UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

INSTITUTO DE BIOCIÊNCIAS

MESTRADO PROFISSIONAL EM ACONSELHAMENTO GENÉTICO E GENÔMICA HUMANA

William Bertani Torres

Sequenciamento de nova geração e sua aplicação no estudo genético da síndrome de Waardenburg

Next generation sequencing and its application on the genetic study of Waardenburg syndrome

São Paulo
2019

William Bertani Torres

Sequenciamento de nova geração e sua aplicação no estudo genético da síndrome de Waardenburg

Next generation sequencing and its application on the genetic study of Waardenburg syndrome

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo, para a obtenção do Título de Mestre em Aconselhamento Genético e Genômica Humana, na Área de Biologia/Genética

Orientadora: Profa. Dra. Regina Célia Mingroni Netto

EXEMPLAR CORRIGIDO – o original encontra-se disponível no Instituto de Biociências da USP.

São Paulo
2019

Ficha catalográfica

Torres, William Bertani
Sequenciamento de nova geração e sua aplicação no estudo genético da síndrome de Waardenburg / William Bertani Torres; orientadora Regina Célia Mingroni Netto. São Paulo, 2019.
150 páginas.
Dissertação (Mestrado) – Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo. Departamento de Genética e Biologia Evolutiva.
1. Síndrome de Waardenburg. 2. Sequenciamento massivo paralelo do exoma. 3. Surdez sindrômica. 4. Distúrbios de pigmentação. 5. Sequenciamento de nova geração.

Comissão Julgadora:

_____
Prof(a) Dr(a).

_____
Prof(a) Dr(a).

_____
Prof[a]. Dra. Regina Célia Mingroni Netto
Orientadora

Dedicatória

Aos meus avós (*in memoriam*), que sempre acreditaram na educação como força transformadora da sociedade, e aos meus pais, que me proporcionaram o privilégio da educação.

Aos cientistas que, antes de mim, possibilitaram a construção do conhecimento científico-tecnológico no qual me baseio, e que sem o qual este trabalho não seria possível.

"If I have seen further, it is by standing on the shoulders of giants."

- Isaac Newton

Agradecimentos

À minha orientadora, Profª Dra. Regina Célia Mingroni Netto, pela excelente orientação, por ensinar a organizar minhas ideias e me mostrar, através dos meus erros, os desafios em se fazer ciência.

Ao Dr. Paulo Alberto Otto, por ser referência na genética humana brasileira, pelo exame clínico dos pacientes e pelo auxílio na descrição clínica dos pacientes.

Aos professores e responsáveis pelos ambulatórios do programa de Mestrado em Aconselhamento Genético e Genômica Humana, por serem referência naquilo que fazem, por darem evidência ao aconselhamento genético no Brasil e por lutarem para que essa atividade seja desempenhada por múltiplos profissionais qualificados.

Às famílias, sem as quais este estudo não seria possível.

À Dra. Eliete Pardono, pela contribuição na constituição e descrição da casuística do estudo.

Aos colegas de curso, pela amizade, pelo compartilhamento de conhecimentos e por me lembrarem de prazos e eventos importantes.

À Erika Harumi Takamoto de Camargo, por estar sempre disponível a ajudar e solucionar burocracias, mesmo quando tudo parece estar perdido.

Aos funcionários do IB, Paulo Rogério, Maraísa Sebastião, Maria Raimunda (Mara), Lígia Vieira e, em especial, Silvia Souza da Costa, pelas conversas e dicas acadêmicas, pelos auxílios e ensinamentos técnicos, e por estarem sempre disponíveis a ajudar.

Aos funcionários do Centro de Pesquisas sobre o Genoma Humano e Células-Tronco, em especial ao Dr. Guilherme Yamamoto, à Dra. Marília Scliar pelo auxílio em analisar os dados do sequenciamento do exoma e auxílio em entender problemas técnicos. Também à Daiane Franco, pelas várias corridas de sequenciamento convencional.

À Profª Dra. Carla Rosenberg, por contribuir com o *Array*-CGH de alguns pacientes.

À Dra. Karina Lezirovitz Mandelbaum, por contribuir com mais pacientes para compor este trabalho.

Aos colegas do Laboratório de Genética Humana e laboratórios vizinhos: André Bueno, Camila Martins, Larissa Antunes, Dr. Leandro Alves, Dr. Uirá Souto Melo, Dra. Lilian Kimura, Juliana Sobral, Laura Lara, Sara Ferreira, Isabela Guerdes e, em especial, Vinícius Magalhães Borges, pelo acolhimento, pelos ensinamentos fundamentais utilizados neste trabalho e pela agradável convivência diária.

Aos meus pais, pelo incessante apoio e por se dedicarem intensamente para proporcionar minha educação. Às minhas irmãs pelo carinho e por serem ponte com o meu passado. À minha família, que se prova sempre forte e unida, apesar das diferenças políticas.

Aos amigos e amigas: Julie Heejoo Bae, Ana Beatriz Ruiz, Cássio Santos, Denis Perri, Marcelo Nóvoa, Adriel Rodrigues, Gabrieli Zago e Guilherme Tavares, por serem a família que a gente escolhe, por manterem meu rosto sempre alegre e pelos momentos e histórias de vida incríveis.

Ao meu namorado, Bruno Moura Arimatea das Chagas, por carregar meu mundo em seu abraço. Por todo o seu apoio, amor, conhecimento e assistência irrestrita. Por sempre me transformar em alguém melhor.

Ao CEPID-FAPESP Centro de Pesquisa sobre o Genoma Humano e Células-Tronco pelo apoio financeiro.

Índice

RESUMO **12**

ABSTRACT **14**

I INTRODUÇÃO **16**

1. SÍNDROME DE WAARDENBURG (SW) 16
   1.1 Caracterização clínico-molecular da SW 18
      1.1.1 Síndrome de Waardenburg Tipo 1 (SW1) 19
         1.1.1.1 O gene *PAX3* 21
      1.1.2 Síndrome de Waardenburg Tipo 2 (SW2) 22
         1.1.2.1 O gene *MITF* 23
         1.1.2.2 O gene *SOX10* 25
         1.1.2.3 O gene *SNAI2* 26
         1.1.2.4 O gene *KITLG* 27
      1.1.3 Síndrome de Waardenburg Tipo 3 (SW3) 28
      1.1.4 Síndrome de Waardenburg Tipo 4 (SW4) 29
         1.1.4.1 Os genes *EDNRB* e *EDN3* 30
   1.2 Diagnóstico molecular da SW 32
2. O SEQUENCIAMENTO MASSIVO EM PARALELO 34

II JUSTIFICATIVA **37**

III OBJETIVOS **37**

IV MATERIAIS E MÉTODOS **37**

1. CRITÉRIO DE INCLUSÃO DOS PACIENTES 37
2. ASPECTOS ÉTICOS 41
3. EXTRAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DO DNA 41
4. SEQUENCIAMENTO MASSIVO PARALELO DO EXOMA 41
   4.1 Procedimento laboratorial 41
   4.2 Procedimento de bioinformática 42
   4.3 Avaliação da qualidade dos exomas 43
   4.4 Filtragem dos arquivos VCF. 43
5. ARRAY-CGH 44
6. SEQUENCIAMENTO DE SANGER 44
7. CONSTRUÇÃO DAS GENEALOGIAS 47

V RESULTADOS E DISCUSSÃO **48**

1. DESCRIÇÃO DE DEZ CASOS COM VARIANTE CAUSATIVA DETECTADA APÓS SEQUENCIAMENTO DO EXOMA 49
2. DESCRIÇÃO DOS RESULTADOS DE SEIS CASOS SUBMETIDOS À ANÁLISE DE TRIOS. 71
   2.1 Descrição conjunta dos demais cinco casos submetidos à análise de trios. 77
3. DESCRIÇÃO DOS RESULTADOS DO ESTUDO DE 14 CASOS SEM VARIANTE DETECTADA APÓS SEQUENCIAMENTO DO EXOMA. 82
   3.1 Análise de genes em comum listados como contendo variantes. 83
   3.2 Análise das variantes candidatas presentes em genes relacionados à lista das proteínas potencialmente relacionadas a SW e em genes já relacionados ao fenótipo de surdez. 92
      3.2.1 Correspondência entre genes contendo variantes candidatas filtradas com lista de genes relacionados às proteínas potencialmente relacionadas à SW. 92
      3.2.2 Correspondência entre genes contendo variantes filtradas com genes já relacionados ao fenótipo de surdez. 96

VI CONCLUSÕES **109**

VII REFERÊNCIAS **111**

VIII ANEXOS **126**

ANEXO A – TERMOS DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO 126
ANEXO B – DESCRIÇÃO DAS CINCO GENEALOGIAS SUBMETIDAS À ANÁLISE DE TRIOS. 130

ANEXO C – DESCRIÇÃO DE NOVE GENEALOGIAS DOS PROBANDOS SEM VARIANTE DETECTADA APÓS SEQUENCIAMENTO DO EXOMA.....132
ANEXO D – LISTA DOS 113 GENES CORRESPONDENTES ÀS 113 PROTEÍNAS INCLUÍDAS NA REDE CONSTRUÍDA A PARTIR DAS PROTEÍNAS DOS GENES CONHECIDOS DE SW. 135
ANEXO E – LISTA DOS 172 GENES JÁ CONHECIDOS RELACIONADOS À PERDA AUDITIVA SINDRÔMICA E NÃO SINDRÔMICA. 136
ANEXO F – DESCRIÇÃO DAS VARIANTES CANDIDATAS SELECIONADAS EM CADA INDIVÍDUO. 137

Índice de ilustrações

Figuras:

Figura 1 - Características típicas de pacientes com SW. 16
Figura 2 - Esquema que apresenta a relação fenotípica entre piebaldismo e SW, indicando o diagnóstico mais provável em função dos sinais clínicos apresentados. 18
Figura 3 - Estruturas da orelha interna. 19
Figura 4 - Parâmetros utilizados no cálculo do índice W. 20
Figura 5 - Hipótese do efeito de dose da proteína PAX3 e sua relação com os fenótipos na SW1 e SW3. 29
Figura 6 - Taxa de diagnóstico molecular nos genes já conhecidos para a SW. 34
Figura 7 - Legenda dos símbolos utilizados na representação dos heredogramas. 48
Figura 8 - Heredograma da família LGH3 49
Figura 9 - Eletroferograma com resultado do sequenciamento convencional da amostra da paciente LGH3 indicando a variante c.575_575delA no gene MITF no programa Bioedit. 50
Figura 10 - Heredograma da família LGH5. 50
Figura 11 - Eletroferograma com resultado do sequenciamento convencional da amostra da paciente LGH5 indicando a variante c.13C>T no gene SOX10 no programa Bioedit. 51
Figura 12 - Heredograma da família LGH10. 52
Figura 13 - Eletroferograma com resultado do sequenciamento convencional da amostra do paciente LGH10 indicando a variante c.275_276insCCCGT no gene SOX10 no programa Bioedit. 53
Figura 14 - Heredograma da família LGH12. 53
Figura 15 - Eletroesferograma com resultado do sequenciamento convencional da amostra do paciente LGH12 indicando a variante c.1212G>A no gene MITF no programa Bioedit. 55
Figura 16 - Heredograma da família LGH13. 55
Figura 17 - Eletroferograma com resultado do sequenciamento convencional da amostra da paciente LGH13 indicando a variante c.115A>G no gene PAX3 no programa Bioedit. 58
Figura 18 - Heredograma da família LGH15. 58
Figura 19 - Eletroferograma com resultado do sequenciamento convencional da amostra do paciente LGH15 indicando a variante c.1066C>T no gene MITF no programa Bioedit. 60
Figura 20 - Heredograma da família LGH18. 61
Figura 21 - Eletroferograma com resultado do sequenciamento convencional da amostra do paciente LGH18 indicando a variante c.910_911delAG no gene MITF no programa Bioedit. 63
Figura 22 - Heredograma da família LGH21. 63
Figura 23 - Eletroferograma com resultado do sequenciamento convencional da amostra da paciente LGH21 indicando a variante c.896_897insT no gene PAX3 no programa Bioedit. 64
Figura 24 - Heredograma da família LGH22. 65
Figura 25 - Eletroferograma com resultado do sequenciamento convencional da amostra da paciente LGH22 indicando a variante c.85_85+12delGGTAAGGGAGGGC no gene PAX3 no programa Bioedit. 66
Figura 26 - Heredograma da família LGH23. 67
Figura 27 - Eletroferograma com resultado do sequenciamento convencional da amostra da paciente LGH23 indicando a variante c.1253_1253delG no gene PAX3 no programa Bioedit. 68
Figura 28 - Heredograma da família LGH1. 71
Figura 29 - Probanda LGH1 76
Figura 30 - Etapas da filtragem de variantes. 83
Figura 31 - Rede de proteínas relacionadas às proteínas codificadas pelos genes conhecidos relacionados à SW. 93

Tabelas:

