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 Bocángel

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.

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 Aguena, 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 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 as microdeleções e microduplicações dos genes *PAX3*, *MITF* e *SOX10* pela técnica de MLPA (*Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification*). Dentre os resultados obtidos, identificou-se 17 mutações potencialmente patogênicas (35,4% dos probandos). Dessas, seis são 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 mamíferos e primatas. Por meio dessa análise, verificou-se que em 19 mutações desse tipo (18%) faltam evidências de sua patogenicidade, colocando-se em dúvida a sua relação 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 are 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 mammals and primates. Through this analysis, lack of evidence was found for the pathogenicity of 19 non-synonymous mutations (18%) and association of these with Waardenburg syndrome is questioned.

Sumário

1 Introdução **11**

1.1 Síndrome de Waardenburg 11

1.1.1 Caracterização clínica da síndrome de Waardenburg 11

1.1.2 *Dystopia canthorum* ou telecanto 13

1.1.3 Caracterização molecular da síndrome de Waardenburg 14

1.1.3.1 Gene *PAX3* 15

1.1.3.2 Gene *MITF* 19

1.1.3.3 Gene *SNAI2 (SLUG)* 22

1.1.3.4 Gene *SOX10* 22

1.1.3.5 Genes *EDN3* e *EDNRB* 25

1.1.3.6 Variações do número de cópias (CNV) na SW 28

1.2 Predição de patogenicidade de mutações 28

1.2.1 ANNOVAR 29

1.2.2 CADD 30

2 Objetivos **32**

2.1 Objetivo geral 32

2.2 Objetivos específicos 32

3 Considerações finais **33**

4 Conclusões **34**

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% sejam portadores da 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. 1.1C), sinófre (Fig. 1D) e manchas despigmentadas na pele (Fig. 1F). Os principais critérios de diagnóstico são mostrados na Tabela 1.

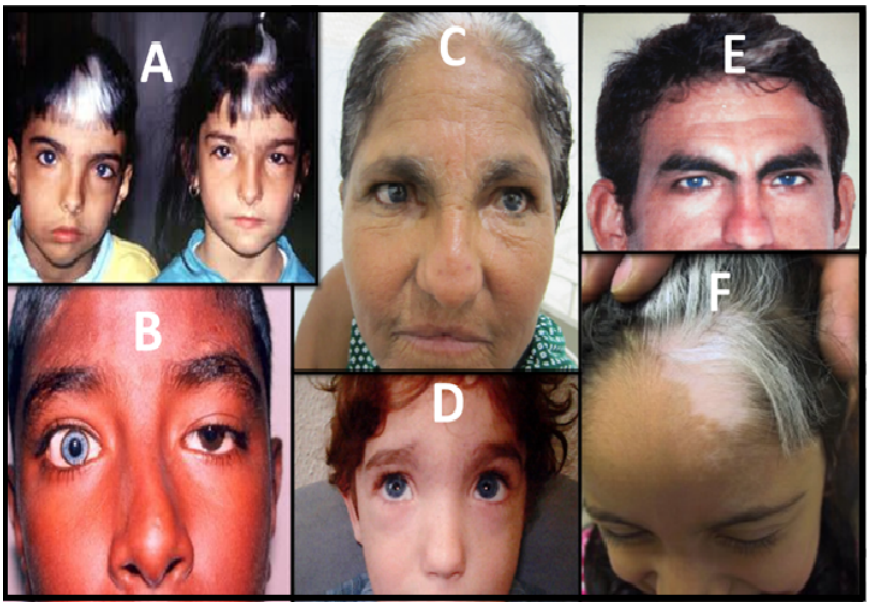

Figura 1: Algumas das características de pacientes com SW.

A 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
• Perda auditiva neurossensorial congênita • Distúrbios de pigmentação da íris (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) olhos azuis hipoplásicos ou brilhantes • Hipopigmentação do cabelo (geralmente mancha branca frontal) • *Dystopia canthorum* (telecanto): aumento da distância entre os cantos internos dos olhos • Parente em primeiro grau afetado
Critérios secundários
• 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	não apresenta

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. 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.

