EDN3* (Tabela 21) foram encontradas 13 mutações exônicas descritas, das quais 9 são mutações não sinônimas, 2 levam a mudança de matriz de leitura e 2 são mutações de códon de parada prematuro.

Dentre as 9 nsSNVs, a mutação c.49G>A já foi descrita pelo ESP e pelo banco de dados 1000 Genomas; apresenta uma frequência de 1% no projeto 1000 genomas. A mutação c.628G>A foi descrita em ambos projetos e 18 pessoas apresentaram esta variação no ESP6500. Para essas mutações, os programas de predição sugerem:

- 8/9 são deletérias e 1/9 é neutra, segundo o LRT;
- 6/9 são patogênicas e 3/9 são polimórficas, segundo o *MutationTaster*;
- 8/9 são danosas e 1/9 é benigna, segundo o *PolyPhen2*;
- 8/9 são danosas e 1/9 é tolerável, segundo o SIFT;
- 7/9 são conservadas nos primatas, 7/9 em mamíferos e 1/9 em vertebrados, segundo o *PhastCons*;
- 9/9 são conservadas segundo o *PhyloP*.

O valor *C score* das variações sugere que 7/9 das variações tem elevado potencial patogênico. As mutações c.49G>A e a c.628G>A não devem ser patogênicas, de acordo com os resultados de análise de predição da patogenicidade em vários dos quatro programas computacionais e apresentam uma frequência maior à esperada para a SW.

Em resumo, no estudo dos genes *PAX3*, *MITF*, *SOX10*, *EDN3* e *EDNRB*, foram analisadas 105 nsSNVs, das quais se coloca em dúvida a patogenicidade de 19 nsSNVs (18,1%) (Tabela 22) contidas no banco de dados LOVD da SW. Dessas 19, 10 (9,5%) possuem uma alta frequência nas bases de dados do projeto 1000 genomas e 6500 exomas, o que descarta sua patogenicidade. As outras 9 variações foram definidas como benignas, toleráveis ou neutras em dois ou mais programas de previsão de patogenicidade, afetando aminoácidos não conservados e abrindo a possibilidade de que não sejam a causa da síndrome. Sugere-se que estas mutações com frequências maiores que as esperadas, definidas como responsáveis pela síndrome nos bancos de dados LOVD e HGVS *Human Genome Variation Society*, devam ser removidas desses bancos para não prover informações errôneas.

Em um estudo da patogenicidade de mutações em 114 genes associados a doenças genéticas dominantes, foram encontradas 239 variantes catalogadas como patogênicas no banco de dados HGMD *Human Gene Mutation Database* [Dorschner *et al.*, 2013]. Esse estudo mostrou que aproximadamente 30,1% destas variantes (72 variantes) indicadas como altamente e possivelmente patogênicas possuem uma frequência acima da frequência

específica da doença, quando pesquisadas no banco de dados do projeto de 6500 exomas (ESP6500). Este estudo fortalece a importância de analisar as variantes sob um rigoroso critério para que sejam classificadas como patogênicas.

O corte utilizado nesse estudo para descartar a patogenicidade foi encontrar mais de 4 pessoas com a variante nos projetos 6500 e 1000 genomas, devido ao fato de que podem existir problemas de qualidade e cobertura no sequenciamento que expliquem sua ocorrência em um ou poucos indivíduos. A frequência da SW é 1/40,000 na população e por ser uma doença dominante com penetrância incompleta (porém muito alta) e possuir 6 genes responsáveis (além da possibilidade das mutações serem encontradas em qualquer nucleotídeo), espera-se, portanto, uma frequência baixíssima na população (0,0000083 aproximadamente) para cada variação possivelmente patogênica, esperando-se assim frequências muito menores do que 1% nos projetos 6500 exomas e 1000 genomas.

Quanto ao estudo baseado no índice de CADD, observou-se que somente 54 nsSNVs (51%) tem alto potencial para serem consideradas como patogênicas, pois esse índice considera muitos mais dados e sua análise foi a mais rigorosa sobre o efeito da previsão da patogenicidade. O CADD foi desenvolvido para auxiliar os estudos de GWAS e exomas para descobrir novos genes e variantes patogênicas e associá-las a fenótipos em grande quantidade de probandos. O objetivo da ferramenta é filtrar as variantes mais interessantes dentre um número enorme de resultados obtidos. Neste estudo realizou-se a verificação do *C-score* a partir de variantes já declaradas patogênicas e em genes já conhecidos, obtendo assim uma classificação das variantes como patogênicas encontradas em apenas 51% dos casos. Isso indica que o CADD é rigoroso demais para o propósito desse estudo.

Tabela 17: Previsão do efeito das mutações descritas no banco de dados LOVD no gene *PAX3* e a frequência dessas mutações encontradas nos bancos de dados 1000 genomas, dbSNP135 e ESP6500 (ND: Não descrita). TG_AF: Média da frequência para alelos alternativos na posição; TG_ASN: Média da frequência na população asiática (1.000 Genomas); TG_AMR: Média da frequência na população Sul-americana (1.000 Genomas); TG_AFR: Média da frequência na população Africana (1.000 Genomas); TG_EUR: Média da frequência na população Europeia (1000 genomas). Programas para previsão da patogenicidade: LRT (D: deletéria; N: neutra; NA: não analisado), MutationTaster (P: patogênica; PP: polimórfica), Polyphen2 (D: danosa; P: provavelmente danosa; B: benigna) e SIFT (D: danosa; T: tolerável; NA: não analisado). Programas para estudo de conservação: PhastCons e PhyloP (C: conservado; N: não conservado; priPhCons: pontuação da conservação em primatas; mamPhCons: pontuação da conservação em mamíferos; verPhCons: pontuação da conservação em vertebrados); *C score*: índice calculado (5-25); os dados destacados em vermelho não falam a favor da patogenicidade das SNVs.