Tabela 1 - Os quatro tipos da síndrome de Waardenburg e suas características clínicas primordiais, com os genes alterados e mecanismos de herança. 17
Tabela 2 - Critérios propostos pelo consórcio Waardenburg para o diagnóstico da SW1. 20
Tabela 3 - Probandos incluídos no estudo. 38
Tabela 4 - Trios probando-pai-mãe de casos isolados incluídos no estudo. 39
Tabela 5 - Descrição clínica sumária da casuística e a relação dos testes moleculares realizados anteriormente ao início do presente estudo. 39
Tabela 6 - Primers utilizados na amplificação do gene PAX3 (NM_181459). 46
Tabela 7 - Primers utilizados na amplificação do gene MITF (NM_198159). 47
Tabela 8 - Variantes patogênicas causativas da SW encontradas em 10 probandos. 70
Tabela 9 - Variantes candidatas não herdadas encontradas na probanda LGH1. 72
Tabela 10 - Variantes filtradas não herdadas encontradas em 5 probandos submetidos à análise de trio. 79
Tabela 11 - Genes em comum contendo variantes filtradas entre os 14 indivíduos sem a variante causativa identificada nas análises preliminares. 84
Tabela 12 - Variantes candidatas encontradas em comparação com lista de genes já relacionados ao fenótipo de surdez. 98

RESUMO

A síndrome de Waardenburg (SW) é caracterizada por perda auditiva ou surdez e alterações pigmentares dos olhos, cabelo e pele. A incidência de todas as formas da SW é estimada em 1/42,000. Clinicamente foi classificada em quatro tipos. A SW tipo 1 (SW1, OMIM #193500) e a SW tipo 2 (SW2, OMIM #193510) compartilham muitas características em comum e são diferenciadas pela ocorrência de telecanto na SW1. A SW tipo 3 (SW3, OMIM #148820) é semelhante à SW1 com adição de anormalidades dos membros superiores. Na SW tipo 4 (SW4, OMIM #277580), além dos distúrbios auditivos e pigmentares, ocorre a doença de Hirschsprung (DH). A maioria dos casos de SW1 e SW3 são causados por mutações no gene *PAX3;* os casos de SW2 são causados por mutações nos genes *MITF, SOX10, EDNRB, EDN3, KITLG* e *SNAI2*. Mutações dos genes *SOX10*, *EDNRB* e *EDN3* também estão relacionadas à SW4. Apesar dos esforços na caracterização genético-molecular da SW, em todos os tipos há casos sem alteração molecular detectada. No Laboratório de Genética IB-USP há uma vasta casuística de pacientes com SW cujo material genético foi analisado por sequenciamento pelo método de Sanger dos principais genes associados à síndrome. Em alguns deles, foi realizada também a técnica MLPA (*Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification*) para excluir alterações no número de cópias nos genes já conhecidos. Essas estratégias permitiram a identificação da causa da doença em parte dos casos, restando casos sem caracterização molecular conclusiva. O objetivo desse estudo é, por meio do sequenciamento massivo paralelo do exoma, detectar alterações genéticas não detectadas pelas técnicas anteriores em genes já conhecidos da SW ou então encontrar novos genes alterados relacionados à SW. Assim, tivemos como meta contribuir com a caracterização de novos genes ou de novos mecanismos mutacionais que expliquem a SW. Os probandos de 25 famílias brasileiras com diagnóstico clínico de SW1 (8) ou SW2 (17) tiveram seu material genético analisado por meio do sequenciamento massivo paralelo do exoma. Variantes causativas da SW foram detectadas em 10 dos 25 probandos analisados, sendo quatro no gene *PAX3*, quatro no gene *MITF* e duas no gene *SOX10*. Em seis dessas famílias submetidas à análise de trio (comparação dos exomas de probando-pai-mãe), uma probanda teve a variante causativa detectada no gene *ACTG1*, o que levou à conclusão que se tratava de síndrome de Baraitser-Winter tipo 2 (OMIM #614583). Um segundo trio analisado permitiu sugerir o gene *PRAG1* como candidato a explicar a ocorrência de canície (embranquecimento dos cabelos). Nos 14 casos sem variante causativa detectada, uma análise comparativa de genes em comum contendo variantes, indicou os genes candidatos *ARHGAP23, ERBB3, P4HA3, FOXM1, GGT1* e *PRTG*, cada um alterado em três pacientes ou mais. Os genes com maior potencial de estarem associados aos fenótipos de SW, após a revisão

da literatura, são *FOXM1* e *PRTG*. Os genes contendo variantes filtradas nos 14 pacientes também foram comparados a duas listas de genes por nós construídas. A primeira lista consiste de genes obtidos a partir da construção de uma rede de proteínas relacionadas às proteínas conhecidas da SW. Essa análise comparativa evidenciou variantes nos genes *MAP3K5, EP300* e *MDM4* como candidatas. A comparação da lista de variantes dos 14 pacientes com a segunda lista, composta por todos os genes já associados ao fenótipo de surdez sindrômica e não sindrômica, evidenciou variantes nos genes *EYA1, CHD7, MYO7A, TBC1D24, COL4A5, TECTA, TNC, MYH9, COL11A2* e *DIAPH3*. Destes, os mais potencialmente relacionados aos fenótipos de SW seriam *EYA1* e *CHD7*. Estudos de segregação nas famílias são necessários para elucidar o papel desses genes como candidatos a explicar o fenótipo de SW, isoladamente ou em combinação.

ABSTRACT

Waardenburg syndrome (WS) is characterized by hearing loss or deafness and pigmentary abnormalities of eyes, hair and skin. The incidence of all types of WS is estimated at 1/42,000. It has been clinically classified in four types. WS type 1 (WS1, OMIM #193500) and WS type 2 (WS2, OMIM #193510) share many characteristics and are differentiated by the occurrence of telecanthus only in WS1. WS type 3 (WS3, OMIM #148820) is similar to WS1, with the addition of upper limb anomalies. In WS type 4 (WS4, OMIM #277580), besides hearing and pigmentary disturbances, Hirschsprung disease also occurs. Most cases of WS1 and WS3 are caused by mutations in the *PAX3*; WS2 cases are caused by mutations in *MITF, SOX10, EDNRB, EDN3, KITLG* e *SNAI2*. Mutations in the *SOX10*, *EDNRB* and *EDN3* genes are also a cause of WS4. Despite the efforts in the genetic-molecular characterization of WS, in all types there are cases with no molecular change detected. At the Laboratório de Genética IB-USP there is a large sample of patients with WS whose genetic material was previously sequenced by the Sanger method, in the main genes associated with the syndrome. In some, the MLPA (*Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification*) technique was performed to exclude copy number alterations in the known genes. These strategies allowed the identification of the cause of the disease in part of the cases, leaving some without conclusive molecular characterization. The aim of this study is, by using exome sequencing, to detect genetic changes not detected by prior techniques in known genes or to find new altered genes related to WS. Our goal was to contribute to the characterization of new genes or new mutational mechanisms that explain WS. The probands of 25 Brazilian families with clinical diagnosis of WS1 (8) or WS2 (17) had their genetic material analyzed by exome sequencing. Causative variants of WS were detected in 10 of the 25 probands analyzed, being four in *PAX3*, four in *MITF* and two in *SOX10*. In six of these families submitted to trio analysis (comparison of proband-father-mother exomes), one proband had the causative variant detected in the *ACTG1* gene, which led to the conclusion that it was type 2 Baraitser-Winter syndrome (OMIM #614583). A second analyzed trio showed the *PRAG1* gene as a candidate to explain the occurrence of canities (whiteness of hair). Among the 14 cases with no causative variant detected, a comparative analysis of genes containing variants revealed the genes *ARHGAP23, ERBB3, P4HA3, FOXM1, GGT1* and *PRTG*, each one altered in three patients or more. After literature review, those with the highest potential to be associated with WS phenotypes are *FOXM1* e *PRTG*. The genes containing filtered variants in the 14 patients were also compared to two lists of genes constructed by us. The first list consists of genes obtained from the construction of a protein network related to known WS proteins. This comparative analysis showed candidate variants in the *MAP3K5*, *EP300* and *MDM4* genes. Comparison of the variant

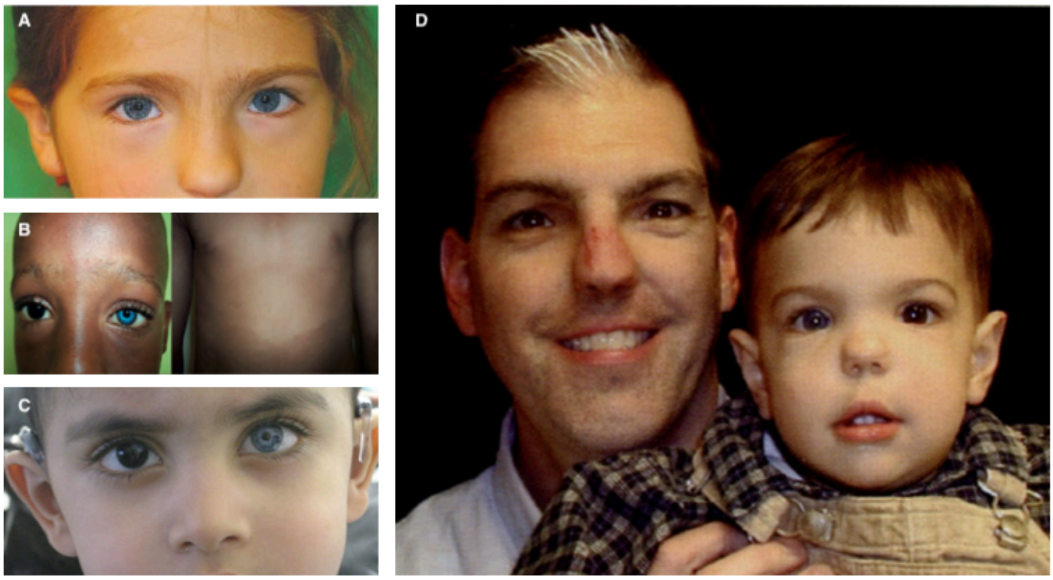
lists of the 14 patients with a second list, composed by all genes already associated with syndromic and non-syndromic hearing loss phenotype, showed variants in the *EYA1, CHD7, MYO7A, TBC1D24, COL4A5, TECTA, TNC, MYH9, COL11A2* and *DIAPH3* genes. Of these, the most potentially related to WS phenotypes would be *EYA1* and *CHD7*. Family segregation studies are needed to elucidate the role of these genes as candidates to explain the WS phenotype, either isolated or in combinations.

I Introdução

1. Síndrome de Waardenburg (SW)

Descrita pela primeira vez em 1951 (WAARDENBURG, 1951), a SW caracteriza-se por uma associação entre perda auditiva e alterações pigmentares da pele, do cabelo e olhos (Figura 1). Junto com a síndrome de Pendred e a síndrome de Usher, a SW está entre as condições hereditárias mais frequentes em pacientes com perda auditiva congênita (GETTELFINGER; DAHL, 2018; PARKER; BITNER-GLINDZICZ, 2014), explicando cerca de 2-5% desses casos (NAYAK; ISAACSON, 2003). A SW tem incidência na população holandesa de 1/212.000, mas devido à variabilidade clínica que faz suspeitar que parte dos casos fiquem sem diagnóstico, estimou-se a incidência de 1/42.000 na população geral (DOURMISHEV et al., 1999; WAARDENBURG, 1951). Hageman (1978) realizou um estudo entre quenianos, que revelou uma frequência de 1/20.000 (apud DOURMISHEV et al., 1999). Estudos mais recentes sugerem uma frequência ainda maior, de 1/8.400 (ZAMAN A, CAPPER R, 2015).

Figura 1 - Características típicas de pacientes com SW. (A) Telecanto e íris azul hipoplásica. (B) Heterocromia da íris, com uma delas de cor azul brilhante, e hipopigmentação do tórax. (C) Heterocromia da íris, telecanto e surdez. (D) Mecha branca frontal no paciente à esquerda e telecanto em ambos.



Fonte: Nayak; Isaacson (2003); Noubiap et al. (2014); Wildhardt et al. (2013).

A síndrome foi dividida em quatro tipos (Tabela 1). Os tipos 2 e 4 são subdivididos ainda, na plataforma OMIM (omim.org), com 5 e 3 códigos de entrada, respectivamente, de acordo com o gene/lócus alterado em cada tipo. Contudo, como esses subtipos não são

plenamente consagrados na literatura da SW e os fenótipos não exibem características que permitam a sua distinção, nessa dissertação optamos por utilizar a classificação em suas categorias maiores, ou seja, somente nos tipos clássicos de 1 a 4.

Tabela 1 - Os quatro tipos da síndrome de Waardenburg e suas características clínicas primordiais, com os genes alterados e mecanismos de herança.

Tipo	Mecanismo de herança	Genes/Lócus	Características clínicas principais
Tipo 1 (SW1, OMIM #193500)	AD	*PAX3* (2q35)	Presença de telecanto
Tipo 1 sem código OMIM	AD, AR	*EDNRB* (13q22)	
Tipo 2 (SW2)			Ausência de telecanto
Tipo 2A OMIM #193510	AD	*MITF* (3p13)	
Tipo 2B OMIM #600193	AD	WS2B?	
Tipo 2C OMIM #606662	?	WS2C?	
Tipo 2D OMIM #608890	AR	*SNAI2* (8q11.21)	
Tipo 2E OMIM #611584	AD	*SOX10* (22q13.1)	
Tipo 2 sem código OMIM	AD	*EDNRB* (13q22)	
	AD	*KITLG* (12q21.32)	
Tipo 3 (SW3, OMIM #148820) ou síndrome de Klein-Waardenburg	AD, AR	*PAX3* (2q35)	Presença de telecanto com defeitos de membros superiores e da cintura escapular
Tipo 4 (SW4) ou síndrome de Shah-Waardenburg			SW associada à doença de Hirschsprung
Tipo 4A OMIM #277580	AD, AR	*EDNRB* (13q22)	
Tipo 4B OMIM #613265	AD, AR	*EDN3* (20q13.2)	
Tipo 4C OMIM #613266	AD	*SOX10* (22q13.1)	

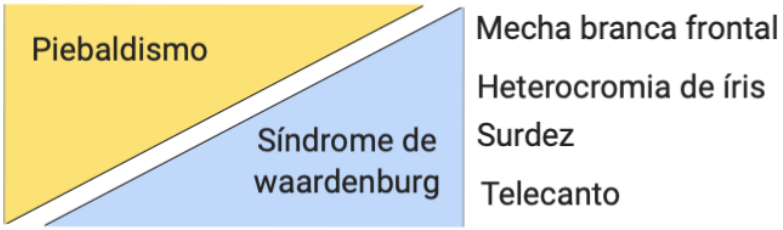
AD – autossômico dominante / AR – autossômico recessivo; SW – Síndrome de Waardenburg.