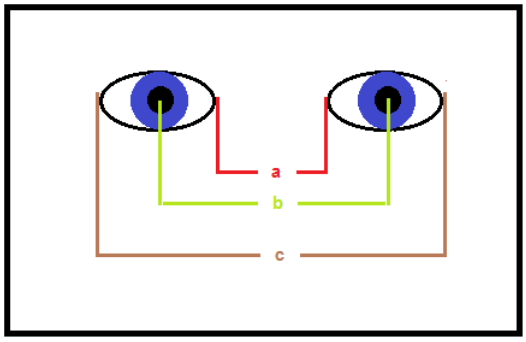

Figura 2: Distâncias utilizadas para o calculo do índice W.

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

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 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, consequentemente, 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 gene *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.

Tabela 4: Genes já identificados da síndrome de Waardenburg.

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

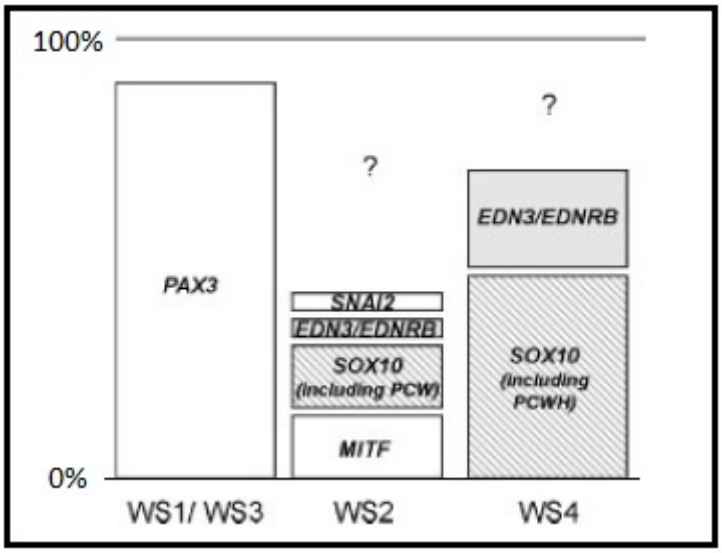

Figura 3: Participação dos genes já conhecidos na etiologia da síndrome de Waardenburg [Pingault *et al.*, 2010].

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 dos 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 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 em 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 identificadas 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 [Chalepakis *et al.*, 1994b, Phelan e Loeken, 1998]. Camundongos modelo, chamados de "*Splotch*", possuem mutação pontual no gene *PAX3* e a função da proteína de transativação está ausente [Chalepakis *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.