Função	Gene	LOVD mut	Efeito no AA	Efeito	Tipo	ESP6500	1000g2012	dbSNP135	TG_AF	TG_ASN	TG_AMR	TG_AFR	TG_EUR	LRT	MutationTaster	SIFT	PolyPhen2	priPhCons	mamPhCons	verPhCons	PhyloP	C score
exônica	PAX3	c.115A>T	p.N39Y	não sinônima	SNV	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	D	P	D	D	0.975	1	1	C	25.5
exônica	PAX3	c.133T>C	p.F45L	não sinônima	SNV	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	D	P	D	B	0.94	0.748	0.998	C	23.6
exônica	PAX3	c.139A>C	p.N47H	não sinônima	SNV	ND	ND	rs104893653	ND	ND	ND	ND	ND	D	P	D	D	0.985	1	1	C	29.7
exônica	PAX3	c.141C>G	p.N47K	não sinônima	SNV	ND	ND	rs104893652	ND	ND	ND	ND	ND	D	P	D	D	0.989	1	1	C	20.1
exônica	PAX3	c.142G>C	p.G48R	não sinônima	SNV	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	D	P	D	D	0.989	1	1	C	33
exônica	PAX3	c.143G>A	p.G48D	não sinônima	SNV	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	D	P	D	D	0.988	1	1	C	34
exônica	PAX3	c.149C>T	p.P50L	não sinônima	SNV	ND	ND	rs104893650	ND	ND	ND	ND	ND	D	P	D	D	0.997	1	1	N	35
exônica	PAX3	c.167G>A	p.R56H	não sinônima	SNV	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	D	P	D	D	0.995	1	1	N	36
exônica	PAX3	c.167G>T	p.R56L	não sinônima	SNV	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	D	P	D	D	0.995	1	1	N	36
exônica	PAX3	c.175A>T	p.I59F	não sinônima	SNV	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	D	P	D	D	0.999	1	1	C	34
exônica	PAX3	c.176T>A	p.I59N	não sinônima	SNV	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	D	P	D	D	0.999	1	1	N	29.6
exônica	PAX3	c.178G>A	p.V60M	não sinônima	SNV	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	D	P	D	D	0.999	1	1	C	34
exônica	PAX3	c.184A>G	p.M62V	não sinônima	SNV	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	D	P	D	D	0.999	1	1	C	26.2
exônica	PAX3	c.186G>A	p.M62I	não sinônima	SNV	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	D	P	D	D	0.999	1	1	C	35
exônica	PAX3	c.202C>G	p.R68G	não sinônima	SNV	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	D	P	D	D	0.997	1	1	C	19.2
exônica	PAX3	c.218C>T	p.S73L	não sinônima	SNV	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	D	P	D	D	0.997	0.999	1	N	35
exônica	PAX3	c.232G>A	p.V78M	não sinônima	SNV	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	D	P	D	D	0.996	0.987	1	C	33
exônica	PAX3	c.238C>G	p.H80D	não sinônima	SNV	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	D	P	D	D	0.999	1	1	C	34
exônica	PAX3	c.241G>C	p.G81R	não sinônima	SNV	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	D	P	D	D	0.999	1	1	C	34
exônica	PAX3	c.242G>C	p.G81A	não sinônima	SNV	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	D	P	D	D	0.999	1	1	C	33
exônica	PAX3	c.251C>T	p.S84F	não sinônima	SNV	ND	ND	rs104893651	ND	ND	ND	ND	ND	D	P	D	D	0.997	0.997	1	N	32
exônica	PAX3	c.253A>G	p.K85E	não sinônima	SNV	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	D	P	D	D	0.996	0.994	1	C	33
exônica	PAX3	c.268T>C	p.Y90H	não sinônima	SNV	ND	ND	rs104893654	ND	ND	ND	ND	ND	D	P	D	D	0.986	1	1	C	28.3
exônica	PAX3	c.295G>A	p.G99S	não sinônima	SNV	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	D	P	D	D	0.9	0.218	0.999	C	33
exônica	PAX3	c.296G>A	p.G99D	não sinônima	SNV	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	D	P	D	D	0.932	0.227	0.999	N	28.8
exônica	PAX3	c.586G>A	p.G196S	não sinônima	SNV	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	N	PP	T	B	0.899	1	1	C	16.53
exônica	PAX3	c.668G>A	p.R223Q	não sinônima	SNV	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	D	P	D	D	0.995	0.999	1	N	35
exônica	PAX3	c.701T>C	p.L234P	não sinônima	SNV	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	D	P	D	D	0.932	0.965	1	C	22.6
exônica	PAX3	c.713T>C	p.F238S	não sinônima	SNV	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	D	P	D	D	0.983	0.999	1	N	27.2
exônica	PAX3	c.728A>C	p.Y243S	não sinônima	SNV	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	D	P	D	D	0.987	1	1	N	26
exônica	PAX3	c.788T>G	p.V263G	não sinônima	SNV	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	D	P	D	D	0.855	0.93	0.999	N	23.6
exônica	PAX3	c.793G>T	p.V265F	não sinônima	SNV	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	D	P	D	D	0.995	1	1	C	29.6
exônica	PAX3	c.799T>A	p.F267I	não sinônima	SNV	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	D	P	D	D	0.997	1	1	C	28.2
exônica	PAX3	c.808C>T	p.R270C	não sinônima	SNV	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	D	P	D	D	0.996	1	1	C	20.9
exônica	PAX3	c.809G>T	p.R270L	não sinônima	SNV	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	D	P	D	P	0.995	1	1	N	31
exônica	PAX3	c.811C>T	p.R271C	não sinônima	SNV	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	D	P	D	D	0.991	1	1	C	20.8
exônica	PAX3	c.811C>G	p.R271G	não sinônima	SNV	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	D	P	D	D	0.991	1	1	C	21.4
exônica	PAX3	c.812G>A	p.R271H	não sinônima	SNV	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	D	P	D	P	0.987	1	1	N	28.5
exônica	PAX3	c.818G>A	p.R273K	não sinônima	SNV	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	D	P	T	P	0.995	1	1	C	19.29
exônica	PAX3	c.944C>A	p.T315K	não sinônima	SNV	0.02783	0.02	rs2234675	0.02	ND	0.03	0.004	0.04	D	P	D	P	0.972	0.983	1	N	21
exônica	PAX3	c.1121C>T	p.S374L	não sinônima	SNV	ND	ND	rs45607236	ND	ND	ND	ND	ND	N	PP	T	B	0.984	0.953	0.602	N	16.19
exônica	PAX3	c.1173G>C	p.Q391H	não sinônima	SNV	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	D	P	D	D	0.999	1	1	C	25.3

Tabela 18: Previsão do efeito das mutações descritas no banco de dados LOVD no gene *MITF* e a frequência dessas mutações encontradas nos bancos de dados 1000 genomas, dbSNP135 e ESP6500 (ND: Não descrita). TG_AF: Média da frequência para alelos alternativos na posição; TG_ASN: Média da frequência na população asiática (1000 genomas); TG_AMR: Média da frequência na população Sul-americana (1000 genomas); TG_AFR: Média da frequência na população Africana (1000 genomas); TG_EUR: Média da frequência na população Europeia (1000 genomas). Programas para previsão da patogenicidade: LRT (D: deletéria; N: neutra; NA: não analisado), MutationTaster (P: patogênica; PP: polimórfica), Polyphen2 (D: danosa; P: provavelmente danosa; B: benigna) e SIFT (D: danosa; T: tolerável; NA: não analisado). Programas para estudo de conservação: PhastCons e PhyloP (C: conservado; N: não conservado; priPhCons: pontuação da conservação em primatas; mamPhCons: pontuação da conservação em mamíferos; verPhCons: pontuação da conservação em vertebrados); *C score*: índice calculado (5-25); os dados destacados em vermelho não falam a favor da patogenicidade das SNVs.

Função	Gene	mutação LOVD	Efeito de AA	Efeito	Tipo	ESP6500	1000g2012	dbSNP135	TG_AF	TG_ASN	TG_AMR	TG_EUR	LRT	MutationTaster	PolyPhen2	SIFT	priPhCons	mamPhCons	verPhCons	PhyloP	C score
exônica	<i>MITF</i>	c.20A>G	p.Y7C	não sinônima	SNV	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	D	P	P	D	0.995	1	1	C	19.13
exônica	<i>MITF</i>	c.332C>T	p.A111V	não sinônima	SNV	ND	0.0005	rs182533927	0.001	0.002	ND	ND	D	PP	B	T	0.852	0.9	0.995	C	16.06
exônica	<i>MITF</i>	c.483A>T	p.Q161H	não sinônima	SNV	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	D	P	B	T	0.941	1	1	C	14.31
exônica	<i>MITF</i>	c.608G>A	p.R203K	não sinônima	SNV	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	D	P	P	D	0.998	1	1	C	36
exônica	<i>MITF</i>	c.616A>C	p.K206Q	não sinônima	SNV	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	D	P	P	D	0.996	1	1	C	27
exônica	<i>MITF</i>	c.630C>G	p.N210K	não sinônima	SNV	ND	ND	rs104893745	ND	ND	ND	ND	D	P	D	D	0.99	0.999	1	C	21.1
exônica	<i>MITF</i>	c.635T>G	p.I212S	não sinônima	SNV	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	D	P	P	D	0.996	1	1	C	26.6
exônica	<i>MITF</i>	c.639A>C	p.E213D	não sinônima	SNV	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	D	P	NA	NA	0.997	1	1	C	33
exônica	<i>MITF</i>	c.647G>A	p.R216K	não sinônima	SNV	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	D	P	P	D	0.997	1	1	N	34
exônica	<i>MITF</i>	c.649A>G	p.R217G	não sinônima	SNV	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	D	P	NA	NA	0.998	1	1	C	19.05
exônica	<i>MITF</i>	c.650G>T	p.R217I	não sinônima	SNV	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	D	P	P	D	0.998	1	1	C	32
exônica	<i>MITF</i>	c.671T>G	p.I224S	não sinônima	SNV	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	D	P	D	D	0.995	1	1	C	24.6
exônica	<i>MITF</i>	c.748T>C	p.S250P	não sinônima	SNV	ND	ND	rs104893744	ND	ND	ND	ND	D	P	P	D	0.922	0.905	1	C	32
exônica	<i>MITF</i>	c.758A>G	p.Y253C	não sinônima	SNV	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	D	P	D	D	0.968	0.999	1	C	27.5
exônica	<i>MITF</i>	c.832A>G	p.N278D	não sinônima	SNV	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	D	P	P	D	0.993	1	1	C	35
exônica	<i>MITF</i>	c.848T>C	p.L283P	não sinônima	SNV	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	D	P	P	D	0.966	1	1	C	27.5
exônica	<i>MITF</i>	c.892T>C	p.S298P	não sinônima	SNV	0.000308	ND	rs104893747	ND	ND	ND	ND	D	P	B	T	0.99	0.998	0.978	C	4.889

Tabela 19: Previsão do efeito dessas mutações descritas no banco de dados LOVD no gene *SOX10* e a frequência das mutações encontradas nos bancos de dados 1000 genomas, dbSNP135 e ESP6500 (ND: Não descrita). TG_AF: Média da frequência para alelos alternativos na posição; TG_ASN: Média da frequência na população asiática (1000 genomas); TG_AMR: Média da frequência na população Sul-americana (1000 genomas); TG_AFR: Média da frequência na população Africana (1000 genomas); TG_EUR: Média da frequência na população Europeia (1000 genomas). Programas para previsão da patogenicidade: LRT (D: deletéria; N: neutra; NA: não analisado), MutationTaster (P: patogênica; PP: polimórfica), Polyphen2 (D: danosa; P: provavelmente danosa; B: benigna) e SIFT (D: danosa; T: tolerável; NA: não analisado). Programas para estudo de conservação: PhastCons e PhyloP (C: conservado; N: não conservado; priPhCons: pontuação da conservação em primatas; mamPhCons: pontuação da conservação em mamíferos; verPhCons: pontuação da conservação em vertebrados); *C score*: índice calculado (5-25); os dados destacados em vermelho não falam a favor da patogenicidade das SNVs.