A SW exibe padrão de herança predominantemente autossômico dominante, mas já foi observada também com padrão autossômico recessivo (MORIMOTO et al., 2018; SHAH et al., 1981; WOLLNIK et al., 2003; ZLOTOGORA et al., 1995).

Em casos em que as regiões de hipopigmentação são muito extensas, deve-se considerar a hipótese diagnóstica de piebaldismo (OMIM #172800), afecção que, apesar de exibir similaridades com os distúrbios pigmentares da SW em pele, cabelos e olhos, diferencia-se dela principalmente pela ausência de telecanto e pela audição preservada (Figura 2) (DOURMISHEV et al., 1999). No entanto, o piebaldismo já foi visto em associação com a doença de Hirschsprung, assim como ocorre na SW4. Dos genes conhecidos relacionados ao

piebaldismo (*KIT* e *SNAI2*) o *SNAIL2* e o gene do ligante do receptor KIT, o *KITLG*, foram também relacionados à SW2, conforme apresentado a seguir.

Figura 2 - Esquema que apresenta a relação fenotípica entre piebaldismo e SW, indicando o diagnóstico mais provável em função dos sinais clínicos apresentados.



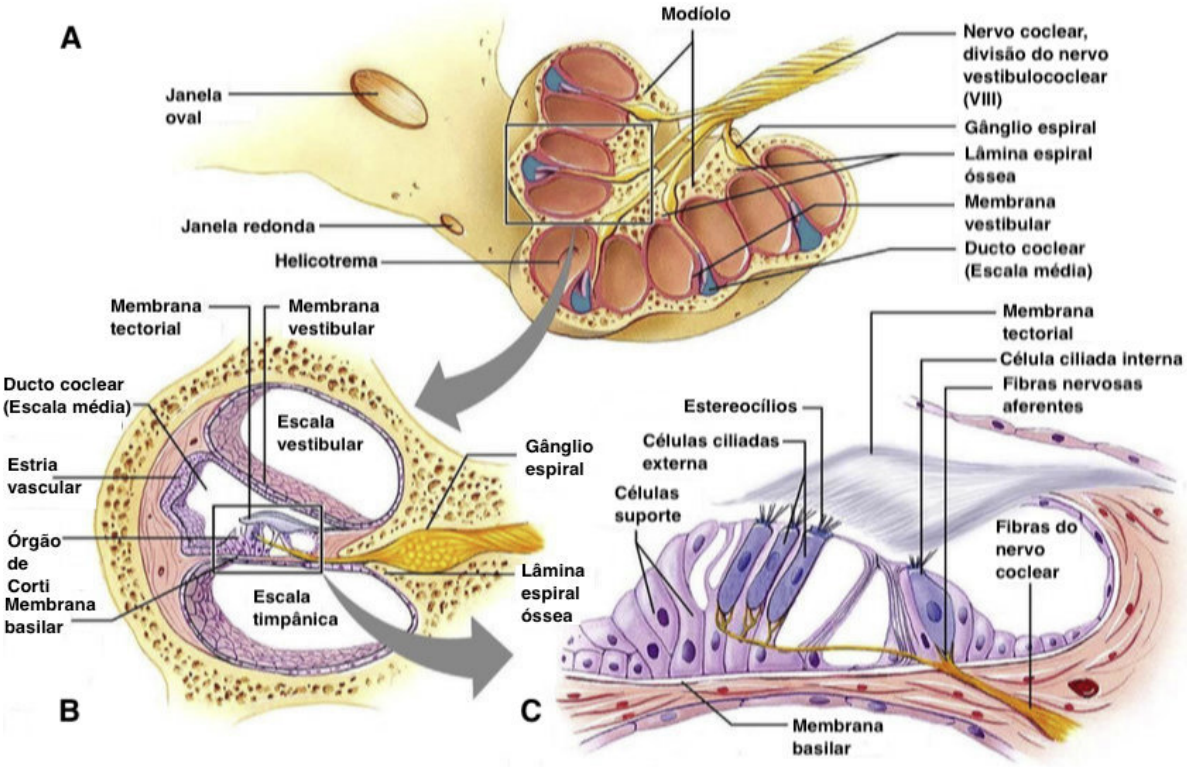
Adaptado de Dourmishev et al. (1999).

1.1 Caracterização clínico-molecular da SW

O quadro clínico de pacientes com SW resulta de defeitos nas células embrionárias da crista neural, tais como alterações na diferenciação, proliferação, sobrevivência e migração dos melanócitos derivados dessas células, que atuam durante o desenvolvimento (JONES, 1990). Grande parte das proteínas associadas ao fenótipo de SW estão justamente relacionadas com a migração de melanócitos e com o desenvolvimento das células da crista neural e da orelha interna (WATANABE et al., 2000).

Liu et al. (2016) demonstraram o papel fundamental dos melanócitos na estria vascular (EV) para o fenótipo da audição. Composta por três camadas celulares, a basal, intermediária (melanócitos) e marginal, a EV tem papel na manutenção da composição iônica da endolinfa, fluido que preenche a escala média, e na produção do potencial endococlear (PE) (Figura 3B). Já era sabido que o ambiente eletroquímico e o PE mantido pela EV são importantes na mecanotransdução do som e na amplificação coclear. No entanto, o trabalho de Liu et al. (2016) revelou que a redução ou a perda do PE afeta a sobrevivência de células ciliadas, principalmente das células ciliadas externas (Figura 3C), levando então ao fenótipo de perda auditiva neurossensorial.

Figura 3 - Estruturas da orelha interna. (A) Cóclea em corte transversal. (B) As três escalas da cóclea. (C) Órgão de Corti.



Adaptado de Morrill; He (2017).

1.1.1 Síndrome de Waardenburg Tipo 1 (SW1)

Os critérios propostos pelo consórcio Waardenburg para o diagnóstico da SW1 são divididos em critérios principais e secundários (Tabela 2). O diagnóstico clínico de SW1 é feito quando se somam: (1) a associação de dois critérios principais e um critério secundário; ou (2) a associação de um critério principal e dois secundários (FARRER et al., 1992).

A SW1 (SW1, OMIM #193500), assim como a SW2 (SW2, OMIM #193510) são as mais frequentes entre as quatro variantes e são diferenciadas clinicamente pela presença de telecanto (*distopia canthorum*) somente na SW1.

Tabela 2 - Critérios propostos pelo consórcio Waardenburg para o diagnóstico da SW1.

Critérios principais (cardinais)
• Perda auditiva neurossensorial congênita • Distúrbio de pigmentação da íris ou olhos azuis hipoplásicos ou brilhantes • Hipopigmentação do cabelo • Telecanto • Parente em primeiro grau afetado
Critérios secundários
• Manchas hipopigmentadas na pele • Sinófre • Base nasal larga e alta • Hipoplasia das asas nasais • Canície (embranquecimento dos cabelos) precoce

Adaptado de Farrer et al. (1992).

Segundo estudos antropométricos, o telecanto é um sinal presente em 95 a 99% dos indivíduos afetados pela SW1, e ausente nos indivíduos afetados pela SW2 (PARDONO et al., 2003). Devido à penetrância incompleta do telecanto, nos casos isolados a distinção entre os dois tipos da síndrome pode ser duvidosa, sendo muitas vezes classificados como tipo 2, o que evidencia a importância do estudo biométrico para uma avaliação clínica apurada (ARIAS; MOTA, 1978). Além disso, a presença de hipertelorismo em alguns indivíduos dificulta a avaliação objetiva da presença de telecanto. Para auxiliar no diagnóstico diferencial entre os tipos 1 e 2, é utilizado o índice *W* (Figura 4), que, quando maior que 1,95, indica o diagnóstico de SW1. Valores abaixo de 1,95 indicam diagnóstico de SW2 (READ; NEWTON, 1997).

Figura 4 - Parâmetros utilizados no cálculo do índice W. Os valores devem ser medidos em mm e calculados como: W = X + Y + (a/b), onde X = (2a – 0,2119c – 3,909) / c; Y = (2a – 0,2479b-3,909) / b.

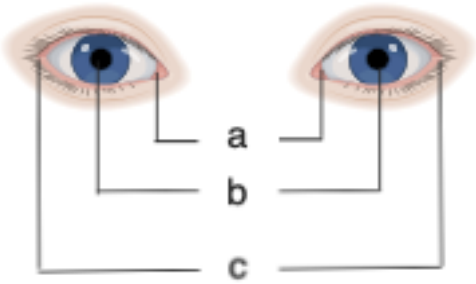


Imagem criada com BioRender.com

A prevalência de perda auditiva na SW1 é a menor dentre os quatro tipos da síndrome (SONG et al., 2016). Tanto a SW1 quanto a SW3 (SW3, OMIM #148820) são causadas quase que exclusivamente por mutações no gene *PAX3* em heterozigose, com padrão de transmissão autossômico dominante (PINGAULT et al., 2010). No entanto, um trabalho recente apresentou a hipótese de que uma mutação em homozigose no gene *EDNRB* causou a SW1 (MORIMOTO et al., 2018). Um trabalho mais recente também dá suporte à hipótese da relação do gene *EDNRB* com a gênese da SW1, no qual os autores descreveram cinco variantes em heterozigose no gene em seis indivíduos (LI et al., 2019). A haploinsuficiência é o mecanismo molecular proposto para explicar os achados clínicos na SW1, nos casos dominantes. Em geral, não há uma correlação clara entre o genótipo e fenótipo na SW1, já que os sintomas são amplamente variáveis inclusive na mesma família (READ; NEWTON, 1997).

1.1.1.1 O gene *PAX3*

O gene *PAX3* faz parte de uma família de genes relacionados a fatores de transcrição com ação durante o desenvolvimento embrionário. O principal papel de seu produto, o fator de transcrição PAX3, é manter a característica pluripotente de células-tronco, a proliferação celular e a especificação e migração de linhagens celulares. Esse fator coordena o desenvolvimento do sistema nervoso central, dos somitos, dos músculos esqueléticos e dos tipos celulares derivados da crista neural. (KUBIC et al., 2008). Sua proteína também regula a atividade do promotor do gene *MITF*, também relacionado ao desenvolvimento de melanócitos (WATANABE et al., 1998).

O gene está localizado em 2q35 e possui 10 exons. Nas plataformas Ensembl (https://www.ensembl.org/index.html) e NCBI (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/5077) constam oito isoformas de transcritos. A proteína referente ao maior transcrito (NM_181459) contém 505 aminoácidos e quatro domínios estruturais, sendo dois deles domínios de ligação ao DNA (domínio de pareamento e domínio homeótico), um octapeptídeo altamente conservado e uma região rica nos aminoácidos Ser, Thr e Pro na sua porção C-terminal, responsável por ativação transcricional (BENNICELLI et al., 1995; CHALEPAKIS; WIJNHOLDS; GRUSS, 1994; PANDYA et al., 1996)

Variantes patogênicas no gene *PAX3,* que dão origem à SW1 e SW3, já foram encontradas muito próximas umas das outras na sequência nucleotídica do gene. Em um estudo específico, foram observadas duas variantes presentes em heterozigose em dois probandos distintos, com uma distância de 10 aminoácidos entre si na proteína, que levaram a casos de

SW1 e SW3, o que evidencia que mutações muito próximas podem levar a quadros clínicos distintos (HOTH et al., 1993). Estudos relacionados à detecção molecular da SW por meio da análise de variantes de número de cópias revelaram que deleções totais ou parciais do gene *PAX3* contribuem com 10% dos diagnósticos moleculares quando não são encontradas variantes de ponto pela técnica de sequenciamento convencional em indivíduos clinicamente diagnosticados com SW1 ou SW3, sem que haja uma diferença na gravidade clínica entre pacientes portadores de deleções totais ou parciais (BOCÁNGEL et al., 2018; MILUNSKY, 2006 apud MILUNSKY et al., (2007); MILUNSKY et al., 2007; WILDHARDT et al., 2013).