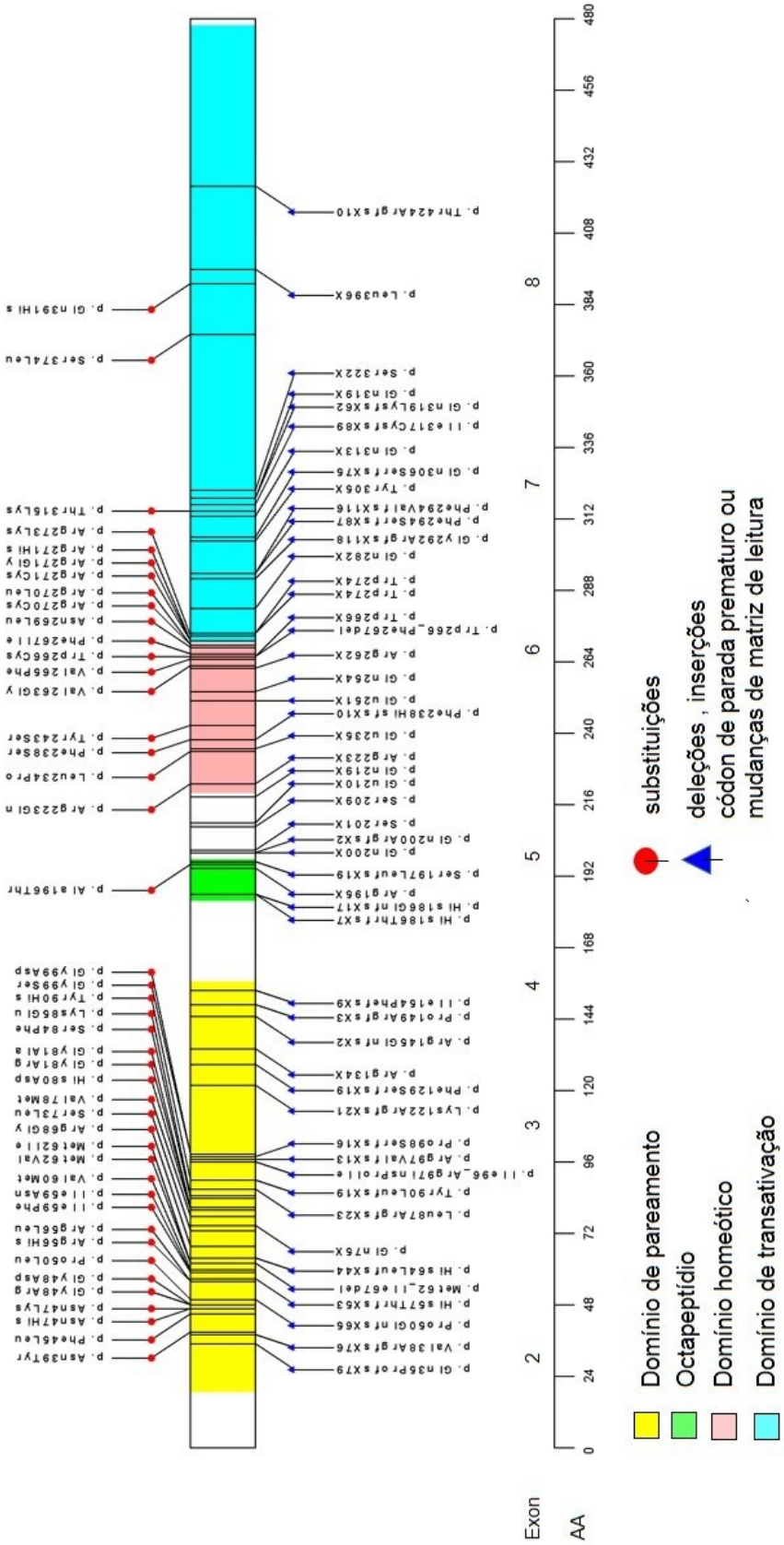

Figura 4: Esquema do gene *PAX3* e as principais mutações descritas no banco de dados LOVD (http://grenada.lumc.nl/LOVD2/WS/).

1.1.3.2 Gene *MITF*

O gene *MITF* (*Microphtalmia 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 Borovanskỳ, 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