Função	Gene	Mutação LOVD	Efeito de AA	Efeito	Tipo	ESP6500	1000g2012	dbSNP135	TG_ASN	TG_AMR	TG_AFR	TG_EUR	LRT	MutationTaster	PolyPhen2	SIFT	priPhCons	mamPhCons	verPhCons	PhyloP	C score
exônica	<i>SOX10</i>	c.274G>C	p.V92L	não sinônima	SNV	0.000231	ND	rs142113652	ND	ND	ND	ND	D	P	D	D	0.996	0.999	1	C	29.9
exônica	<i>SOX10</i>	c.316C>T	p.R106W	não sinônima	SNV	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	D	P	D	D	0.996	1	1	C	19.47
exônica	<i>SOX10</i>	c.336G>A	p.M112I	não sinônima	SNV	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	D	P	D	D	0.996	1	1	C	27.4
exônica	<i>SOX10</i>	c.336G>C	p.M112I	não sinônima	SNV	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	D	P	D	D	0.996	1	1	C	28.8
exônica	<i>SOX10</i>	c.391A>C	p.N131H	não sinônima	SNV	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	D	P	D	D	0.992	1	1	C	23.3
exônica	<i>SOX10</i>	c.404G>C	p.S135T	não sinônima	SNV	ND	ND	rs74315515	ND	ND	ND	ND	D	P	D	D	0.996	1	1	C	26
exônica	<i>SOX10</i>	c.434T>C	p.L145P	não sinônima	SNV	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	D	P	D	D	0.796	1	1	C	20.7
exônica	<i>SOX10</i>	c.450G>C	p.K150N	não sinônima	SNV	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	D	P	D	D	0.962	1	1	C	22
exônica	<i>SOX10</i>	c.470C>T	p.A157V	não sinônima	SNV	ND	ND	rs121909117	ND	ND	ND	ND	D	P	D	D	0.984	0.955	0.999	C	33
exônica	<i>SOX10</i>	c.482G>A	p.R161H	não sinônima	SNV	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	D	P	D	D	0.977	1	1	C	34
exônica	<i>SOX10</i>	c.521A>C	p.Q174P	não sinônima	SNV	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	D	P	D	D	0.849	0.989	1	C	21.5
exônica	<i>SOX10</i>	c.523C>G	p.P175A	não sinônima	SNV	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	D	P	D	D	0.823	0.941	1	C	23.5
exônica	<i>SOX10</i>	c.524C>G	p.P175R	não sinônima	SNV	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	D	P	D	D	0.824	0.916	0.999	C	26.1
exônica	<i>SOX10</i>	c.524C>T	p.P175L	não sinônima	SNV	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	D	P	D	D	0.824	0.916	0.999	C	22.6
exônica	<i>SOX10</i>	c.961G>C	p.G321R	não sinônima	SNV	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	N	PP	B	T	0.736	1	1	C	11.86

Tabela 20: Previsão do efeito dessas mutações descritas no banco de dados LOVD no gene *EDNRB* e a frequência das mutações encontradas nos bancos de dados 1000 genomas, dbSNP135 e ESP6500 (ND: Não descrita). TG_AF: Média da frequência para alelos alternativos na posição; TG_ASN: Média da frequência na população asiática (1000 genomas); TG_AMR: Média da frequência na população Sul-americana (1000 genomas); TG_AFR: Média da frequência na população Africana (1000 genomas); TG_EUR: Média da frequência na população Europeia (1000 genomas). Programas para previsão da patogenicidade: LRT (D: deletéria; N: neutra; NA: não analisado), MutationTaster (P: patogênica; PP: polimórfica), Polyphen2 (D: danosa; P: provavelmente danosa; B: benigna) e SIFT (D: danosa; T: tolerável; NA: não analisado). Programas para estudo de conservação: PhastCons e PhyloP (C: conservado; N: não conservado; priPhCons: pontuação da conservação em primatas; mamPhCons: pontuação da conservação em mamíferos; verPhCons: pontuação da conservação em vertebrados); *C score*: índice calculado (5-25); os dados destacados em vermelho não falam a favor da patogenicidade das SNVs.

Função	Gene	Mutação LOVD	Efeito de AA	Efeito	Tipo	ESP6500	1000g2012	dbSNP135	TG_AF	TG_ASN	TG_AMR	TG_AFR	TG_EUR	LRT_Pred	MutationTaster	SIFT	PolyPhen2	priPhCons	mamPhCons	verPhCons	PhyloP	C score
exônica	<i>EDNRB</i>	c.13C>A	p.P5T	não sinônima	SNV	0.000231	0.0005	rs12720160	0.001	ND	0.003	ND	ND	N	PP	D	B	0.258	0.001	0	N	7.58
exônica	<i>EDNRB</i>	c.20T>A	p.L7Q	não sinônima	SNV	ND	ND	rs5345	ND	ND	ND	ND	ND	N	PP	T	B	0.755	0.029	0	N	11.14
exônica	<i>EDNRB</i>	c.49C>T	p.L17F	não sinônima	SNV	0.00592	0.01	rs5346	0.01	ND	ND	0.02	ND	N	PP	T	B	0.43	0.331	0.444	N	10.34
exônica	<i>EDNRB</i>	c.169G>A	p.G57S	não sinônima	SNV	0.006612	0.0046	rs1801710	0.005	ND	0.01	ND	0.01	N	P	T	B	0.147	0	0	N	8.288
exônica	<i>EDNRB</i>	c.178G>A	p.A60T	não sinônima	SNV	0.000154		rs142569954	ND	ND	ND	ND	ND	N	PP	T	B	0.057	0.892	0.564	N	8.574
exônica	<i>EDNRB</i>	c.227G>T	p.R76M	não sinônima	SNV	0.000308	0.0027	rs2228271	0.003	ND	ND	0.01	ND	N	PP	D	B	0.029	0	0	N	15.27
exônica	<i>EDNRB</i>	c.334T>G	p.F112V	não sinônima	SNV	ND	ND	rs5347	ND	ND	ND	ND	ND	D	P	D	D	0.969	0.999	1	C	24.7
exônica	<i>EDNRB</i>	c.509G>A	p.G170E	não sinônima	SNV	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	D	P	D	P	0.901	0.997	1	C	27.8
exônica	<i>EDNRB</i>	c.548C>G	p.A183G	não sinônima	SNV	ND	ND	rs104894388	ND	ND	ND	ND	ND	D	P	D	B	0.992	1	1	C	19.2
exônica	<i>EDNRB</i>	c.553G>A	p.V185M	não sinônima	SNV	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	D	P	D	D	0.981	0.995	1	C	28
exônica	<i>EDNRB</i>	c.556G>A	p.G186R	não sinônima	SNV	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	D	P	D	P	0.982	0.999	1	C	24.2
exônica	<i>EDNRB</i>	c.587G>A	p.S196N	não sinônima	SNV	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	N	P	D	D	0.991	1	1	C	26.1
exônica	<i>EDNRB</i>	c.587G>C	p.S196T	não sinônima	SNV	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	D	P	D	D	0.991	1	1	C	28.8
exônica	<i>EDNRB</i>	c.605C>A	p.A202D	não sinônima	SNV	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	D	P	D	D	0.935	1	1	C	20.7
exônica	<i>EDNRB</i>	c.731C>T	p.T244M	não sinônima	SNV	0.004383	0.0027	rs5350	0.003	ND	0.003	0.01	ND	D	P	T	D	0.02	0.002	0.092	N	9.646
exônica	<i>EDNRB</i>	c.778G>T	p.V260F	não sinônima	SNV	0.001461	ND	rs77132068	ND	ND	ND	ND	ND	N	PP	T	B	0.595	0.011	0.012	N	0.271
exônica	<i>EDNRB</i>	c.828G>T	p.W276C	não sinônima	SNV	0.000077	ND	rs104894387	ND	ND	ND	ND	ND	D	P	D	D	0.997	1	1	C	22.9
exônica	<i>EDNRB</i>	c.874T>C	p.F292L	não sinônima	SNV	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	D	P	D	D	0.128	0.909	0.999	C	19
exônica	<i>EDNRB</i>	c.890C>A	p.T297N	não sinônima	SNV	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	D	P	D	D	0.885	1	1	C	25.8
exônica	<i>EDNRB</i>	c.914G>A	p.S305N	não sinônima	SNV	0.009842	0.01	rs5352	0.01	ND	0.02	0.002	0.01	D	PP	T	B	0.97	0.999	1	C	8.656
exônica	<i>EDNRB</i>	c.1025G>T	p.S342I	não sinônima	SNV	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	D	P	D	D	0.998	1	1	C	17.4
exônica	<i>EDNRB</i>	c.1177T>C	p.F393L	não sinônima	SNV	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	D	P	D	P	0.995	1	1	C	33