1.1.2 Síndrome de Waardenburg Tipo 2 (SW2)

É caracterizada por surdez associada a defeitos pigmentares sem outras anomalias, (BONDURAND et al., 2007) sendo amplamente estabelecido que a SW2 (SW2, OMIM #193510) é distinguida da SW1 pela ausência de telecanto. Os critérios propostos pelo consórcio Waardenburg para o diagnóstico da SW2 são a associação de dois critérios principais, como mencionados na Tabela 2, excluindo-se a presença de telecanto (LIU; NEWTON; READ, 1995). A prevalência de perda auditiva na SW2 é a maior dentre os quatro tipos da síndrome (SONG et al., 2016). É tipicamente causada por mutações em heterozigose nos genes *MITF*, *SOX10*, *EDNRB* e *KITLG* (ISSA et al., 2017; PINGAULT et al., 2010; ZAZO SECO et al., 2015) e por variação no número de cópias dos genes *MITF* e *SOX10* (BOCÁNGEL et al., 2018; BONDURAND et al., 2007; HEMMI et al., 2018; LI et al., 2019; MILUNSKY et al., 2007; WILDHARDT et al., 2013). Apenas um grupo relatou deleção em homozigose no gene *SNAI2* em dois pacientes não aparentados (SÁNCHEZ-MARTÍN et al., 2002). Ainda, um estudo relacionou duas substituições intrônicas em heterozigose em sítios doadores de *splicing* do gene *MITF* como causa da SW2 em duas famílias distintas (HADDAD et al., 2011). Uma dessas variantes intrônicas foi confirmada por outro grupo que a relatou tanto em heterozigose como em homozigose em uma família com vários casos de SW2 (RAUSCHENDORF et al., 2019). Cerca de 15% dos casos são explicados por mutações no gene *MITF*, outros 15% pelo gene *SOX10*, 5-6% pelo *EDNRB* e uma pequena parcela explicada pelos genes *SNAI2* e *KITLG*. As variantes patogênicas em todos esses genes já conhecidos conseguem explicar menos da metade dos casos, restando 70 a 85% dos pacientes clinicamente diagnosticados com SW2 sem explicação molecular (BARAL et al., 2012; BONDURAND et al., 2007; ISSA et al., 2017; PINGAULT et al., 2010; READ; NEWTON, 1997; ZAZO SECO et al., 2015).

Os subtipos classificados na plataforma OMIM como 2B e 2C não tiveram seu gene encontrado. Foi postulado um possível lócus para SW2 a partir de estudos de ligação no cromossomo 1p13.3-2.1, sendo esse designado WS2B. No entanto, esse estudo é encontrado na forma de *abstract* e o trabalho completo não foi publicado (LALWANI et al., 1994 apud PINGAULT et al., 2010). Quanto ao lócus WS2C, Selicorni et al. (2002) publicaram uma translocação cromossômica entre 4p e 8p como a causa de SW2, tanto para o indivíduo que carregava a translocação na sua forma equilibrada quanto para o probando e irmã que carregavam a forma derivativa do cromossomo 8. Um irmão com a forma derivativa do cromossomo 4 apresentou a síndrome de Wolf-Hirshhorn. Devido aos achados, os autores postularam esse novo lócus em 8p23 para a SW2. Ainda, foram sequenciados, à época, nove exons do gene *MITF* em busca de variantes patogênicas e nenhuma foi encontrada (SELICORNI et al., 2002).

1.1.2.1 O gene *MITF*

O gene *MITF* codifica um fator de transcrição associado à microftalmia, com papel chave no desenvolvimento de melanócitos por meio da ligação a sequências específicas do DNA chamadas *E-boxes* e *M-boxes*. A sequência específica do DNA dos *M-boxes* é altamente conservada na região promotora dos genes de três importantes enzimas relacionadas à pigmentação, a TYR, TRP-1 e TRP-2 (HEMESATH et al., 1994). Ligada a essas sequências, a proteína MITF regula não somente a diferenciação, a sobrevivência e a proliferação dos melanócitos como também a transcrição de vários genes relacionados aos melanócitos, como o gene da tirosinase *TYR*, enzima chave no processo de melanogênese (BERTOLOTTO et al., 1998; PINGAULT et al., 2010; TACHIBANA et al., 1996; TASSABEHJI; NEWTON; READ, 1994; YASUMOTO et al., 1994).

Localizado em 3p13, sua maior isoforma do RNAm (NM_198159) contém 10 exons e a proteína correspondente, conhecida como MITF-A, 520 aminoácidos. Na plataforma Ensembl (https://www.ensembl.org/index.html) constam quatorze isoformas e na plataforma NCBI (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/4286) constam treze isoformas. Sua proteína inclui uma conformação chamada *helix-loop-helix leucine zipper* (HLH-zip), que a permite formar homodímeros ou heterodímeros que se ligam às regiões específicas do DNA através de seu domínio básico (WILDHARDT et al., 2013). Em camundongos, mutações que afetam o domínio básico produzem moléculas com efeito dominante negativo que impedem a correta ligação das proteínas não alteradas ao DNA. A pelagem dos camundongos com mutações em

heterozigose apresenta manchas brancas ou uma diluição de seu tom. Em camundongos homozigotos, a pelagem é praticamente ou inteiramente branca, ainda podendo manifestar microftalmia (HOU; PAVAN, 2008; READ; NEWTON, 1997; TACHIBANA; KOBAYASHI; MATSUSHIMA, 2003).

Em humanos, as mutações são encontradas na forma heterozigota, resultando em herança dominante e algumas mutações ocorreram *de novo* (READ; NEWTON, 1997). Um estudo recente relaciona uma variante patogênica em homozigose com o diagnóstico provável de SW4 em dois irmãos. Os pais, ambos heterozigotos, apresentavam apenas canície precoce, enquanto que os filhos apresentavam notáveis sinais da síndrome. Apesar de não apresentarem sinais claros da DH, ambos tinham constipação grave acompanhada de distensão, desconforto e dor abdominal desde a infância (PANG et al., 2019). Haddad et al. (2011) descreveu a variante intrônica c.710+5G>T em heterozigose no intron 7 como causa da SW2 em um paciente com surdez, heterocromia total com íris azul hipoplásica à direita. Outra variante intrônica em heterozigose, a c.33+5G>C no intron 1, foi também relacionada à SW2 em um paciente com surdez, heterocromia segmentar com segmentos de íris azul hipoplásica à esquerda, distúrbios de despigmentação de pele, barba e bigode e sinófre moderada. Ambas as variantes provavelmente causam *splicing* anormal do RNAm levando a proteínas truncadas, pois ocorrem nas sequências de reconhecimento de pequenas ribonucleoproteínas nucleares (snRNP) U1 e substituem a guanina conservada na posição +5 por uma timina e citosina, respectivamente. Há pouco tempo a variante c.33+5G>C foi novamente relacionada à SW2 em heterozigose e homozigose em uma família com vários casos de SW2 (RAUSCHENDORF et al., 2019). Alterações no número de cópias do gene são também, ainda que pouco expressivas, causa da SW2, e já foram relatadas deleções totais, parciais e duplicação (BOCÁNGEL et al., 2018; LI et al., 2019; MILUNSKY et al., 2007; SCHWARZBRAUN et al., 2007; WILDHARDT et al., 2013) sem que haja uma diferença na gravidade clínica entre pacientes portadores de deleções totais ou parciais (MILUNSKY, 2006 apud MILUNSKY et al., 2007). Milunsky et al. (2007) descreveu uma deleção dos exons 3-10 no gene *MITF* em um paciente inicialmente diagnosticado como SW1. O diagnóstico clínico errôneo enfatiza a heterogeneidade clínica da síndrome e a dificuldade na distinção entre SW1 e SW2 em alguns casos, ainda que seja utilizado o índice *W*.

1.1.2.2 O gene *SOX10*

O gene *SOX10* pertence à família de genes de fatores de transcrição *SOX*, cujas proteínas têm um sítio de ligação ao DNA conhecido como domínio *high-mobility group* (HMG) (BONDURAND et al., 2007). Os genes *SOX10*, *SOX8* e *SOX*9 têm íntima relação e possuem um domínio de transativação localizado na porção C-terminal da proteína e um domínio de dimerização que precede o domínio HMG (BOWLES; SCHEPERS; KOOPMAN, 2000; HONG; SAINT-JEANNET, 2005; KELSH, 2006; MOLLAAGHABABA; PAVAN, 2003; PEIRANO et al., 2000; WEGNER, 1999, 2005).

O gene está localizado em 22q13.1, sua maior isoforma (NM_006941) possui 5 exons e sua proteína contém 466 aminoácidos (PINGAULT et al., 1998). Na plataforma Ensembl (https://www.ensembl.org/index.html) constam cinco isoformas, enquanto que na plataforma NCBI (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/6663) consta apenas uma.

A proteína SOX10 é fator de transcrição chave no desenvolvimento inicial de células da crista neural, mantendo sua pluripotência (STOLT; WEGNER, 2010), sendo crucial no desenvolvimento de melanócitos e gânglios intestinais (KUHLBRODT et al., 1998), além de manter a pluripotência e diferenciação de progenitores entéricos (PINGAULT et al., 2010). O gene é expresso no começo do desenvolvimento da orelha interna (WEGNER, 1999). Em estudos em animais com o gene mutado, foi observado o fenótipo de perda auditiva (HERBARTH et al., 1998; KUHLBRODT et al., 1998) devido à ausência de células ciliadas internas e externas e de células de suporte na cóclea (TACHIBANA; KOBAYASHI; MATSUSHIMA, 2003). Em sinergia com o produto do gene *PAX3,* é capaz de especificar a linhagem de melanócitos através da sua capacidade de regular a expressão do gene *MITF* ao ligar-se ao seu promotor na forma de monômeros (BONDURAND, 2000; POTTERF et al., 2000). Outra função é a de regular a expressão do gene *EDNRB* e do proto-oncogene *RET,* que é tipicamente relacionado à doença de Hirschsprung (DH) isolada (LANG et al., 2000; YOKOYAMA; TAKEDA; SHIBAHARA, 2006; ZHU et al., 2004).

Variantes patogênicas em heterozigose explicam cerca de 15% dos casos de SW2, e variantes patogênicas em heterozigose geralmente *de novo* explicam também 50% dos casos de SW4, sendo o principal gene relacionado à manifestação do tipo 4 (PINGAULT et al., 2010), caracterizada pela associação com a DH. Deleções totais, parciais e duplicações já foram relacionadas ao fenótipo de SW2 e SW4 (BOCÁNGEL et al., 2018; BONDURAND et al., 2007; FALAH et al., 2017; HEMMI et al., 2018; LI et al., 2019; STEVENSON et al., 2018).

Ainda, Bondurand et al. (2012) descreveu uma deleção mediada por elementos *Alu* em sequências não codificantes altamente conservadas, denominadas U1 e U3, com atividade de *enhancers* do gene *SOX10*, que levou ao fenótipo de SW4. Perturbações dessas sequências altamente conservadas localizadas dentro ou longe de genes chave já foram relacionadas a diversas neurocristopatias (AMIEL et al., 2010) e têm repercussão na expressão correta da proteína durante o desenvolvimento do sistema nervoso entérico (LECERF et al., 2014). Hemmi et al. (2018) chamam atenção para a genotipagem do polimorfismo intrônico com função no *enhancer* no gene *RET* (c.73+9277T>C, rs2435357), em pacientes com variantes patogênicas em *SOX10*. A variante com o alelo T é considerada como o principal fator de suscetibilidade para a DH com baixa penetrância, com contribuição 20 vezes maior do que mutações em regiões codificantes (EMISON et al., 2005), e pode, portanto, influenciar no diagnóstico diferencial entre SW2 e SW4.

Recentemente foi hipotetizado que uma deleção em heterozigose composta com mutação de ponto está relacionada à SW2 em um feto com achados similares aos de indivíduos SW3 acometidos por variantes bialélicas no gene *PAX3*, como envolvimento de anormalidade de membros. Os achados clínicos do feto, gerado de mãe diagnosticada com SW2 e pai com sinais da síndrome e histórico familiar de SW não especificado, foram cabelos brancos, telecanto, hipertelorismo e artrogripose (contraturas articulares múltiplas) devido à falta de movimento fetal. A ausência de DH em qualquer membro da família sugere o diagnóstico de SW2. Os autores teorizam que deleções no gene *SOX10* acometem o desenvolvimento dos quatro membros, em contraponto ao envolvimento principalmente de membros superiores em variantes bialélicas no gene *PAX3* (STEVENSON et al., 2018).

1.1.2.3 O gene *SNAI2*

O gene *SNAI2* codifica o fator de transcrição snai homologo 2, conhecido também como fator de transcrição da crista neural *slug*, membro da família *SNAIL zinc-finger*, que compartilha um papel conservado evolutivamente entre invertebrados e vertebrados na formação da mesoderme (AYBAR, 2003; NIETO et al., 1994; NIETO, 2002; SÁNCHEZ-MARTÌN; GONZÁLEZ-HERRERO; SÁNCHEZ-GARCÎA, 2004; SEFTON; SÁNCHEZ; NIETO, 1998). Genes *SNAIL* são conhecidos por induzirem a chamada transição epitelial-mesenquimal, que converte células epiteliais em células mesenquimais com propriedades migratórias que irão constituir diversos tecidos durante o desenvolvimento embrionário (COBALEDA et al., 2007).

O gene está localizado em 8q11.21. Na plataforma Ensembl (https://www.ensembl.org/index.html) constam duas isoformas e na plataforma NCBI (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/6591) apenas uma. A maior (NM_003068) contém 3 exons, sua proteína correspondente possui 268 aminoácidos e três domínios: o domínio SNAG na porção N-terminal, um domínio SLUG no meio e um domínio *zinc-finger* na porção C-terminal (COBALEDA et al., 2007).