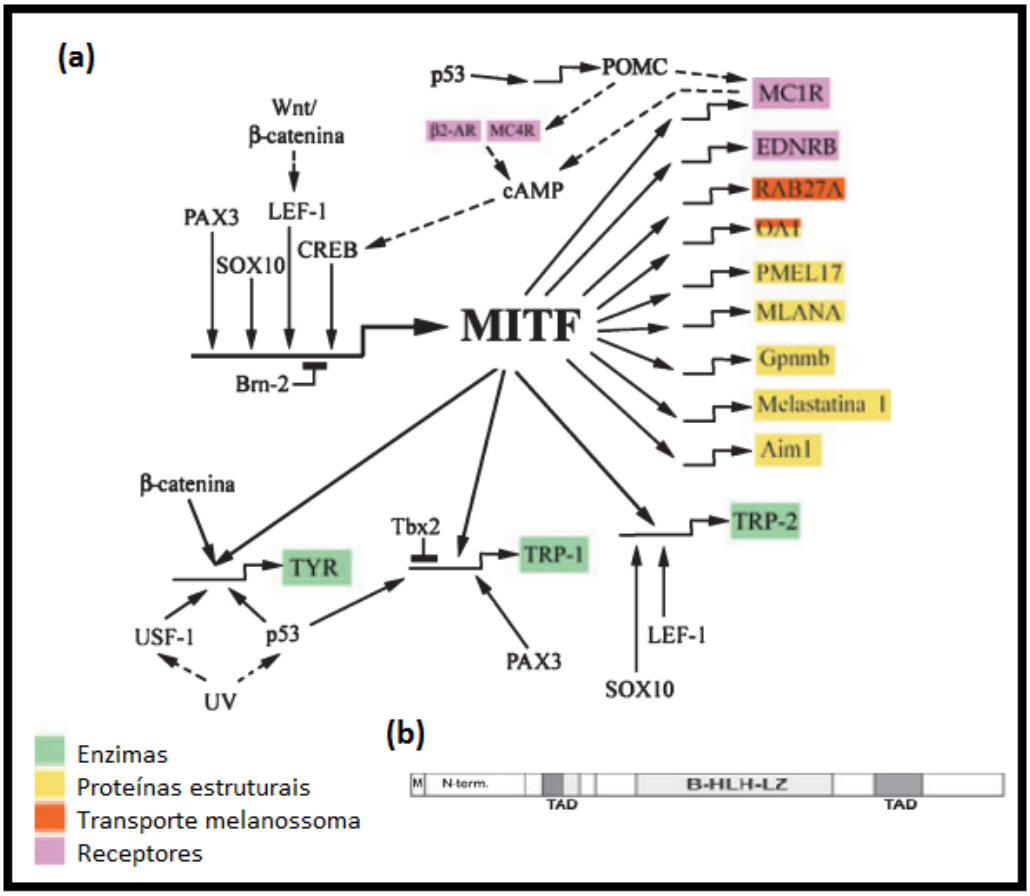

Figura 5: (a)Regulação de *MITF* na expressão e ativação dos genes (b) Representação esquemática de proteína MITF humana [Vachtenheim e Borovanskỳ, 2010]

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 quando se utiliza o índice W. Nesse caso não se mencionou se o caso era isolado ou familial. [Milunsky *et al.*, 2007].