Tabela 21: Previsão do efeito dessas mutações descritas no banco de dados LOVD no gene *EDN3* e a frequência das mutações encontradas nos bancos de dados 1000 genomas, dbSNP135 e ESP6500 (ND: Não descrita). TG_AF: Média da frequência para alelos alternativos na posição; TG_ASN: Média da frequência na população asiática (1.000 Genomas); TG_AMR: Média da frequência na população Sul-americana (1000 genomas); TG_AFR: Média da frequência na população Africana (1000 genomas); TG_EUR: Média da frequência na população Europeia (1000 genomas). Programas para previsão da patogenicidade: LRT (D: deletéria; N: neutra; NA: não analisado), MutationTaster (P: patogênica; PP: polimórfica), Polyphen2 (D: danosa; P: provavelmente danosa; B: benigna) e SIFT (D: danosa; T: tolerável; NA: não analisado). Programas para estudo de conservação: PhastCons e PhyloP (C: conservado; N: não conservado; priPhCons: pontuação da conservação em primatas; mamPhCons: pontuação da conservação em mamíferos; verPhCons: pontuação da conservação em vertebrados); *C score*: índice calculado (5-25); os dados destacados em vermelho não falam a favor da patogenicidade das SNVs.

Função	Gene	mutação	cambio de AA	Efeito no exon	Tipo	ESP6500	1000g2012	dbSNP135	TG_AF	TG_ASN	TG_AMR	TG_AFR	TG_EUR	LRT	MutationTaster	SIFT	PolyPhen2	priPhCons	mamPhCons	verPhCons	PhyloP	Cscore
exonic	EDN3	c.49G>A	p.A17T	não sinônima	SNV	0.00016	0.01	rs11570255	0.01	0.02	0.003	ND	ND	N	PP	T	B	0.961	0.999	0.997	C	20.7
exonic	EDN3	c.163G>T	p.E55X	códon de parada prematuro	SNV	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	NA	P	NA	NA	0.031	0.093	0.001	N	27
exonic	EDN3	c.262_263delinsT	p.A88Sfs	mudança de matriz de leitura	DEL	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	NA	NA	NA	NA	0.034	0.004	0.106	NA	14.18
exonic	EDN3	c.277C>G	p.R93G	não sinônima	SNV	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	D	PP	D	D	0.961	0.303	0.343	C	23.1
exonic	EDN3	c.286C>T	p.R96C	não sinônima	SNV	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	D	P	D	D	0.994	0.94	0.993	C	21.9
exonic	EDN3	c.293C>A	p.T98K	não sinônima	SNV	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	D	P	D	D	0.996	0.985	1	C	32
exonic	EDN3	c.293C>T	p.T98M	não sinônima	SNV	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	D	P	D	D	0.996	0.985	1	C	27.5
exonic	EDN3	c.335A>G	p.H112R	não sinônima	SNV	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	D	PP	D	D	0.975	1	1	C	24.1
exonic	EDN3	c.380A>G	p.Y127C	não sinônima	SNV	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	D	P	D	D	0.888	1	1	C	17.76
exonic	EDN3	c.476G>T	p.C159F	não sinônima	SNV	ND	ND	rs74315384	ND	ND	ND	ND	ND	D	P	D	D	0.014	0.854	0.867	C	12.93
exonic	EDN3	c.507C>A	p.C169X	códon de parada prematuro	SNV	ND	ND	rs74315385	ND	ND	ND	ND	ND	D	P	NA	NA	0.221	0.021	0.058	N	22.1
exonic	EDN3	c.517T>C	p.C173R	não sinônima	SNV	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	D	P	D	D	0.355	0.523	0.927	C	14.35
exonic	EDN3	c.565dupA	p.T189Nfs	mudança de matriz de leitura	INS	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	NA	NA	NA	NA	0.627	0	0	N	22.8
exonic	EDN3	c.628G>A	p.A210T	não sinônima	SNV	0.00169	0.0023	rs11570351	0.002	ND	ND	0.01	ND	NA	P	D	B	0.004	0	0	N	10.61

Tabela 22: mutações que se coloca em dúvida a patogenicidade na casuística de pacientes com SW apresentando a frequência nos bancos de dados 1000 genomas, dbSNP135 e ESP6500 (ND: Não descrita). TG_AF: Média da frequência para alelos alternativos na posição; TG_ASN: Média da frequência na população asiática em 1.000 Genomas; TG_AMR: Média da frequência na população Sul-americana em 1.000 Genomas; TG_AFR: Média da frequência na população Africana em 1.000 Genomas; TG_EUR: Média da frequência na população Europeia em 1.000 Genomas. Programas para previsão da patogenicidade: LRT (D: deletéria; N: neutra; NA: não analisado), MutationTaster (P: patogênica; PP: polimórfica), Polyphen2 (D: danosa; P: provavelmente danosa; B: benigna) e SIFT (D: danosa; T: tolerável; NA: não analisado). Programas para estudo de conservação: PhastCons e PhyloP (C: conservado; N: não conservado; os dados destacados em vermelho não falam a favor da patogenicidade das SNVs e em amarelo as que apresentam uma frequência maior à esperada pela incidência da SW.

Função	Gene	LOVD mut	cambio de A	Tipo	ESP6500	1000g2012	dbSNP135	TG_AF	TG_ASN	TG_AMR	TG_AFR	TG_EUR	LRT	MutationTast	PolyPhen2	SIFT	PhyloP
exônica	PAX3	c.586G>A	p.G196S	SNV	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	N	PP	B	T	C
exônica	PAX3	c.944C>A	p.T315K	SNV	0.027833	0.02	rs2234675	0.02	ND	0.03	0.004	0.04	D	D	D	D	N
exônica	PAX3	c.1121C>T	p.S374L	SNV	ND	ND	rs45607236	ND	ND	ND	ND	ND	N	PP	B	T	N
exônica	MITF	c.332C>T	p.A111V	SNV	ND	0.0005	rs182533927	ND	0.001	0.002	ND	ND	D	D	B	T	C
exônica	MITF	c.483A>T	p.Q161H	SNV	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	D	D	B	T	C
exônica	MITF	c.892T>C	p.S298P	SNV	0.000308	ND	rs104893747	ND	ND	ND	ND	ND	D	D	B	T	C
exônica	SOX10	c.274G>C	p.V92L	SNV	0.000231	ND	rs142113652	ND	ND	ND	ND	ND	D	D	D	D	C
exônica	SOX10	c.961G>C	p.G321R	SNV	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	N	PP	B	T	C
exônica	EDNRB	c.13C>A	p.P5T	SNV	0.000231	0.0005	rs12720160	0.001	ND	0.003	ND	ND	N	PP	D	T	N
exônica	EDNRB	c.20T>A	p.L7Q	SNV	ND	ND	rs5345	ND	ND	ND	ND	ND	N	PP	B	T	N
exônica	EDNRB	c.49C>T	p.L17F	SNV	0.00592	0.01	rs5346	0.01	ND	ND	0.02	ND	N	PP	B	T	N
exônica	EDNRB	c.169G>A	p.G57S	SNV	0.006612	0.0046	rs1801710	0.005	ND	0.01	ND	0.01	N	PP	B	T	N
exônica	EDNRB	c.178G>A	p.A60T	SNV	0.000154		rs142569954	ND	ND	ND	ND	ND	N	PP	B	T	N
exônica	EDNRB	c.227G>T	p.R76M	SNV	0.000308	0.0027	rs2228271	0.003	ND	ND	0.01	ND	N	N	D	T	N
exônica	EDNRB	c.731C>T	p.T244M	SNV	0.004383	0.0027	rs5350	0.003	ND	0.003	0.01	ND	D	D	B	D	N
exônica	EDNRB	c.778G>T	p.V260F	SNV	0.001461	ND	rs77132068	ND	ND	ND	ND	ND	N	PP	B	T	N
exônica	EDNRB	c.914G>A	p.S305N	SNV	0.009842	0.01	rs5352	0.01	ND	0.02	0.002	0.01	D	PP	B	T	C
exônica	EDN3	c.49G>A	p.A17T	SNV	0.000155	0.01	rs11570255	0.01	0.02	0.003	ND	ND	N	PP	P	T	C
exônica	EDN3	c.628G>A	p.A210T	SNV	0.001692	0.0023	rs11570351	0.002	ND	ND	0.01	ND	N	PP	B	T	N