Pérez-Losada et al. (2002) observaram em camundongos deficientes em *SNAI2* um padrão de mancha branca na testa, despigmentação de pés, rabo e ventre, além de anemia e infertilidade, correlacionando a função desse gene com células-tronco melanocíticas, células-tronco hematopoiéticas e células germinativas. Devido à similaridade fenotípica desses camundongos com indivíduos com doenças relacionadas a neurocristopatias, e ao fato de os camundongos apresentarem comportamento indicativo de perda auditiva, como hiperatividade e o hábito de andar em círculos, o gene passou a ser investigado em pacientes com doenças de desenvolvimento de melanócitos, como SW e Piebaldismo.

Sánchez-Martín et al. (2002) descreveram dois pacientes não aparentados com deleções em homozigose no gene *SNAI2* levando a uma forma recessiva de SW2. Como nenhum outro grupo confirmou a relação do gene com o quadro de SW, sua relação com a síndrome é pequena.

1.1.2.4 O gene *KITLG*

O gene *KITLG* codifica uma proteína que ao se ligar ao receptor KIT desempenha função hematopoiética, melanogênica e gametogênica (ROTHSCHILD et al., 2003). A ligação promove uma sinalização que fosforila, através de MAPK, a proteína MITF. Essas proteínas fosforiladas em parte recrutam outras proteínas que interagem e modulam a atividade transcricional do gene *MITF* e em parte são degradadas através de proteassomos (HEMESATH et al., 1998; PRICE et al., 1998; SATO-JIN et al., 2008).

O gene está localizado em 12q21.32, sua maior isoforma (NM_000899) possui 10 exons e a proteína resultante da tradução da maior isoforma do RNAm possui 273 aminoácidos. Na plataforma Ensembl (https://www.ensembl.org/index.html) constam quatro isoformas do gene e duas na plataforma NCBI (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/4254).

Estudos em camundongos com mutações nos genes equivalentes ao *KITLG (kitl, sl locus)* e ao seu receptor KIT (*c-kit, locus W*) humano correlacionaram o papel desses genes com

distúrbios auditivos, devido a observações de que em camundongos homozigotos Sl^d/ Sl^d, seus melanoblastos migram e começam a se diferenciar normalmente a partir da crista neural, mas por volta de 11 dias pós-coito, essas células começam a morrer ou desdiferenciar. Os resultados do estudo sugerem que os melanoblastos não conseguem sequer chegar até a estria vascular e desaparecem antes do nascimento (STEEL; DAVIDSON; JACKSON, 1992).

Devido aos fatos de que mutações no gene *KITLG* estão relacionadas com distúrbios pigmentares, somadas à regulação do *MITF* desencadeada pela sinalização do receptor KIT, Zago Seco et al. (2015) analisaram pacientes SW2 pesquisando mutações em *KITLG* e descreveram uma mutação em heterozigose fortemente candidata a explicar um caso familial de SW2.

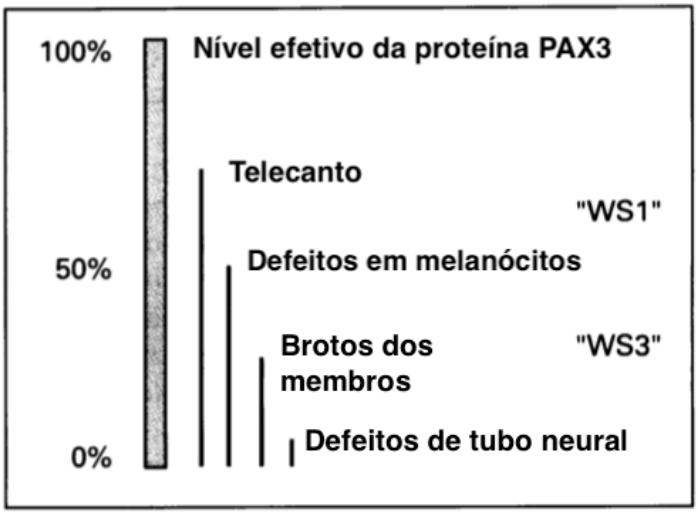
1.1.3 Síndrome de Waardenburg Tipo 3 (SW3)

Também conhecida como Klein-Waardenburg, a SW3 (SW3, OMIM #148820), mais rara e grave, é similar à SW1 em vários dos sinais e inclui defeitos de membros superiores e da cintura escapular (KLEIN, 1983; READ; NEWTON, 1997; SHEFFER, R; ZLOTOGORA, 1992). Os defeitos nos membros superiores podem variar em sua gravidade, mas geralmente se manifestam como hipoplasia musculoesquelética, deformidades de flexão nos cotovelos, punhos e mão, fusão dos ossos do carpo e sindactilia cutânea dos dedos com exceção do polegar (GOODMAN et al., 1982; KLEIN, 1947).

É também causada por mutações no gene *PAX3*. Mutações em heterozigose foram descritas indicando predomínio do padrão de herança autossômico dominante (GOODMAN et al., 1982; HOTH et al., 1993; MILUNSKY et al., 1992; SHEFFER; ZLOTOGORA, 1992; TASSABEHJI et al., 1995; TEKIN et al., 2001). Mutações em homozigose e em heterozigose composta no gene *PAX3* foram descritas em casos mais graves, indicando também padrão de herança autossômico recessivo (WOLLNIK et al., 2003; ZLOTOGORA et al., 1995).

Foi formulada a hipótese de que há um efeito de dose no gene *PAX3* para explicar os quadros clínicos, visto que o telecanto é observado quando a dosagem da proteína PAX3 está reduzida; defeitos de melanócitos são comuns em pessoas com metade da dosagem e defeitos nos membros são vistos apenas em heterozigotos com sistema de resposta ineficiente para a sinalização do *PAX3* ou em homozigotos com mutações perda de função no *PAX3* (Figura 5) (READ; NEWTON, 1997).

Figura 5 - Hipótese do efeito de dose da proteína PAX3 e sua relação com os fenótipos na SW1 e SW3.



Adaptado de Read e Newton (1997).

1.1.4 Síndrome de Waardenburg Tipo 4 (SW4)

Também conhecida como Shah-Waardenburg, a SW4 (SW4, OMIM #277580) é caracterizada pela associação de sinais de SW com a doença de Hirschsprung (DH) ou megacólon congênito (SHAH et al., 1981). Parte dos indivíduos afetados podem também manifestar a versão neurológica da SW4, apresentando neuropatias periféricas, deficiência intelectual, ataxia cerebelar e espasticidade (KAWABATA et al., 1987; TOURAINE et al., 2000), sendo classificados no termo em inglês como PCWH (neuropatia desmielinizante periférica, leucodistrofia desmielinizante central, síndrome de Waardenburg e doença de Hirschsprung) (INOUE et al., 2004).

O gene principal que explica cerca de 50% dos casos de SW4 é o *SOX10*, com mutações em heterozigose e geralmente *de novo* (BONDURAND et al., 2007; FERNÁNDEZ et al., 2014; WANG et al., 2017). O fenótipo mais grave, PCWH, é causado por mutações sem sentido e *frameshift* que acometem o último exon codificador do gene *SOX10*, o que faz o RNAm mutado escapar do processo de *nonsense-mediated mRNA decay* (NMD), resultando em efeito

dominante negativo (INOUE et al., 2004). Variantes de número de cópias já foram também relacionadas com SW4 e PCWH (BONDURAND et al., 2007; FALAH et al., 2017). Uma deleção mediada por elementos *Alu* em sequências não codificantes altamente conservadas, denominadas U1 e U3, com atividade de *enhancers* do gene *SOX10* foi também descrita como a causa para a SW4 (BONDURAND et al., 2012).

Existe também uma associação do fenótipo de SW4 com outros dois genes relacionados à via da endotelina, o *EDNRB* e o *EDN3*, que juntos explicam cerca de 20 a 30% dos casos, com mutações em heterozigose e homozigose em ambos, restando cerca de 15-35% dos casos sem explicação molecular (BONDURAND et al., 2007, 2012).

1.1.4.1 Os genes *EDNRB* e *EDN3*

Endotelinas são peptídeos compostos por 21 aminoácidos e são derivados de precursores chamados pré-proendotelinas (KURIHARA; KURIHARA; NAGAI; 1999).

O gene *EDN3* codifica uma pré-proendotelina, de 230 aminoácidos, que após dois processos de clivagem dará origem à molécula biologicamente ativa ET3 (BLOCH et al., 1989). O receptor codificado pelo *EDNRB* (ETB) e seu ligante ET3 codificado primordialmente pelo *EDN3* promovem uma sinalização que é importante para a sobrevivência, proliferação, migração e diferenciação de melanoblastos na via dorso-lateral durante o desenvolvimento (LAHAV, 2005; SALDANA-CABOVERDE; KOS, 2010).

O gene *EDN3* está localizado em 20q13.2, sua maior isoforma (NM_207034) possui 5 exons e sua proteína 238 aminoácidos (GOPAL RAO; LÖFFLER; HANSMANN, 1991). Na plataforma Ensembl (https://www.ensembl.org/index.html) constam seis isoformas e na plataforma NCBI (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/1908) constam cinco.

O gene *EDNRB* codifica o receptor tipo B da endotelina (ETB), que possui afinidade por todas as três endotelinas (ET1, ET2, ET3), mas principalmente à ET3, e tem seu efeito mediado por uma proteína G acoplada (MCCALLION; CHAKRAVARTI, 2001).

A diferenciação prematura de neuroblastos entéricos é prevenida pela ligação da ET3/ETB (BONDURAND, 2006; NAGY; GOLDSTEIN, 2006), que também influencia na expressão e nas modificações pós-tradução da proteína MITF em culturas de melanócitos humanos (SATO-JIN et al., 2008). Experimentos em camundongos dão suporte à sua relação fenotípica com os humanos afetados, pois apresentam DH e pelagem branca, cujo

acometimento é dependente da dose de *EDNRB* expresso (BAYNASH et al., 1994; HOSODA et al., 1994; MCCALLION; CHAKRAVARTI, 2001).

O gene *EDNRB* está localizado em 13q22, sua maior isoforma (NM_001201397) possui 8 exons e sua proteína 532 aminoácidos (KIM et al., 2006). Na plataforma Ensembl (https://www.ensembl.org/index.html) constam oito isoformas e na plataforma NCBI (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/1910) constam quatro.

Recentemente, Morimoto et al. (2018) descreveram uma mutação em homozigose no *EDNRB* causando SW1, mas sem associação com DH. Os autores hipotetizaram que a falta desse fenótipo é devida à ausência de mutações em genes típicos para a manifestação da DH, como o *RET*. Li et al. (2019) descreveram cinco mutações em heterozigose causando também SW1.

Mutações em homozigose e em heterozigose já foram descritas em SW4 tanto no gene *EDNRB* como no *EDN3*, sendo as em homozigose as mais frequentemente descritas na literatura (ATTIÉ et al., 1995; EDERY et al., 1996; HADDAD et al., 2011; HOFSTRA et al., 1996; ISSA et al., 2017; PINGAULT, 2001; PINGAULT et al., 2002, 2010, PUFFENBERGER et al., 1994a, 1994b; SYRRIS; CARTER; PATTON, 1999).

Em virtude da sobreposição de fenótipos de indivíduos heterozigotos com mutações no *EDNRB* e *EDN3* com indivíduos SW2, Pingault et al. (2010) analisaram esses genes em 30 pacientes com SW2 e encontraram um paciente com mutação em heterozigose no gene *EDNRB* em uma família, com três afetados em duas gerações. Similarmente, Issa et al. (2017) encontraram mutações em heterozigose no *EDNRB* em 6 pacientes com SW2.

Mutações nesses dois genes explicam de 5-6% dos casos de SW2, e cerca de 20-30% dos casos de SW4 (ISSA et al., 2017; PINGAULT et al., 2010), além do único caso em homozigose relacionado à SW1 descrito por Morimoto et al. (2018) e das outras cinco variantes em heterozigose também relacionadas à SW1 descritas por Li et al. (2019).

O modo de transmissão para os dois genes é tido como complexo, nem completamente recessivo, nem completamente dominante (PINGAULT, 2001; PINGAULT et al., 2010), pois indivíduos com SW4 já foram descritos com variantes em heterozigose e parentes de indivíduos SW4 homozigotos com variantes em heterozigose não são sempre assintomáticos. Puffenberger et al. (1994b) demonstraram que indivíduos com a mesma variante em homozigose e em

heterozigose no gene *EDNRB* manifestavam a DH em taxas distintas de 74% e 21% respectivamente. De forma análoga para o gene *EDN3*, Viñuela et al. (2009) descreveram um caso de SW4, nascido de pais consanguíneos, causada por uma variante patogênica em homozigose. O probando apresentava notáveis sinais da SW4, como mecha branca frontal, íris azuis hipoplásicas, perda auditiva profunda, manchas despigmentadas na pele e aganglionose colônica total. A mesma variante estava presente em heterozigose no pai e avó paterna e ambos apresentaram apenas mecha branca frontal. Os autores não conseguiram definir se a manifestação da mecha branca frontal em heterozigotos era causada por haploinsuficiência ou por efeito dominante negativo. É aceito que mutações em homozigose levam a quadros mais graves e as em heterozigose acarretam uma ou mais características da doença com penetrância incompleta ou reduzida (PINGAULT et al., 2010).