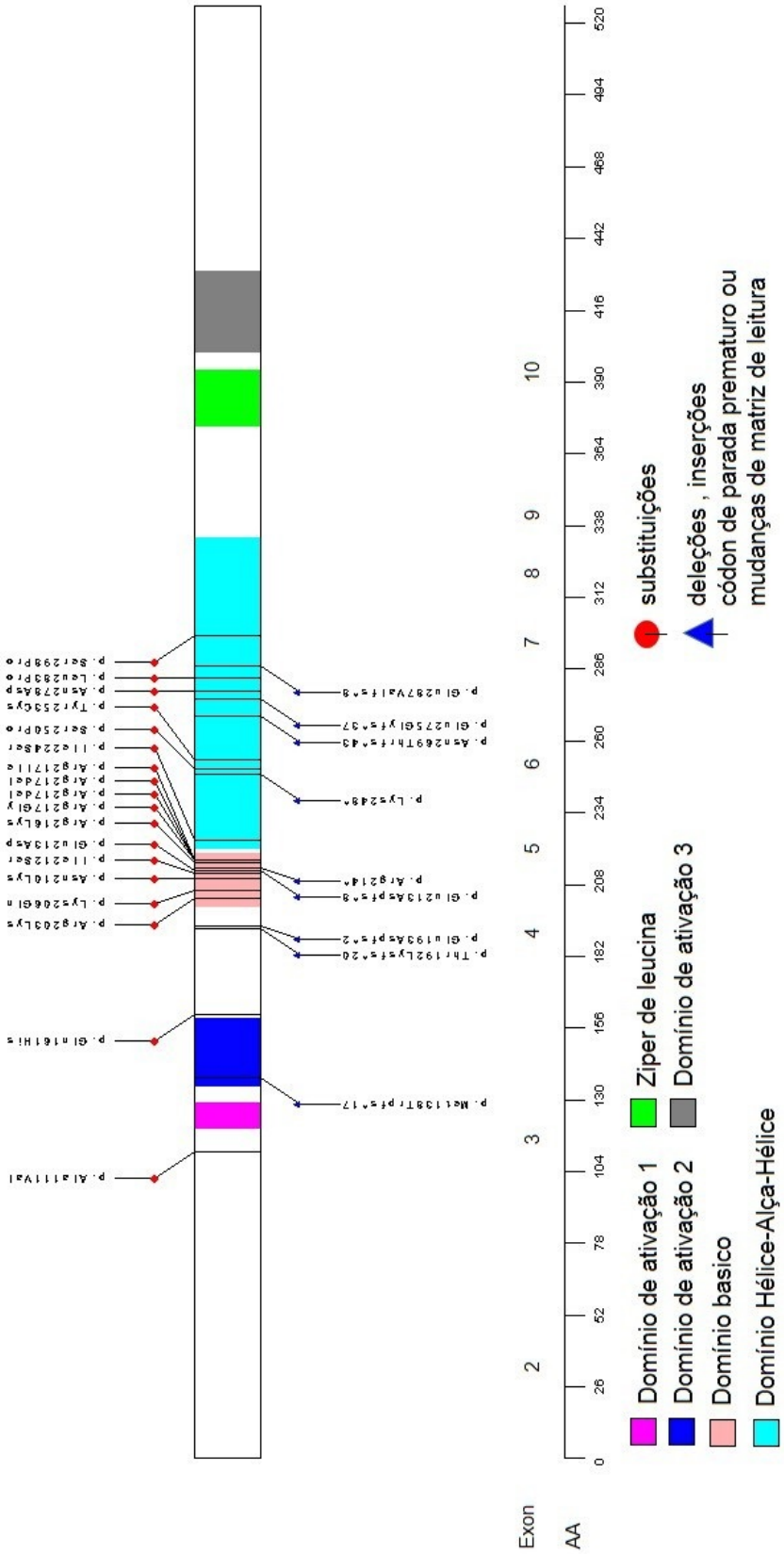

Figura 6: Principais mutações do gene *MITF* no banco de mutações da SW LOVD (http://grenada.lumc.nl/LOVD2/WS/).

1.1.3.3 Gene *SNAI2 (SLUG)*

O gene *SNAI2* esta localizado na região cromossômica 8q11.2, codifica um fator de transcrição membro da família *SNAIL zinc-finger* e codifica uma proteína de 268 aminoácidos. A proteína contem 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 homozigotos 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 a investigar um possível papel do gene *SNAI2* em humanos em pacientes com a síndrome de Waardenburg [Sánchez-Martín *et al.*, 2002].

Foram detectadas 2 deleções em homozigose em dois indivíduos com SW2 de herança recessiva. Ambos apresentaram perda auditiva neurosensorial, heterocromia sem outras características dismorficas 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].