5 Considerações finais

A pesquisa de mutações em uma casuística de 48 probandos com a síndrome de Warzenburg permitiu identificar 17 mutações (35,4%) como provavelmente causativas da síndrome. Nos demais casos (31), não foi possível identificar molecularmente a causa. Outros tipos de análises poderiam vir a evidenciar a alteração molecular, como por exemplo, investigação das variações de número de cópias dos outros genes associados, como os genes *SNAI2*, *EDN3* e *EDNRB* que não foram incluídos no MLPA. Além disso, seria interessante também sequenciar algumas porções das regiões intrônicas dos genes *MITF*, *PAX3*, *SOX10*, *SNAI2*, *EDN3* e *EDNRB*, especialmente mais próximas dos exons, em busca de mutações que poderiam influenciar o *splicing*. O ideal seria realizar o estudo de exomas por meio de sequenciamento massivo em paralelo, pois isso permitiria conseguir descobrir novos genes e suas variações associadas à síndrome.

Nesse estudo, procurou-se avaliar com cuidado a possível patogenicidade de todas as mutações aqui encontradas e também as já descritas em bancos de dados sobre a síndrome, com o auxílio de algoritmos como ANNOVAR e CADD. Vários outros estudos nesses últimos meses [Dorschner *et al.*, 2013, Kassahn *et al.*, 2014] recomendam essa metodologia para validar a patogenicidade das variações associadas às doenças. Tem sido reforçada a necessidade de se estudar as variações genéticas associadas a doenças utilizando as suas frequências depositadas no projeto 1000 genomas e 6500 exomas. Também tem sido dada importância à informação detalhada sobre os familiares testados. Na revisão no banco de dados de LOVD, sobre as 105 mutações do tipo não sinônimas, colocamos em dúvida a patogenicidade de 19 alterações (18,1%).

Com o passar dos anos, espera-se que projetos como o projeto 1000 genomas e 6500 exomas aumentem sua abrangência e venham a ajudar a determinar com maior clareza se algumas das mutações encontradas na nossa casuística são, de fato, variações novas causadoras de doença ou se são variantes sem efeito, presentes na população brasileira mas ainda não amostradas nesses projetos.

Na casuística de 48 pacientes foi possível identificar mutações consideradas causais em 35,4% dos probandos. Esta porcentagem é maior se comparada às duas outras pesquisas [Milunsky *et al.*, 2007, Wildhardt *et al.*, 2013] feitas com quantidades grandes de pacientes [119 (15,9%) e 109 (5,5%)]. Neste estudo, foram analisados todos os genes já conhecidos relacionados à SW e também foi utilizada a técnica de *MLPA*, enquanto a maioria dos trabalhos se concentraram apenas nos genes *PAX3*, *MITF*, o que valoriza os achados de nossa casuística.

6 Conclusões

A estratégia de pesquisa de mutações utilizada neste estudo permitiu a detecção de mutações em genes relacionados à síndrome de Waardenburg. Dentre as 19 mutações detectadas, 17 foram consideradas como patogênicas. Dos 48 probandos, 35,4% tiveram mutações patogênicas detectadas. Das 17 mutações consideradas como patogênicas, oito não foram descritas antes.

Dentre as 17 mutações consideradas patogênicas nos 48 pacientes (35,4%), dez ocorreram no gene *PAX3* (20,8%), três no gene *MITF* (6,3%) e quatro mutações no gene *SOX10* (8,3%). Deleções totais e parciais nos genes *PAX3*, *MITF* e *SOX10* foram encontradas em 6 pacientes (12,5%). Nos genes *SNAI2* e *EDN3* e no *EDNRB* nenhuma mutação patogênica foi associada. Esses genes não foram incluídos na análise de MLPA.

O estudo das variantes citadas como responsáveis pela SW nos genes *PAX3*, *MITF*, *SOX10*, *EDN3* e *EDNRB* no banco de dados LOVD mostrou que, das 105 nsSNVs estudadas, foram colocadas em dúvida a patogenicidade de 19 delas (18,1%). Dessas 19 nsSNVs, 9 (9,5%) possuem uma frequência acima da frequência esperada da SW na população, o que contribui para descartar sua patogenicidade. Essa análise das 105 variantes indicadas como patogênicas permite concluir que são necessários estudos mais rigorosos sobre as novas mutações encontradas e sobre as já publicadas ou depositadas em bancos de dados.

O estudo molecular, juntamente com a correta interpretação do efeito das mutações na SW, tem uma importância significativa no aconselhamento genético e na estimativa dos riscos de repetição, especialmente nos casos isolados com poucos sinais clínicos.

Referências

- Adzhubei et al.(2010)** Ivan A Adzhubei, Steffen Schmidt, Leonid Peshkin, Vasily E Ramensky, Anna Gerasimova, Peer Bork, Alexey S Kondrashov e Shamil R Sunyaev. A method and server for predicting damaging missense mutations. *Nature methods*, 7(4):248–249.
- Arai et al.(1993)** Hiroshi Arai, K Nakao, Kazuhiko Takaya, Kiminori Hosoda, Yoshihiro Ogawa, Shigetada Nakanishi e Hiroo Imura. The human endothelin-b receptor gene. structural organization and chromosomal assignment. *Journal of Biological Chemistry*, 268(5):3463–3470.
- Arias e Mota(1978)** S Arias e M Mota. Apparent non-penetrance for dystopia in waardenburg syndrome type i, with some hints on the diagnosis of dystopia canthorum. *Journal de genetique humaine*, 26(2):103–131.
- Attié et al.(1995)** Tania Attié, Marianne Till, Anna Pelet, Jeanne Amiel, Patrick Edery, Laetitia Boutrand, Arnold Munnich e Stanislas Lyonnet. Mutation of the endothelin-receptor b gene in waardenburg-hirschsprung disease. *Human molecular genetics*, 4(12):2407–2409.
- Auricchio et al.(1996)** Alberto Auricchio, Giorgio Casari, Annamaria Staiano e Andrea Ballabio. Endothelin-b receptor mutations in patients with isolated hirschsprung disease from a non-inbred population. *Human molecular genetics*, 5(3):351–354.
- Baldwin et al.(1992)** Clinton T Baldwin, Christopher F Hoth, Jean A Amos, Elias O da Silva e Aubrey Milunsky. An exonic mutation in the hup2 paired domain gene causes waardenburg’s syndrome. *Nature*, 355(6361):637–638.
- Berra et al.(2006)** Edurne Berra, Jacques Pouysségur, Robert Ballotti et al. Hif1 α est une nouvelle cible du facteur de transcription mitf: Implication de la cascade ampc-mitf-hif1 α dans le développement des mélanomes. *M/S: médecine sciences*, 22(1):10–13.
- Blake e Ziman(2014)** Judith A Blake e Melanie R Ziman. Pax genes: regulators of lineage specification and progenitor cell maintenance. *Development*, 141(4):737–751.
- Bondurand et al.(2000)** Nadege Bondurand, Veronique Pingault, Derk E Goerich, Nicole Lemort, Elisabeth Sock, Cedric Le Caignec, Michael Wegner e Michel Goossens. Interaction among sox10, pax3 and mitf, three genes altered in waardenburg syndrome. *Human molecular genetics*, 9(13):1907–1917.
- Britsch et al.(2001)** Stefan Britsch, Derk E Goerich, Dieter Riethmacher, Reto I Peirano, Moritz Rossner, Klaus-Armin Nave, Carmen Birchmeier e Michael Wegner. The transcription factor sox10 is a key regulator of peripheral glial development. *Genes & development*, 15(1):66–78.
- Brizzolara et al.(2004)** Antonella Brizzolara, Michele Torre, Anna Favre, Alessio Pini Prato, Renata Bocciardi e Giuseppe Martucciello. Histochemical study of dom mouse: a model for waardenburg-hirschsprung’s phenotype. *Journal of pediatric surgery*, 39(7):1098–1103.