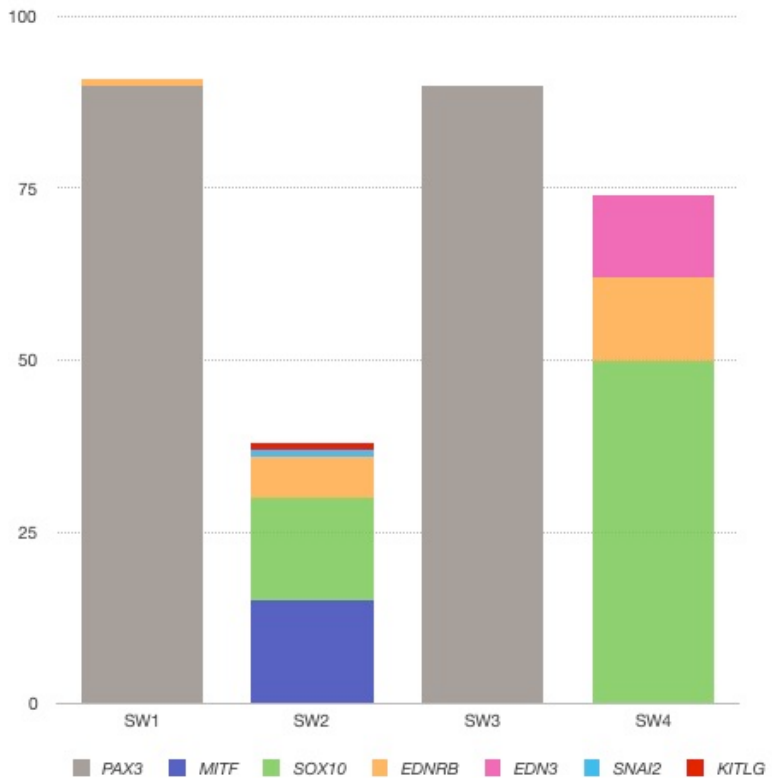
1.2 Diagnóstico molecular da SW

Como visto, os produtos dos vários genes relacionados à SW estão, de forma direta ou indireta, associados à proteína MITF, seja por se tratarem de fatores de transcrição que regulam sua expressão (*PAX3*, *SOX10, SNAI2* e o próprio *MITF*) ou por se tratarem de moléculas relacionadas a vias sinalizadoras (*EDNRB*, *EDN3* e *KITLG*) que influenciam sua expressão (HOU; PAVAN, 2008). Assim, os fenótipos de perda auditiva e hipopigmentação provavelmente resultam, em última instância, de haploinsuficiência da proteína MITF via comprometimento das vias de transcrição que regulam sua expressão ou do comprometimento das vias de sinalização que modulam sua expressão ou de mutações que afetam diretamente seu gene (SATO-JIN et al., 2008).

Mesmo assim, uma grande parcela de pacientes com SW ficam sem diagnóstico molecular. De forma resumida e ilustrada (Figura 6), tanto na SW1 como na SW3 encontram-se as maiores taxas de detecção, onde 90% dos casos de SW1 e SW3 são causados por variantes patogênicas em heterozigose no gene *PAX3* (PINGAULT et al., 2010). Deleções totais ou parciais do gene *PAX3* já foram descritas como causa da SW1 e SW3 e podem representar cerca de 10% dos casos sem variantes patogênicas em ponto identificadas (MILUNSKY et al., 2007). Apenas uma variante patogênica em homozigose e outras cinco em heterozigose no gene *EDNRB* foram também relacionadas à SW1 (LI et al., 2019; MORIMOTO et al., 2018). Na SW2, tipo com menor taxa de detecção, explicam o quadro 15% das variantes patogênicas em *MITF*, 15% em *SOX10*, 5-6% em *EDNRB* e um valor pouco expressivo de alterações em *KITLG* e *SNAI2* (único por mecanismo recessivo), somando então menos de 50% de detecção para o

tipo 2 (BARAL et al., 2012; BONDURAND et al., 2007; ISSA et al., 2017; PINGAULT et al., 2010; READ; NEWTON, 1997; ZAZO SECO et al., 2015). São também causa da SW2, ainda que pouco expressivas, variações no número de cópias dos genes *MITF* e *SOX10* (BOCÁNGEL et al., 2018; BONDURAND et al., 2007; HEMMI et al., 2018; LI et al., 2019; MILUNSKY et al., 2007; WILDHARDT et al., 2013). Duas variantes intrônicas no gene *MITF* foram relacionadas também à SW2, uma delas tanto em homozigose quanto em heterozigose (HADDAD et al., 2011; RAUSCHENDORF et al., 2019). Na SW4, variantes patogênicas em heterozigose no gene *SOX10* representam a causa de 50% dos casos, outros 20 a 30% tem variantes patogênicas em heterozigose e homozigose nos genes *EDNRB* e *EDN3*, permanecendo sem detecção de 15 a 35% dos casos de SW4 (BONDURAND et al., 2007, 2012; FERNÁNDEZ et al., 2014; PINGAULT et al., 2010; WANG et al., 2017). Um estudo recente hipotetizou a relação entre uma variante patogênica em homozigose do gene *MITF* e a causa provável de SW4 em dois irmãos (PANG et al., 2019). Como o achado é muito recente, não foi confirmado por outros grupos e os sinais de DH não foram confirmados (apenas relatos de constipação), não incluímos o gene *MITF* como causa da SW4 na Figura 6. Variantes de número de cópias também já foram relacionadas com SW4 e PCWH (BONDURAND et al., 2007, 2012; FALAH et al., 2017).

Figura 6 - Taxa de diagnóstico molecular nos genes já conhecidos para a SW.



Adaptado e atualizado de Pingault et al. (2010).

2. O sequenciamento massivo em paralelo

A técnica de sequenciamento desenvolvida por Frederick Sanger na década de 70 (SANGER et al., 1977; SANGER; NICKLEN; COULSON, 1977), automatizada nos anos 90, e que teve predominância até meados dos anos 2000, é hoje chamada de sequenciamento convencional (HEATHER; CHAIN, 2016). Como o sequenciamento convencional abrange fragmentos pequenos do genoma humano, o sequenciamento de genes relacionados a uma doença, distúrbio ou fenótipo era feito visando a análise de uma região candidata. Uma região era considerada candidata por causa da presença de genes já estabelecidos na literatura, que, quando alterados, produzem quadros condizentes com o fenótipo do indivíduo. Também podem ser consideradas candidatas regiões mapeadas por estudos de ligação ou regiões com alterações citogenéticas presentes em pacientes com o fenótipo que se deseja investigar. Algumas doenças ou grupos de doenças e fenótipos, no entanto, podem apresentar mais de um gene candidato, esses podendo conter vários exons, o que torna o sequenciamento convencional trabalhoso, demorado e custoso. Ainda, em casos onde genes candidatos já foram analisados ou não se tem

indício de quais genes buscar, o sequenciamento de nova geração (NGS – *Next Generation Sequencing*) é a técnica mais indicada, pois possibilita o sequenciamento de vários genes ao mesmo tempo. A técnica de NGS pode ser aplicada de modo a ser direcionada a um painel de genes relacionados a um determinado grupo de doenças, como por exemplo, doenças neuromusculares, ou relacionados a um determinado fenótipo, como a surdez; pode ser aplicada como um painel "clínico", quando é direcionada para investigar genes já relacionados a fenótipos e doenças em geral; também pode ser aplicada sob a forma de sequenciamento massivo em paralelo do exoma, onde as regiões codificantes (exons) de praticamente todos os genes são sequenciados; pode ser ainda utilizada na sua forma mais abrangente, como ocorre no sequenciamento total do genoma.

Como mencionado anteriormente, os fenótipos de cada um dos 4 tipos da SW podem ser clinicamente distintos, salvo raros casos com alta heterogeneidade fenotípica, o que permite uma priorização de quais genes averiguar primeiro para cada tipo da síndrome (Figura 6), caso o método escolhido seja o sequenciamento convencional de Sanger. No entanto, mesmo após essa abordagem, ainda assim há uma parcela de afetados que ficam sem diagnóstico molecular. O NGS é possivelmente a técnica de melhor relação custo benefício a ser aplicada nesses casos, pois permite analisar simultaneamente diversos genes com potencial de explicar o quadro clínico.

Desde o surgimento da técnica de sequenciamento massivo em paralelo do exoma, *Whole Exome Sequencing* (WES) em inglês, a busca por alterações gênicas foi revolucionada. A técnica permite sequenciar todos os éxons dos genes codificadores de proteína simultaneamente, podendo identificar muitas variantes em relação ao genoma de referência, fato que amplia o poder de encontrar a causa para o fenótipo que se busca, ao mesmo tempo em que se diminui o tempo gasto e o custo, quando comparado a estratégias antigas de busca gene a gene para mutações específicas ou genes candidatos.

Contudo, a filtragem dessas variantes é um trabalho meticuloso, pois envolve encontrar a variante que explica o fenótipo dentre milhares de variantes. Apesar desse trabalho não ser trivial, a técnica demonstrou grande poder na descoberta de novos genes relacionados a fenótipos mendelianos. Juntamente com a aplicação do sequenciamento total do genoma [*Whole Genome Sequencing* (WGS)], o ritmo de descobertas de novos genes para fenótipos mendelianos passou de uma média de 166 ao ano, entre 2005 e 2009, para uma média de 236

ao ano entre 2010 e 2014, com o advento das técnicas de NGS. Desde sua introdução em 2010, o ritmo de descobertas aumentou substancialmente, tendo chegado a triplicar o número de genes descobertos quando comparado aos métodos convencionais já em 2013 (CHONG et al., 2015). A taxa diagnóstica exata é, no entanto, dependente da população que é testada, da disponibilidade de outros membros da família, da definição de uma probabilidade alta de um diagnóstico, i.e, uma hipótese diagnóstica forte, e é também dependente do órgão/sistema afetado (ADAMS; ENG, 2018).

Além do aumento na taxa diagnóstica, outro ponto positivo da técnica é a possibilidade de reanalisar os dados já obtidos, já que tanto os métodos analíticos como os bancos de dados de variantes se tornam desatualizados rapidamente devido ao ritmo acelerado de novas descobertas genômicas. A reanálise de dados de NGS é positiva também no sentido de que não expõe o paciente a exames adicionais e invasivos. Um estudo com dados já analisados de 1,133 trios (dados do probando afetado e pais normais) conseguiu aumentar o diagnóstico de 27% em 2014 para 40% em 2017, após reanálise dos resultados com dados atualizados obtidos de bancos populacionais (WRIGHT et al., 2018).

Além disso, a técnica de NGS permite a reavaliar o fenótipo através da combinação de seus resultados e da análise de segregação, fenômeno conhecido como fenotipagem reversa, por meio do qual variantes sugestivas encontradas a partir dessas análises sugerem um fenótipo que pode não ter sido avaliado a priori, indicando uma reavaliação clínica retrospectiva. Da mesma forma, essa característica da técnica pode auxiliar na identificação de fenótipos que ainda virão a se expressar no indivíduo (FERNANDEZ-MARMIESSE; GOUVEIA; COUCE, 2018).

Ainda assim, menos de 50% das doenças mendelianas são molecularmente "solucionadas" após o sequenciamento do material de famílias afetadas, sendo que cerca de 3000 doenças mendelianas continuam sem causa genética conhecida (CHONG et al., 2015). Algumas das estratégias utilizadas para se encontrar variantes patogênicas em genes relacionados a doenças é a análise do exoma de grupos de pacientes com a mesma característica clínica, na tentativa de se encontrar um gene em comum, ou então a análise do exoma de pacientes, casos isolados na família, em comparação ao exoma de seus pais (análise de trios). Essas estratégias de análise ajudam a reduzir o número de variantes candidatas a explicar os quadros. Essa última estratégia tem mostrado um rendimento de diagnóstico maior do que a primeira, com uma redução de 10 vezes no número de variantes candidatas (FERNANDEZ-

MARMIESSE; GOUVEIA; COUCE, 2018; WRIGHT et al., 2015). No entanto, ela requer rigorosa avaliação do fenótipo clínico de todos os indivíduos testados da família, pois se baseia no princípio de que os genitores não são afetados (ADAMS; ENG, 2018).

II Justificativa

A motivação para esse estudo é a importância da caracterização genético-molecular em pacientes com SW. A disponibilidade de uma casuística que, ainda após análises pelas técnicas de sequenciamento de Sanger e MLPA (*Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification*) permaneceu sem explicação molecular para o quadro clínico, nos levou ao objetivo dessa pesquisa, que é identificar as alterações genéticas que expliquem a síndrome de Waardenburg nesses indivíduos. Esse estudo tem potencial para revelar genes novos que causam a SW, mecanismos mutacionais novos ou atípicos, ou até mesmo revelar mutações nos genes conhecidos de SW e que não foram captadas pelas técnicas anteriormente utilizadas no laboratório, como o sequenciamento de Sanger e MLPA. Esses resultados podem colaborar com a melhor compreensão das bases moleculares da SW, com potencial impacto no aconselhamento genético.

III Objetivos

O objetivo deste estudo é identificar as alterações moleculares que explicam a ocorrência da SW por meio da tecnologia de sequenciamento massivo paralelo do exoma (WES) aplicada a uma casuística de pacientes do Laboratório de Genética Humana do IB-USP. Pretendemos com este estudo, além de identificar as alterações que possam ocorrer nos genes já conhecidos relacionados à SW, revelar novos mecanismos mutacionais ou novos genes que possam estar implicados na gênese da síndrome.