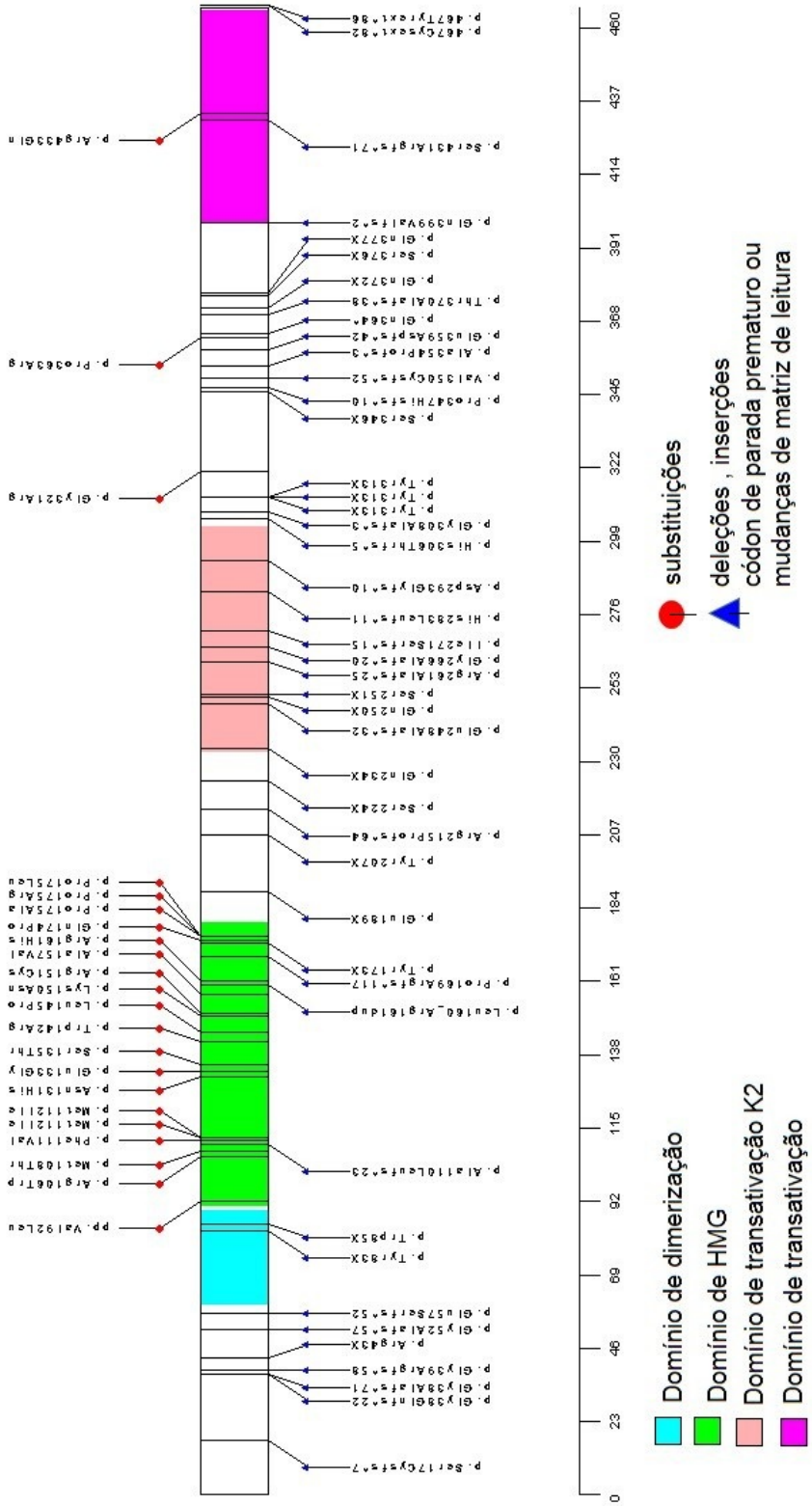

Figura 7: Localização das mutações características do gene *SOX10* no banco de dados LOVD (http://grenada.lumc.nl/LOVD2/WS/).

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].

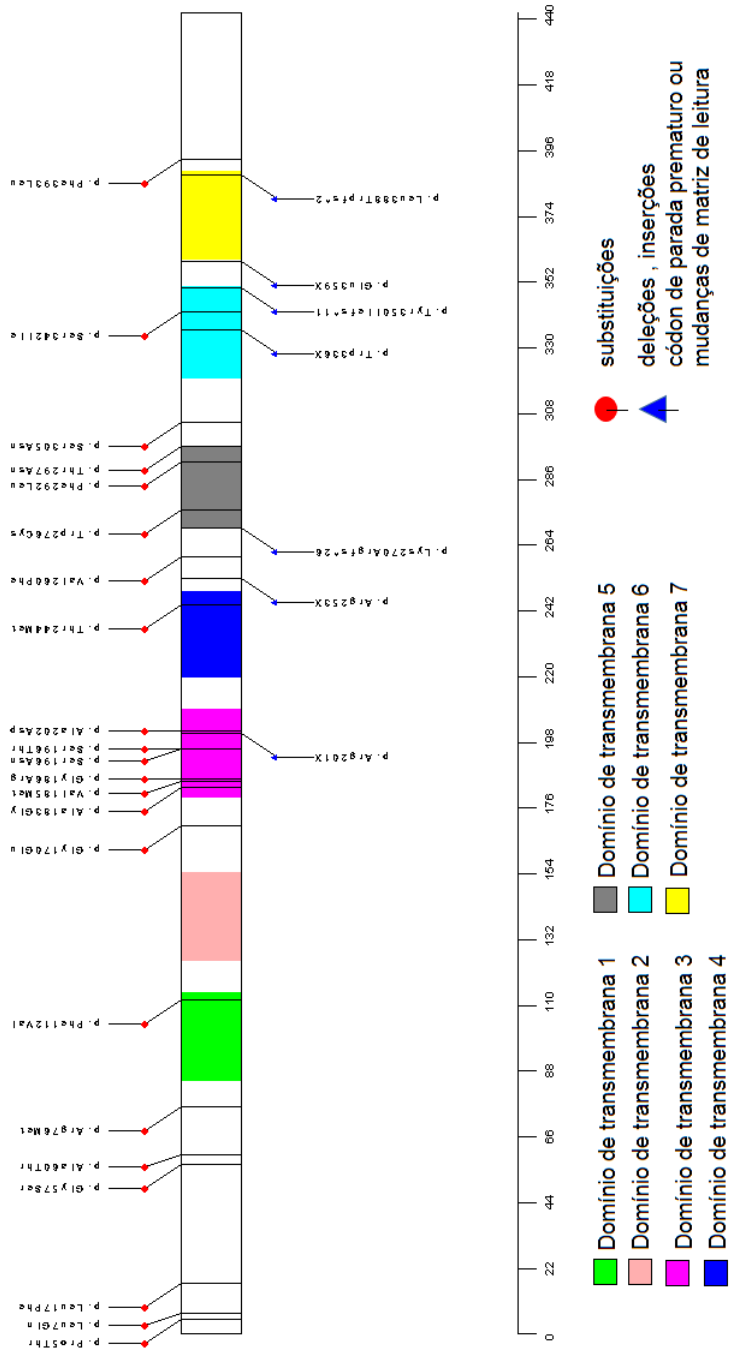

Figura 8: Localização das variações no gene *EDNRB* descritas no banco de dados LOVD (http://grenada.lumc.nl/LOVD2).