- Chalepakis et al.(1994a)** Georges Chalepakis, Martyn Goulding, Andrew Read, Tom Strachan e Peter Gruss. Molecular basis of splotch and waardenburg pax-3 mutations. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 91(9):3685–3689.
- Chalepakis et al.(1994b)** Georges Chalepakis, Jan Wijnholds e Peter Gruss. Pax-3-dna interaction: flexibility in the dna binding and induction of dna conformational changes by paired domains. *Nucleic acids research*, 22(15):3131–3137.
- Chen et al.(2010)** Hongsheng Chen, Lu Jiang, Zhiguo Xie, Lingyun Mei, Chufeng He, Zhengmao Hu, Kun Xia e Yong Feng. Novel mutations of pax3, mitf, and sox10 genes in chinese patients with type i or type ii waardenburg syndrome. *Biochemical and biophysical research communications*, 397(1):70–74.
- Chen et al.(2008)** Jing Chen, Shu-Zhi Yang, Jun Liu, Bing Han, Guo-Jian Wang, Xin Zhang, Dong-Yang Kang, Pu Dai, WY Young e HJ Yuan. [mutation screening of mitf gene in patients with waardenburg syndrome type 2]. *Yi chuan= Hereditas/Zhongguo yi chuan xue hui bian ji*, 30(4):433–438.
- Choi et al.(2008)** Young Jin Choi, Tae Jin Yoon e Young Ho Lee. Changing expression of the genes related to human hair graying. *European Journal of Dermatology*, 18(4):397–399.
- Chun e Fay(2009)** Sung Chun e Justin C Fay. Identification of deleterious mutations within three human genomes. *Genome research*, 19(9):1553–1561.
- Cohen et al.(1998)** Michael E Cohen, Mingfei Yin, William A Paznekas, Michael Schertzer, Stephen Wood e Ethylin Wang Jabs. Human slug gene organization, expression, and chromosome map location on 8q. *Genomics*, 51(3):468–471.
- Consortium et al.(2012a)** 1000 Genomes Project Consortium et al. An integrated map of genetic variation from 1,092 human genomes. *Nature*, 491(7422):56–65.
- Consortium et al.(2012b)** ENCODE Project Consortium et al. An integrated encyclopedia of dna elements in the human genome. *Nature*, 489(7414):57–74.
- Cooper et al.(2005)** Gregory M Cooper, Eric A Stone, George Asimenos, Eric D Green, Serafim Batzoglou e Arend Sidow. Distribution and intensity of constraint in mammalian genomic sequence. *Genome research*, 15(7):901–913.
- DeStefano et al.(1998)** Anita L DeStefano, L Adrienne Cupples, Kathleen S Arnos, JH Jr Asher, Clinton T Baldwin, Susan Blanton, Melisa L Carey, Elias O da Silva, Thomas B Friedman, Jacquie Greenberg et al. Correlation between waardenburg syndrome phenotype and genotype in a population of individuals with identified pax3 mutations. *Human genetics*, 102(5):499–506.
- Dorschner et al.(2013)** Michael O Dorschner, Laura M Amendola, Emily H Turner, Peggy D Robertson, Brian H Shirts, Carlos J Gallego, Robin L Bennett, Kelly L Jones, Mari J Tokita, James T Bennett et al. Actionable, pathogenic incidental findings in 1,000 participants? exomes. *The American Journal of Human Genetics*, 93(4):631–640.
- Edery et al.(1996)** Patrick Edery, Tania Attie, Jeanne Amiel, Anna Pelet, Charis Eng, Robert MW Hofstra, Helene Martelli, Christelle Bidaud, Arnold Munnich e Stanislas

- Lyonnet. Mutation of the endothelin-3 gene in the waardenburg-hirschsprung disease (shah-waardenburg syndrome). *Nature genetics*, 12(4):442–444.
- Farrer et al.(1992)** Lindsay A Farrer, Kenneth M Grundfast, Jean Amos, Kathleen S Arnos, James H Asher, Peter Beighton, Scott R Diehl, Jörgen Fex, Carole Foy, Thomas B Friedman et al. Waardenburg syndrome (ws) type i is caused by defects at multiple loci, one of which is near alpp on chromosome 2: First report of the ws consortium. *American journal of human genetics*, 50(5):902.
- Fenby et al.(2008)** Benjamin T Fenby, Vassiliki Fotaki e John O Mason. Pax3 regulates wnt1 expression via a conserved binding site in the 5' proximal promoter. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Gene Regulatory Mechanisms*, 1779(2):115–121.
- Feng et al.(2007)** Y Feng, ZZ Liu e H Hu. [a novel mutation in mitf gene leads to a patient with waardenburg syndrome type ii]. *Zhonghua er bi yan hou tou jing wai ke za zhi= Chinese journal of otorhinolaryngology head and neck surgery*, 42(10):787–788.
- Fernández et al.(2014)** Raquel M Fernández, Raquel Núñez-Ramos, M^a Valle Enguix-Riego, Francisco José Román-Rodríguez, Enrique Galán-Gómez, Emilio Blesa-Sánchez, Guillermo Antiñolo, Ramón Núñez-Núñez e Salud Borrego. Waardenburg syndrome type 4: Report of two new cases caused by sox10 mutations in spain. *American Journal of Medical Genetics Part A*, 164(2):542–547.
- Fu et al.(2013)** Wenqing Fu, Timothy D O'Connor, Goo Jun, Hyun Min Kang, Goncalo Abecasis, Suzanne M Leal, Stacey Gabriel, Mark J Rieder, David Altshuler, Jay Shendure et al. Analysis of 6,515 exomes reveals the recent origin of most human protein-coding variants. *Nature*, 493(7431):216–220.
- Haddad et al.(2011)** NM Haddad, D Ente, E Chouery, N Jalkh, C Mehawej, Z Khoeir, V Pingault e A Mégarbané. Molecular study of three lebanese and syrian patients with waardenburg syndrome and report of novel mutations in the ednrb and mitf genes. *Molecular syndromology*, 1(4):169–175.
- Hageman e Delleman(1977)** Marius J Hageman e J Willem Delleman. Heterogeneity in waardenburg syndrome. *American journal of human genetics*, 29(5):468.
- Hauswirth et al.(2012)** Regula Hauswirth, Bianca Haase, Marlis Blatter, Samantha A Brooks, Dominik Burger, Cord Drögemüller, Vincent Gerber, Diana Henke, Jozef Janda, Rony Jude et al. Mutations in mitf and pax3 cause "splashed white" and other white spotting phenotypes in horses. *PLoS genetics*, 8(4).
- Hauswirth et al.(2013)** Regula Hauswirth, Rony Jude, Bianca Haase, Rebecca R Bellone, Sheila Archer, Heather Holl, Samantha A Brooks, Teruaki Tozaki, Maria Cecilia T Penedo, Stefan Rieder et al. Novel variants in the kit and pax3 genes in horses with white-spotted coat colour phenotypes. *Animal genetics*, 44(6):763–765.
- Hazan et al.(2012)** Filiz Hazan, A Taylan Ozturk, Hamit Adibelli, Nurettin Unal, Ajlan Tukun et al. A novel missense mutation of the paired box 3 gene in a turkish family with waardenburg syndrome type 1. *Molecular vision*, 19:196–202.