IV Materiais e Métodos

1. Critério de inclusão dos pacientes

Foram incluídos nesse estudo 25 probandos com suspeita clínica da síndrome de Waardenburg, que apresentavam pelo menos duas características da síndrome.

Nossa amostra coincide parcialmente com as descritas nos artigos de Bocangél et al. (2018) e Pardono et al. (2003), na dissertação e na tese de Pardono (1999, 2005) e na dissertação de Bocangél (2014). A maioria dos pacientes tiveram suas amostras previamente submetidas ao sequenciamento convencional pelo método de Sanger dos genes *PAX3*, *MITF*, *SOX10*,

EDNRB, *EDN3* e *SNAI2*. Parte das amostras foram também previamente submetidas à técnica de MLPA (*Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification*), com *kit* específico que inclui sondas dos genes *PAX3*, *MITF* e *SOX10* (*kit* SALSA P186-B1), nos estudos citados acima. Apenas a amostra de um paciente havia passado por sequenciamento de nova geração de um painel desenvolvido para análise para genes de surdez que incluía os genes conhecidos da SW, durante o desenvolvimento do mestrado de (DIAS, 2018).

Em todos esses casos, as técnicas aplicadas não haviam revelado as mutações causativas. Novos pacientes com suspeita da síndrome de Waardenburg foram incluídos no estudo, mesmo sem que tivesse sido realizada a avaliação molecular prévia descrita acima. A avaliação clínica dos pacientes que já tinham passado por análises prévias foi feita sob a supervisão do Dr. Paulo Alberto Otto utilizando uma ficha de anamnese específica (Pardono, 2005). Pacientes mais recentes tiveram a anamnese genética realizada pela Profa. Dra. Regina Célia Mingroni Netto e passaram pela avaliação clínica de geneticistas do Centro de Pesquisa sobre o Genoma Humano e Células-Tronco (CEGHCT) (Dr. Paulo Alberto Otto, Dr. Fernando Kok, Dra. Débora Romeo Bertola). Amostras de três probandos da casuística foram encaminhadas por colaboradora, a geneticista Dra. Karina Lezirovitz Mandelbaum, do Laboratório de Otorrinolaringologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

Dentre os 25 casos, 14 são casos isolados e 11 são familiais (Tabela 3). Foram também colhidas amostras de um total de 12 genitores, que contribuíram para a constituição de 6 trios de amostras, (probando-pai-mãe) (Tabela 4). A Tabela 5 contém a descrição clínica sumária de cada probando e uma relação dos testes moleculares realizados anteriormente ao início do estudo.

Tabela 3 - Probandos incluídos no estudo.

Casos isolados		
SW1	SW2	TOTAL Isolados
5	9	14
Casos familiais		
SW1	SW2	TOTAL Familiais
3	8	11

SW1 – Síndrome de Waardenburg tipo 1; SW2 – Síndrome de Waardenburg tipo 2.

Tabela 4 - Trios probando-pai-mãe de casos isolados incluídos no estudo.

Casos Isolados com Genitores (Trios)		
Probandos		TOTAL TRIOS
SW1	SW2	6
3	3	

SW1 – Síndrome de Waardenburg tipo 1; SW2 – Síndrome de Waardenburg tipo 2.

Tabela 5 - Descrição clínica sumária da casuística e a relação dos testes moleculares realizados anteriormente ao início do presente estudo.

Código	Isolado/Familial	Tipo	Sumário das características clínicas	Sequenciamento prévio	MLPA
LGH1	Isolado	1?	Surdez profunda bilateral, anomalia de Mondini, hiperplasia medial de sobrancelhas, tendência a telecanto (DII acima do percentil 97,5; DIE e distância bipupilar aumentadas), índice *W* = 2,02, estrabismo divergente, íris azuis, ponte nasal alta e larga.	*PAX3, MITF, SOX10, SNAI2, EDN3, EDNRB*	+
LGH2	Isolado	2	Surdez neurossensorial profunda bilateral, sinófre discreta, íris azuis hipoplásicas.	*PAX3, MITF, SOX10, SNAI2, EDN3, EDNRB*	+
LGH3	Isolado	2	Mecha branca frontal (primeiros meses de vida), surdez neurossensorial profunda bilateral, *W* = 1,74, íris azuis hipoplásicas.	*PAX3, MITF, SOX10, SNAI2, EDN3, EDNRB*	+
LGH4	Isolado	2	Canície precoce, surdez neurossensorial profunda bilateral, sinófre discreta, *W* = 1,81, heterocromia parcial à direita (íris D castanha com porção superior azulada e E azul), vitiligo pronunciado e manchas cutâneas hiperpigmentadas.	*PAX3, MITF, SOX10, SNAI2, EDN3, EDNRB*	+
LGH5	Isolado	2	Mecha branca frontal, surdez profunda unilateral à D, sinófre, *W* = 1,58, heterocromia total (íris D azul hipoplásica e E castanha).	*PAX3, MITF, SOX10, SNAI2, EDN3, EDNRB*	+
LGH6	Isolado	1	Mecha branca frontal, canície precoce, surdez neurossensorial profunda à D, sinófre, telecanto, *W* = 2,51, heterocromia parcial bilateral da íris (olhos predominantemente castanhos com manchas azuis) e hipoplasia das asas nasais.	*PAX3, MITF, SOX10, SNAI2, EDN3, EDNRB*	+
LGH7	Isolado	2	Canície frontal, surdez neurossensorial profunda bilateral, *W* = 1,31, íris azuis hipoplásicas com manchas castanhas (heterocromia atípica).	*PAX3, MITF, SOX10, SNAI2, EDN3, EDNRB*	+
LGH8	Isolado	2	Mecha branca frontal (aos 20 anos de idade), surdez moderada (30 a 40% de perda auditiva) mista (D) e condutiva (E), sinófre, *W* = 1,82.	*PAX3, MITF, SOX10, SNAI2, EDN3, EDNRB*	+
LGH9	Isolado	2	Mecha branca frontal, surdez profunda bilateral, heterocromia parcial à D, íris azul hipoplásica, mancha hipocrômica no dorso da mão direita.	*PAX3, MITF, SOX10, SNAI2, EDN3, EDNRB*	+

MLPA - *Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification*; DII – Distância intercantal interna; DIE – Distância intercantal externa; W – Índice *W*; D – Direita; E – Esquerda.

Tabela 5 (continuação)– Descrição clínica sumária da casuística e a relação dos testes moleculares realizados anteriormente ao início do presente estudo.

Código	Isolado/Familial	Tipo	Sumário das características clínicas	Sequenciamento prévio	MLPA
LGH10	Isolado	2	Surdez neurossensorial profunda bilateral, íris azuis hipoplásicas e *W* = 1,46.	*PAX3, MITF, SOX10, SNAI2, EDN3, EDNRB*	+
LGH11	Isolado?	1	Surdez bilateral congênita, heterocromia parcial, íris azuis hipoplásicas, e impressão de telecanto.	*PAX3*	-
LGH12	Isolado	1	Surdez neurossensorial profunda bilateral, heterocromia parcial à E, íris azul hipoplásica, impressão de telecanto.	Painel NGS de Surdez	-
LGH13	Isolado	1	Canície precoce, surdez neurossensorial profunda bilateral, telecanto, heterocromia total, íris azul hipoplásica à E, *W* = 2,3526 e hipoplasia das asas nasais.	*PAX3, MITF*	-
LGH14	Isolado	2	Perda auditiva, heterocromia total à esquerda, com íris azul hipoplásica.	*PAX3, MITF, SOX10, EDN3, EDNRB*	-
LGH15	Familial	2	Surdez neurossensorial profunda bilateral, sinófre, íris azuis hipoplásicas.	*PAX3, MITF, SOX10, SNAI2, EDN3, EDNRB*	+
LGH16	Familial	2	Surdez neurossensorial profunda bilateral, sinófre, heterocromia parcial à esquerda (porção inferior azulada), *W* = 1,91.	*PAX3, MITF, SOX10, SNAI2, EDN3, EDNRB*	+
LGH17	Familial	2	Surdez profunda (D) e parcial (E), sinófre, heterocromia parcial (E), *W* = 1,71.	*PAX3, MITF, SOX10, SNAI2, EDN3, EDNRB*	+
LGH18	Familial	2	Canície precoce, surdez neurossensorial profunda bilateral, íris azuis hipoplásicas, *W* = 2,03.	*PAX3, MITF, SOX10, SNAI2, EDN3, EDNRB*	+
LGH19	Familial	2	Mecha branca frontal, canície precoce, surdez neurossensorial profunda bilateral, *W* = 1,79, manchas hipocrômicas no corpo.	*PAX3, MITF, SOX10, SNAI2, EDN3, EDNRB*	+
LGH20	Familial	2	Canície precoce, mecha branca occipital, surdez neurossensorial profunda bilateral, sinófre, *W* = 1,84, íris azuis hipoplásicas atípicas.	*PAX3, MITF, SOX10, SNAI2, EDN3, EDNRB*	+
LGH21	Familial	1	Mecha branca frontal congênita, surdez neurossensorial profunda bilateral, íris azuis hipoplásicas, telecanto, *W* = 2,1865 e hipoplasia das asas nasais.	*PAX3*	-
LGH22	Familial	1	Mecha branca frontal, perda auditiva unilateral, heterocromia, íris azul hipoplásica (D), telecanto e hipoplasia das asas nasais.	*PAX3, MITF, SOX10, SNAI2, EDN3, EDNRB*	+
LGH23	Familial	1	Mecha branca frontal, perda auditiva unilateral profunda, heterocromia total, íris azul hipoplásica à E, impressão de telecanto e hipoplasia das asas nasais.	*PAX3, MITF, SOX10, SNAI2, EDN3, EDNRB*	+
LGH24	Familial	2	Surdez profunda bilateral, heterocromia total (E), com íris azul hipoplásica.	*PAX3, MITF, SOX10, EDN3, EDNRB*	-
LGH25	Familial	2	Surdez profunda bilateral, íris azuis hipoplásicas.	*MITF, SOX10, EDN3, EDNRB*	-

MLPA - *Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification*; NGS – Sequenciamento de nova geração; W – Índice *W*; D – Direita; E – Esquerda.

2. Aspectos éticos

Todos os indivíduos, ou seus responsáveis, que integraram a casuística do estudo consentiram em participar da pesquisa e se submeterem à coleta de 5mL de sangue para extração de DNA mediante assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido sob protocolo aprovado pelo Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo (Protocolo CEP 288/1998). Pacientes mais recentemente averiguados consentiram igualmente mediante assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido, aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa – Seres Humanos (Parecer 1.133.416 – 23/06/2015) do Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo (Anexo A).

3. Extração e quantificação do DNA

A extração de DNA a partir de linfócitos do sangue periférico dos casos mais antigos foi realizada com a técnica baseada no uso de fenol-clorofórmio, seguindo protocolo de rotina utilizado na época no Laboratório de Genética Humana. Em parte dos casos mais recentes foi realizada por método automatizado no equipamento Autopure LS (*Gentra Systems*, Minneapolis, Minnesota, USA), atualmente fabricado pela empresa QIAGEN (Hilden, Alemanha), e em parte foi também realizada por sistema igualmente automatizado de extração QIASimphony, da mesma empresa citada QIAGEN. Esses equipamentos estavam disponíveis no Centro de Pesquisa sobre o Genoma Humano e Células-Tronco (CPGHCT). Posteriormente, cada amostra de DNA foi quantificada com o aparelho Nanodrop ND-1000 (*Nanodrop Technologies*, Rockland, Delaware, USA) ou com o espectrofotômetro de placa Epoch (Biotek, Winooski, Vermont, USA) seguindo as instruções dos fabricantes.

4. Sequenciamento massivo paralelo do exoma

Foi realizado o sequenciamento massivo paralelo do exoma em amostras de todos os probandos dessa casuística e em alguns de seus genitores. Toda a etapa laboratorial de preparo de bibliotecas e amostras para sequenciamento, assim como a análise bioinformática e a geração dos arquivos VCFs anotados foram realizados pela equipe do Centro de Pesquisa sobre o Genoma Humano e Células Tronco (CPGHCT).

4.1 Procedimento laboratorial

Inicialmente o DNA foi quantificado no aparelho Qubit – Thermo Fisher Scientific (Waltham, EUA) com *kit* de quantificação Qubit dsDNA BR Assay (Thermo Fisher Scientific) a fim de avaliar se a amostra continha um total de 1 μg (1000ng) de DNA.

O DNA foi fragmentado enzimaticamente e a biblioteca foi preparada e enriquecida pelo *kit "SureSelectQXT Target Enrichment"* (Agilent Technologies, Santa Clara, California, USA). Os fragmentos de DNA foram ligados a adaptadores sintéticos para que a amplificação desses fragmentos ocorresse (enriquecimento da biblioteca).

As bibliotecas dos exomas foram então capturadas por partículas magnéticas e analisadas quanto às quantidades de DNA e tamanho dos fragmentos em equipamento "Bioanalyzer 2100" (Agilent Technologies, Santa Clara, California, USA) e por PCR em tempo real (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA).

Os fragmentos da biblioteca genômica enriquecida foram sequenciados na plataforma "*HiSeq 2500"* (Illumina, San Diego, Califórnia, USA), gerando milhões de *reads* (fragmentos de leitura de sequência).

4.2 Procedimento de bioinformática

O resultado do sequenciamento massivo em paralelo foi fornecido na forma de dois arquivos "fastQ" contendo as *reads*, um para as leituras "*forward"* e outro para as leituras "*reverse"*.