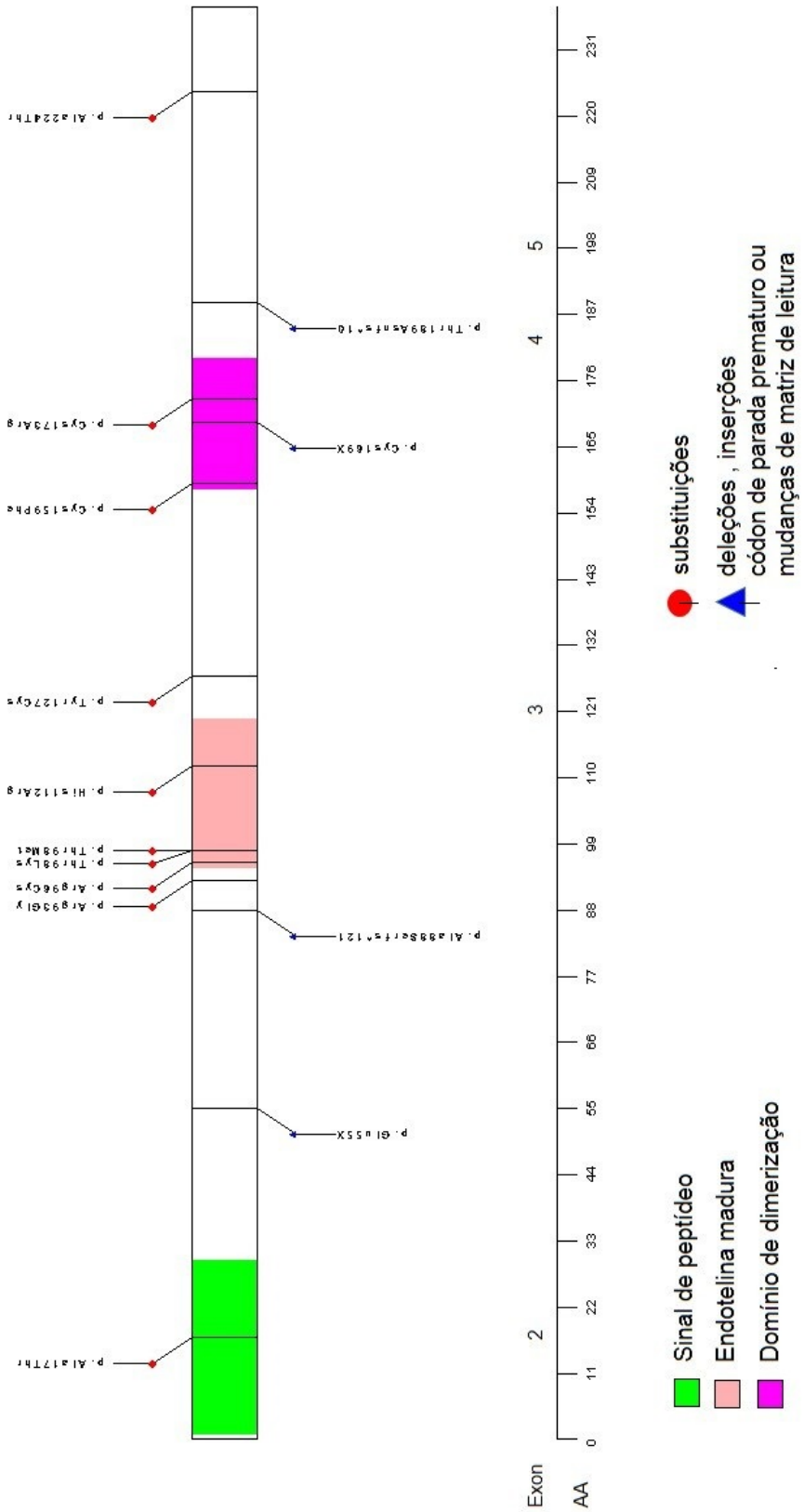

Figura 9: Localização das mutações no gene *EDN3* na SW descritas no banco de dados LOVD (http://grenada.lumc.nl/LOVD2/WS/).

1.1.3.6 Variações do número de cópias (CNV) na SW

As variações do número de cópias são alterações cromossômicas do tipo deleções, duplicações, triplicações, inserções e translocações, 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-sinônimos (nsSNVs) patogênicos 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 basados 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.