- Herbarth et al.(1998)** Beate Herbarth, Veronique Pingault, Nadege Bondurand, Kirsten Kuhlbrodt, Irm Hermans-Borgmeyer, Aldamaria Puliti, Nicole Lemort, Michel Goossens e Michael Wegner. Mutation of the sry-related sox10 gene in dominant megacolon, a mouse model for human hirschsprung disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 95(9):5161–5165.
- Hornyak(2008)** Thomas J Hornyak. Albinism and other genetic disorders of pigmentation. Wolff K, et al. *Fitzpatrick's Dermatology in General Medicine*. 7th ed. New York, NY: The McGraw-Hill Companies.
- Jabeen et al.(2012)** Raheela Jabeen, Masroor Ellahi Babar, Jamil Ahmad e Ali Raza Awan. Novel mutations of endothelin-b receptor gene in pakistani patients with waardenburg syndrome. *Molecular biology reports*, 39(1):785–788.
- Jiang et al.(1998)** Rulang Jiang, Yu Lan, Christine R Norton, John P Sundberg e Thomas Gridley. The slug gene is not essential for mesoderm or neural crest development in mice. *Developmental biology*, 198(2):277–285.
- Jiao et al.(2004)** Zhongxian Jiao, Ramin Mollaaghababa, William J Pavan, Anthony Antonellis, Eric D Green e Thomas J Hornyak. Direct interaction of sox10 with the promoter of murine dopachrome tautomerase (dct) and synergistic activation of dct expression with mitf. *Pigment cell research*, 17(4):352–362.
- Jones(1990)** Marilyn C Jones. The neurocristopathies: reinterpretation based upon the mechanism of abnormal morphogenesis. *The Cleft Palate-Craniofacial Journal*, 27(2): 136–140.
- Jung et al.(2013)** Ho Joo Jung, Sun A Jin, Soo Jin Na Choi, Seung-Chul Lee e Sook Jung Yun. A de novo sox10 mutation in a patient with waardenburg syndrome type iv. *Journal of the American Academy of Dermatology*, 68(6):e177–e178.
- Kassahn et al.(2014)** Karin S Kassahn, Hamish S Scott e Melody C Caramins. Integrating massively parallel sequencing into diagnostic workflows and managing the annotation and clinical interpretation challenge. *Human mutation*, 35(4):413–423.
- Kircher et al.(2014)** Martin Kircher, Daniela M Witten, Preti Jain, Brian J O’Roak, Gregory M Cooper e Jay Shendure. A general framework for estimating the relative pathogenicity of human genetic variants. *Nature genetics*, 46(3):310–315.
- Kozawa et al.(2008)** M Kozawa, H Kondo, T Tahira, K Hayashi e E Uchio. Novel mutation in pax3 gene in waardenburg syndrome accompanied by unilateral macular degeneration. *Eye*, 23(7):1619–1621.
- Krispin et al.(2010)** Shlomo Krispin, Erez Nitzan e Chaya Kalcheim. The dorsal neural tube: a dynamic setting for cell fate decisions. *Developmental neurobiology*, 70(12): 796–812.
- Kubic et al.(2008)** Jennifer D Kubic, Kacey P Young, Rebecca S Plummer, Anton E Ludvik e Deborah Lang. Pigmentation pax-ways: the role of pax3 in melanogenesis, melanocyte stem cell maintenance, and disease. *Pigment cell & melanoma research*, 21 (6):627–645.

- Kuhlbrodt et al.(1998)** Kirsten Kuhlbrodt, Beate Herbarth, Elisabeth Sock, Irm Hermans-Borgmeyer e Michael Wegner. Sox10, a novel transcriptional modulator in glial cells. *The Journal of neuroscience*, 18(1):237–250.
- Kumar et al.(2009)** Prateek Kumar, Steven Henikoff e Pauline C Ng. Predicting the effects of coding non-synonymous variants on protein function using the sift algorithm. *Nature protocols*, 4(7):1073–1081.
- Kurihara et al.(1999)** H Kurihara, Y Kurihara, R Nagai e Y Yazaki. Endothelin and neural crest development. *Cellular and molecular biology (Noisy-le-Grand, France)*, 45(5):639–651.
- Kwang et al.(2002)** Stanford J Kwang, Sean M Brugger, Arthur Lazik, Amy E Merrill, Lan-Ying Wu, Yi-Hsin Liu, Mamoru Ishii, Frank O Sangiorgi, Michael Rauchman, Henry M Sucov et al. Msx2 is an immediate downstream effector of pax3 in the development of the murine cardiac neural crest. *Development*, 129(2):527–538.
- Lang et al.(2005)** Deborah Lang, Min Min Lu, Li Huang, Kurt A Engleka, Maozhen Zhang, Emily Y Chu, Shari Lipner, Arthur Skoultschi, Sarah E Millar e Jonathan A Epstein. Pax3 functions at a nodal point in melanocyte stem cell differentiation. *Nature*, 433(7028):884–887.
- Le Douarin e Kalcheim(1999)** Nicole Le Douarin e Chaya Kalcheim. The neural crest. (36).
- Lee e Scherer(2010)** Charles Lee e Stephen W Scherer. The clinical context of copy number variation in the human genome. *Expert Rev Mol Med*, 12:e8.
- Liu et al.(1995)** Xue-Zhong Liu, Valerie E Newton e Andrew P Read. Waardenburg syndrome type ii: phenotypic findings and diagnostic criteria. *American journal of medical genetics*, 55(1):95–100.
- MacArthur et al.(2014)** DG MacArthur, TA Manolio, DP Dimmock, HL Rehm, J Shendure, GR Abecasis, DR Adams, RB Altman, SE Antonarakis, EA Ashley et al. Guidelines for investigating causality of sequence variants in human disease. *Nature*, 508(7497):469–476.
- Macina et al.(1995)** Roberto A Macina, Frederic G Barr, Naomi Galili e Harold C Riethman. Genomic organization of the human pax3 gene: Dna sequence analysis of the region disrupted in alveolar rhabdomyosarcoma. *Genomics*, 26(1):1–8.
- Mayanil et al.(2001)** CSK Mayanil, David George, Laura Freilich, Erik J Miljan, Barbara Mania-Farnell, David G McLone e Eric G Bremer. Microarray analysis detects novel pax3 downstream target genes. *Journal of Biological Chemistry*, 276(52):49299–49309.
- McLaren et al.(2010)** William McLaren, Bethan Pritchard, Daniel Rios, Yuan Chen, Paul Flicek e Fiona Cunningham. Deriving the consequences of genomic variants with the ensembl api and snp effect predictor. *Bioinformatics*, 26(16):2069–2070.
- Meyer et al.(2013)** Laurence R Meyer, Ann S Zweig, Angie S Hinrichs, Donna Karolchik, Robert M Kuhn, Matthew Wong, Cricket A Sloan, Kate R Rosenbloom, Greg Roe,

- Brooke Rhead *et al.* The ucsc genome browser database: extensions and updates 2013. *Nucleic acids research*, 41(D1):D64–D69.
- Miller *et al.*(2010)** David T Miller, Margaret P Adam, Swaroop Aradhya, Leslie G Biesecker, Arthur R Brothman, Nigel P Carter, Deanna M Church, John A Crolla, Evan E Eichler, Charles J Epstein *et al.* Consensus statement: chromosomal microarray is a first-tier clinical diagnostic test for individuals with developmental disabilities or congenital anomalies. *The American Journal of Human Genetics*, 86(5):749–764.
- Milunsky *et al.*(2007)** JM Milunsky, TA Maher, M Ito e A Milunsky. The value of mlpa in waardenburg syndrome. *Genetic testing*, 11(2):179–182.
- Pardono(2005)** Eliete Pardono. Estudo genético-clínico e molecular da síndrome de waardenburg e de suas condições afins. Dissertação de Mestrado, Universidade de São Paulo.
- Pardono *et al.*(2003)** Eliete Pardono, Yolande van Bever, Jenneke van den Ende, Poti C Havrenne, Paula Iughetti, Sylvia RP Maestrelli, F Costa, Antonio Richieri-Costa, Oswaldo Frota-Pessoa, Paulo A Otto *et al.* Waardenburg syndrome: clinical differentiation between types i and ii. *American Journal of Medical Genetics Part A*, 117(3):223–235.
- Pardono *et al.*(2006)** Eliete Pardono, Juliana F Mazzeu, Karina Lezirovitz, Maria Teresa Auricchio, Paula Iughetti, Rafaella MP Nascimento, Regina C Mingroni-Netto e Paulo A Otto. Waardenburg syndrome: Description of two novel mutations in the *PAX3* gene, one of which incompletely penetrant. *Genetic and Molecular Biology*, 29(4):601–04.
- Paternoster *et al.*(2012)** Lavinia Paternoster, Alexei I Zhurov, Arshed M Toma, John P Kemp, Beate St Pourcain, Nicholas J Timpson, George McMahon, Wendy McArdle, Susan M Ring, George Davey Smith *et al.* Genome-wide association study of three-dimensional facial morphology identifies a variant in *pax3* associated with nasion position. *The American Journal of Human Genetics*, 90(3):478–485.
- Pérez-Losada *et al.*(2002)** Jesus Pérez-Losada, Manuel Sánchez-Martín, Arancha Rodríguez-García, Maria Luz Sánchez, Alberto Orfao, Teresa Flores e Isidro Sánchez-García. Zinc-finger transcription factor slug contributes to the function of the stem cell factor c-kit signaling pathway. *Blood*, 100(4):1274–1286.
- Phelan e Loeken(1998)** Shelley A Phelan e Mary R Loeken. Identification of a new binding motif for the paired domain of *pax-3* and unusual characteristics of spacing of bipartite recognition elements on binding and transcription activation. *Journal of Biological Chemistry*, 273(30):19153–19159.
- Pingault *et al.*(1998)** Véronique Pingault, Nadège Bondurand, Kirsten Kuhlbrodt, Derk E Goerich, Marie-Odette Préhu, Aldamaria Puliti, Beate Herbarth, Irm Hermans-Borgmeyer, Eric Legius, Gert Matthijs *et al.* Sox10 mutations in patients with waardenburg-hirschsprung disease. *Nature genetics*, 18(2):171–173.
- Pingault *et al.*(2010)** Véronique Pingault, Dorothée Ente, Dastot-Le Moal, Michel Goossens, Sandrine Marlin, Nadège Bondurand *et al.* Review and update of mutations causing waardenburg syndrome. *Human mutation*, 31(4):391–406.

- Planque et al.(2004)** Nathalie Planque, Graça Raposo, Laurence Leconte, Oceane Anezo, Patrick Martin e Simon Saule. Microphthalmia transcription factor induces both retinal pigmented epithelium and neural crest melanocytes from neuroretina cells. *Journal of Biological Chemistry*, 279(40):41911–41917.
- Pollard et al.(2010)** Katherine S Pollard, Melissa J Hubisz, Kate R Rosenbloom e Adam Siepel. Detection of nonneutral substitution rates on mammalian phylogenies. *Genome research*, 20(1):110–121.
- Read e Newton(1997)** Andrew P Read e Valerie E Newton. Waardenburg syndrome. *Journal of medical genetics*, 34(8):656–665.
- Sánchez-Martín et al.(2002)** Manuel Sánchez-Martín, Arancha Rodríguez-García, Jesús Pérez-Losada, Ana Sagrera, Andrew P Read e Isidro Sánchez-García. Slug (snai2) deletions in patients with waardenburg disease. *Human molecular genetics*, 11(25):3231–3236.
- Schwarz et al.(2010)** Jana Marie Schwarz, Christian Rödelberger, Markus Schuelke e Dominik Seelow. Mutationtaster evaluates disease-causing potential of sequence alterations. *Nature methods*, 7(8):575–576.
- Shin et al.(1999)** Myung K Shin, John M LeVorse, Robert S Ingram e Shirley M Tilghman. The temporal requirement for endothelin receptor-b signalling during neural crest development. *Nature*, 402(6761):496–501.
- Siepel et al.(2005)** Adam Siepel, Gill Bejerano, Jakob S Pedersen, Angie S Hinrichs, Minmei Hou, Kate Rosenbloom, Hiram Clawson, John Spieth, LaDeana W Hillier, Stephen Richards et al. Evolutionarily conserved elements in vertebrate, insect, worm, and yeast genomes. *Genome research*, 15(8):1034–1050.
- Southard-Smith et al.(1998)** E Michelle Southard-Smith, Lidia Kos e William J Pavan. Sox10 mutation disrupts neural crest development in dom hirschsprung mouse model. *Nature genetics*, 18(1):60–64.
- Stankiewicz e Lupski(2010)** Pawel Stankiewicz e James R Lupski. Structural variation in the human genome and its role in disease. *Annual review of medicine*, 61:437–455.
- Tachibana(2000)** Masayoshi Tachibana. Mitf: a stream flowing for pigment cells. *Pigment Cell Research*, 13(4):230–240.
- Tamayo et al.(2008)** Marta L Tamayo, Nancy Gelvez, Marcela Rodriguez, Silvia Florez, Clara Varon, David Medina e Jaime E Bernal. Screening program for waardenburg syndrome in colombia: clinical definition and phenotypic variability. *American Journal of Medical Genetics Part A*, 146(8):1026–1031.
- Tassabehji et al.(1994)** Mayada Tassabehji, Valeria E Newton e Andrew P Read. Waardenburg syndrome type 2 caused by mutations in the human microphthalmia (mitf) gene. *Nature genetics*, 8(3):251–255.
- Tassabehji et al.(1995)** Mayada Tassabehji, Valerie E Newton, Xue-Zhong Liu, Angela Brady, Dian Donnai, Malgorzata Krajewska-Walasek, Victoria Murday, Andrew Norman, Ewa Oberszyn, William Reardon et al. The mutational spectrum in waardenburg syndrome. *Human molecular genetics*, 4(11):2131–2137.

- Tassabehji et al.(1994)** M Tassabehji, VE Newton, K Leverton, K Turnbull, E Seemanova, J Kunze, K Sperling, T Strachan e AP Read. Pax3 gene structure and mutations: close analogies between waardenburg syndrome and the splotch mouse. *Human molecular genetics*, 3(7):1069–1074.
- Vachtenheim e Borovanský(2010)** Jiri Vachtenheim e Jan Borovanský. "transcription physiology"of pigment formation in melanocytes: central role of mitf. *Experimental dermatology*, 19(7):617–627.
- Verastegui et al.(2000)** Carole Verastegui, Karine Bille, Jean-Paul Ortonne e Robert Ballotti. Regulation of the microphthalmia-associated transcription factor gene by the waardenburg syndrome type 4 gene, sox10. *Journal of Biological Chemistry*, 275(40):30757–30760.
- Wang et al.(2010a)** Juan Wang, Shiqiang Li, Xueshan Xiao, Panfeng Wang, Xiangming Guo e Qingjiong Zhang. Pax3 mutations and clinical characteristics in chinese patients with waardenburg syndrome type 1. *Molecular vision*, 16:1146.
- Wang et al.(2010b)** Kai Wang, Mingyao Li e Hakon Hakonarson. Annovar: functional annotation of genetic variants from high-throughput sequencing data. *Nucleic acids research*, 38(16):e164–e164.
- Wang et al.(2008)** Qiuyu Wang, Wen-Hui Fang, Jerzy Krupinski, Shant Kumar, Mark Slevin e Patricia Kumar. Pax genes in embryogenesis and oncogenesis. *Journal of cellular and molecular medicine*, 12(6a):2281–2294.
- Watanabe et al.(1998)** Atsushi Watanabe, Kazuhisa Takeda, Barbara Ploplis e Masayoshi Tachibana. Epistatic relationship between waardenburg syndrome genes mitf and pax3. *Nature genetics*, 18(3):283–286.
- Widlund e Fisher(2003)** Hans R Widlund e David E Fisher. Microphthalmia-associated transcription factor: a critical regulator of pigment cell development and survival. *Oncogene*, 22(20):3035–3041.
- Wildhardt et al.(2013)** Gabriele Wildhardt, Birgit Zirn, Luitgard M Graul-Neumann, Juliane Wechtenbruch, Markus Suckfüll, Annegret Buske, Axel Bohring, Christian Kubisch, Stefanie Vogt, Gertrud Strobl-Wildemann *et al.* Spectrum of novel mutations found in waardenburg syndrome types 1 and 2: implications for molecular genetic diagnostics. *BMJ open*, 3(3).
- Yajima et al.(1999)** Ichiro Yajima, Shigeru Sato, Takaharu Kimura, Ken-ichi Yasumoto, Shigeki Shibahara, Colin R Goding e Hiroaki Yamamoto. An l1 element intronic insertion in the black-eyed white (mitfmi-bw) gene: the loss of a single mitf isoform responsible for the pigmentary defect and inner ear deafness. *Human molecular genetics*, 8(8):1431–1441.
- Yan et al.(2011)** Xukun Yan, Tianyu Zhang, Zhengmin Wang, Yi Jiang, Yan Chen, Hongyan Wang, Duan Ma, Lei Wang e Huawei Li. A novel mutation in the mitf may be digenic with gjb2 mutations in a large chinese family of waardenburg syndrome type ii. *Journal of Genetics and Genomics*, 38(12):585–591.

Yang *et al.*(2013) Shuzhi Yang, Pu Dai, Xin Liu, Dongyang Kang, Xin Zhang, Weiyan Yang, Chengyong Zhou, Shiming Yang e Huijun Yuan. Genetic and phenotypic heterogeneity in chinese patients with waardenburg syndrome type ii. *PloS one*, 8(10): e77149.