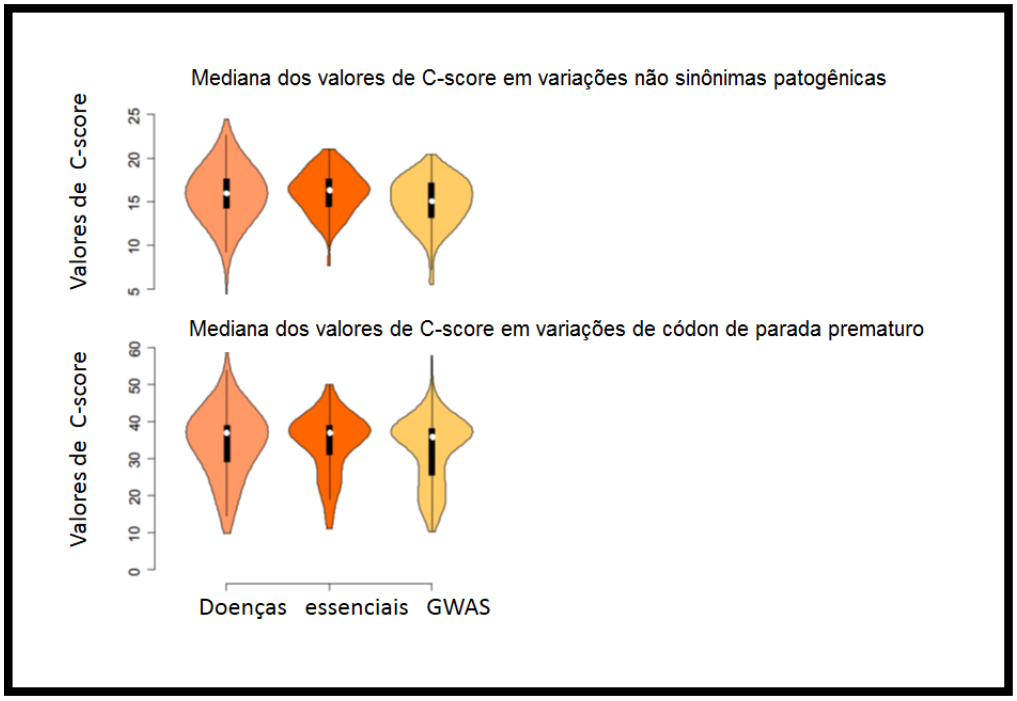

Figura 10: Medianas das pontuações de *C score* em variações não sinônimas patogênicas e códon de parada prematura [Kircher *et al.*, 2014].

2 Objetivos

2.1 Objetivo geral

O objetivo do presente estudo é a caracterização molecular de uma amostra brasileira de pacientes com SW, identificando os genes alterados e fornecendo a 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 convencional 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. Caracterização das frequências dos diferentes tipos de mutações detectadas na amostra brasileira.

5. Revisão critica das mutações descritas como patogênicas no banco de dados LOVD (*Leiden Open Variation Database*).

3 Considerações finais

O estudo molecular de uma casuística de 48 probandos com a síndrome de Waardenburg 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*. 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 questionar 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 caracterizar molecularmente 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.

4 Conclusões

A abordagem metodológica deste 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 nunca foram descritas antes.

Foram consideradas patogênicas 17 mutações (35,4%) nos 48 pacientes, 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 6 pacientes (12,5%). Nos genes *SNAI2* e *EDN3* nenhuma mutação patogênica foi encontrada.

Não detectamos correlação entre o tipo de mutação com a gravidade ou expressividade do fenótipo.

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.

Esse estudo 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.

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.* Hif1α est une nouvelle cible du facteur de transcription mitf: Implication de la cascade ampc-mitf-hif1α 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.

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.* Waardenberg 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, Mª 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 Khoueir, 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 Skoultchi, 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-Martı?n, Arancha Rodrı?guez-Garcı?a, Maria Luz Sánchez, Alberto Orfao, Teresa Flores e Isidro Sánchez-Garcı?a. 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 Rödelsperger, 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 Obersztyn, William Reardon *et al.* The mutational spectrum in waardenburg syndrome. *Human molecular genetics*, 4(11):2131–2137.

Vachtenheim e Borovanskỳ(2010) Jiri Vachtenheim e Jan Borovanskỳ. "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. Microphthalamia-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.