Para alinhar essas *reads* ao genoma de referência (hg19) e reunir os arquivos com as sequências "*forward"* e "*reverse"* em um único arquivo de extensão "sai", foi utilizado o programa "*Burrows-Wheeler Aligner"* (BWA) (LI; DURBIN, 2009).

Para transformar o arquivo "sai" em "bam" para que ele ocupe menos espaço e possa ser visualizado em programas como o IGV (Broad Institute, Cambridge, Massachusetts, USA), que permite a visualização das *reads* alinhadas ao genoma referência, foi utilizado o programa Picard (Broad Institute, Cambridge, Massachusetts, USA), que também avalia a qualidade de cada *read*, exclui as leituras em duplicatas e determina as posições das indels.

Para gerar o arquivo "VCF" com as variantes, foi utilizado o programa GATK (Broad Institute, Cambridge, Massachusetts, USA), que realinha as indels à esquerda, recalibra a qualidade das bases e faz a chamada de variantes. Esse arquivo contém informações como a posição cromossômica da variante detectada, o gene no qual se localiza, o genótipo, número de *reads* para cada alelo e sua qualidade.

As variantes no arquivo .vcf foram anotadas (processo de anotação das variantes) pelo software Annovar (annovar.openbioinformatics.org/en/latest/) (WANG; LI; HAKONARSON, 2010). O arquivo conhecido como VCF anotado contém diversas informações relevantes ao processo de seleção das variantes candidatas a explicar o quadro clínico: informações sobre o tipo da variante (sinônima, não sinônima, *frameshift*, inserção etc), seu endereço no gene, alteração do aminoácido na proteína, posição no gene (exônica, intrônica, 3'UTR, *splicing* etc), sua frequência em bancos de dados populacionais, predição de patogenicidade etc.

4.3 Avaliação da qualidade dos exomas

A avaliação da qualidade do exoma foi feita a partir dos arquivos FastQ. Os arquivos foram analisados pelo programa SureCall (Agilent Technologies, Santa Clara, California, USA). Amostras com mais de 85% das regiões alvo (exons) cobertas por pelo menos 10 *reads* foram definidas como aceitáveis. Apenas as amostras dos pacientes LGH8 (70,03%) e LGH11 (79,48%) tiveram desempenho inferior. A média de cobertura vertical das regiões alvo para esses pacientes foi de 59,04 *reads*.

4.4 Filtragem dos arquivos VCF.

A filtragem das variantes contidas nos arquivos VCFs anotados foi feita aplicando-se filtros pertinentes para se obter variantes candidatas que expliquem o quadro clínico dos pacientes. Os bancos de dados de frequências populacionais utilizados foram: *Exome Aggregation Consortium* (ExAC, exac.broadinstitute.org), *NHLBI Exome Sequencing Project* (ESP, http://evs.gs.washington.edu/EVS/), 1000 Genomas (www.internationalgenome.org) e Arquivo Brasileiro Online de Mutações (ABraOM, http://abraom.ib.usp.br/). Os pacotes de previsão de patogenicidade utilizados foram o *PolyPhen-2*, (http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/), SIFT (http://sift.jcvi.org/) e o *Mutation Taster* (http://www.mutationtaster.org/). O banco de dados ClinVar (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/) e o banco de dados de variantes específicas em genes relacionados à surdez, o *Deafness Variation Database* (http://deafnessvariationdatabase.org/), e o OMIM (www.omim.org/) foram utilizados para avaliar a relação genótipo-fenótipo e a classificação de patogenicidade.

Distintas estratégias de filtragem foram empregadas em função dos achados e da disponibilidade de amostras de genitores para análise. Essas estratégias serão detalhadas no item sobre os resultados.

5. Array-CGH

Algumas amostras de probandos foram investigadas utilizando-se a plataforma "*CytosureTM, ISCA v2 array 4X180K*" (OGT, Oxfordshire, UK) contendo aproximadamente 180.000 oligonucleotídeos com resolução aproximada de 50 – 100 Kb. O procedimento foi realizado pela equipe da Dra. Carla Rosenberg (IB-USP)

6. Sequenciamento de Sanger

O sequenciamento de Sanger foi utilizado para buscar variantes em genes candidatos em casos de pacientes novos na casuística que não tinham sido analisados previamente. Foi também utilizado para confirmar a presença de variantes candidatas a explicar o quadro clínico detectadas nos exomas e para estudar a segregação dessas variantes nas famílias, quando havia amostras disponíveis.

O DNA foi amplificado por meio da reação em cadeia da polimerase (PCR) utilizando-se os seguintes reagentes: 2,5 μL de dNTPs (200 μM); 2,5 μL de *buffer* caseiro; 0,5 μL (0,7 a 2,0 μM) de cada primer (*forward* e *reverse*); 0,3 μL (1,5 U) de Taq (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA); 17,7 μL de água. As seguintes condições de temperatura foram utilizadas: 5 min a 95ºC; 15 ciclos de 45 seg a 95ºC, 45 seg a 67ºC, com decréscimo na temperatura de 1ºC a cada ciclo subsequente após o segundo ciclo e 1 min a 72ºC; 20 ciclos de 45 seg a 95ºC, 45 seg a 57ºC e 1 min a 72ºC; 10 min a 72ºC, finalizando a 10ºC.

Para investigar a variante candidata c.115A>G; p.Asn39Asp; NM_181459, no gene *PAX3* da paciente LGH13 foram utilizadas as condições de PCR a seguir: 1 min a 95ºC; 35 ciclos de 30 seg a 95ºC, 45 seg a 58,4ºC e 45 seg a 72ºC; 7 min a 72ºC finalizando a 10ºC.

Os produtos da PCR foram verificados em gel de agarose e em seguida purificados com: 0,5 µL (10 U/μL) da enzima *Exonucleases I* (Exo) (Affymetrix, Santa Clara, California, USA), 1 μL (1 U/μL) da enzima *Shrimp Alkaline Phosphatase* (SAP) (Affymetrix, Santa Clara, California, USA) e 8 μL do produto da PCR. A reação foi realizada em termociclador a 37ºC por 1h e 80ºC por 15 min.

A reação de sequenciamento foi realizada de forma bidirecional nas seguintes condições: 2 μL de "*BigDye terminator v3.1*" (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA), 1 μL de tampão, 0,5 μL de cada primer, 3 μL do produto da PCR purificado e 3 μL de água. A reação ocorreu com ciclos de 96ºC por 1 min; e 25 ciclos de 96ºC por 10 seg, 50ºC por 5 seg e 60ºC por 4 min.

Para a purificação final, adicionaram-se 300 μL de água aos poços da placa de purificação (Milipore, Billerica, Massachusetts, USA) com Sephadex e incubou-se por 2 horas. Seguiu-se centrifugação por 5 minutos a 2100 rpm 24ºC. Adicionaram-se 150 μL de água e centrifugou-se por 8 min a 2100 rpm 24ºC. As amostras foram adicionadas aos poços da placa e foram centrifugadas por 5 min a 2100 rpm 24ºC.

Finalmente, 10 μL foram transferidos da placa para tubos separados e foram secados com a tampa aberta no termociclador por 10 min a 95ºC. Os produtos de sequenciamento purificados foram enviados para o CPGHCT, onde foram realizadas as etapas finais da reação de sequenciamento e a eletroforese capilar, utilizando-se o equipamento "ABI 3730xl DNA Analyzer" (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA). Os resultados foram analisados utilizando-se o programa "*Bioedit*" (Íbis Biosciences, Carlsbad, Califórnia, USA).

Os *primers* utilizados no sequenciamento dos genes já conhecidos relacionados à SW nos pacientes previamente analisados durante o mestrado de Bocangél (2014) (pacientes LGH1-11 e LGH15-23 da Tabela 5) encontram-se descritos em sua dissertação e no artigo correspondente (BOCÁNGEL et al., 2018). No caso do paciente mais recentemente averiguado, LGH13, foram sequenciados em seu material genético os genes *PAX3* e *MITF* utilizando os *primers* descritos nas tabelas abaixo (Tabela 6 e Tabela 7). Para o sequenciamento convencional do gene *PAX3*, foram desenhados *primers* novos para amplificar os exons 1 e 8, utilizando-se as sequências dos genes conforme apresentado no banco de dados Ensembl (https://www.ensembl.org/index.html). A ferramenta NCBI primer-BLAST (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/) foi utilizada no planejamento dos *primers*. Para os outros exons foram utilizadas as mesmas sequências de *primers* descritas na dissertação de Bocangél (2014).

Para o sequenciamento convencional do gene *MITF*, foram desenhados *primers* novos para os exons 1, 2, 5 e 10 através da sequência obtida na página do Ensembl (https://www.ensembl.org/index.html) e usando a ferramenta NCBI primer-BLAST

(https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/). Para os exons 3, 4, 6, 7, 8 e 9 foram utilizados os mesmos *primers* descritos no trabalho de mestrado de Bocangél (2014). No entanto, naquela ocasião, haviam sido utilizados *primers* para amplificar os exons da isoforma de 413 aminoácidos do gene *MITF* (NM_198158). Essa isoforma difere do transcrito maior (NM_198159), de 520 aminoácidos, em sua região 5'UTR e em sua região codificadora 5', gerando uma proteína mais curta e com uma região N-terminal diferente. Com isso, os *primers* foram ajustados nesse trabalho para serem utilizados de acordo com a sequência da isoforma maior (NM_198159).

Tabela 6 - *Primers* utilizados na amplificação do gene *PAX3* (NM_181459).

Gene	Exon	*Primers* 5' - 3'	Referência
PAX3	1	F - TGCCCAGACTCGTACCAAAC R - TCCTGGAAGCACCAAAGGAG	NCBI primer tool
	2	F - TGTCGAGCAGTTTCAGCG R - CAGTCTGGGAGCCAGGAG	(BALDWIN et al., 1992); (MACINA et al., 1995)
	3	F - CAGAGGCGGTGGGGCCGCCGCCAC R - GTCGACGTGCCGGGGTAATAGCGA	(BALDWIN et al., 1992); (MACINA et al., 1995)
	4	F - ACAGCCCTGCTTGTCTCAAC R - CTCCAAGTCACCCAGCAAGT	(BALDWIN et al., 1992); (MACINA et al., 1995)
	5	F - GAGAGAACTTGGATTCAATCTCAG R - CCTGTCTGGACTGAAGTAGGACAC	(BALDWIN et al., 1992); (MACINA et al., 1995)
	6	F - ACTATTATTTCATCAGTGAAATCC R - ATAAAATATCCACCAGAGAAATCG	(BALDWIN et al., 1992); (MACINA et al., 1995)
	7	F - TGCACTGAACTTTCTCTGCTGGCC R - CTGGTATACAGCAAATCGTCTGTC	(BALDWIN et al., 1992); (MACINA et al., 1995)
	8	F - AGATGTTATCGTCGGGCATGAT R - ATACCGGCATGTGTGGCTT	NCBI primer tool
	9	F - CAAGCCTTTGATAGCACGGTA R - TCAATCACTCTCCTTTGTCTCCT	(BALDWIN et al., 1992); (MACINA et al., 1995)
	10	F - AGGAGACAAAGGAGAGTGATTGA R - CTCTCCCCACACAGGAAAGG	(BALDWIN et al., 1992); (MACINA et al., 1995)

Tabela 7 - *Primers* utilizados na amplificação do gene *MITF* (NM_198159).

Gene	Exon	*Primers* 5' - 3'	Referência
MITF	1	F - GCCCAGCTACCTTCCCTC R - CAGAGTGGCAGACGCAGTG	NCBI primer tool
	2	F - AAGTGCAAACGAAGGGTCTC R - CACCTAGCAAATGGAAAATGG	NCBI primer tool
	3	F - GGAAGAGCCGTCTGAAACTC R - GTGGCCACAAGGACAAACTA	Pardono (2005)
	4	F - GTTGCTGTGCCATCAGCTT R - AAGGTGTGATCCACCACAAA	Pardono (2005)
	5	F - GACCATTATTGCTTTGGGTAAAA R - GAACCCTGGAAACACCTCAA	NCBI primer tool
	6	F - CCTGTGAATGAAAAAGTAAACATCTC R - AAAAGTTACGTCCATGAGTTGGA	Pardono (2005)
	7	F - TGTGCAACTTCAAACAGTTCC R - CAGCTGTAGGAATCAACTCTCC	Pardono (2005)
	8	F - AAATGCATACATGGCACTGTT R - CAAAGGGAGAGGGGAGACTT	Pardono (2005)
	9	F - TGAGCCTCAAATCCTAAAAATATC R - TCTTGAAGTCGGTAAAAAGCA	Pardono (2005)
	10	F - CAGGCTTAAAAGTCCTCTGTGC R - CAAGAAAACCCCTTCAGGTAAG	NCBI primer tool

As amostras dos indivíduos LGH14, LGH24 e LGH25 foram encaminhadas pela colaboradora, a geneticista Dra. Karina Lezirovitz Mandelbaum, do Laboratório de Otorrinolaringologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. Os genes previamente sequenciados estão indicados na Tabela 5. Os *primers* utilizados não são necessariamente os mesmos utilizados nas amostras do LGH.

A amostra do indivíduo LGH12 foi analisada previamente por meio de um painel de sequenciamento de nova geração desenvolvido para análise para genes de surdez, que incluía os genes conhecidos de SW, durante o desenvolvimento do mestrado de Dias (2018).

7. Construção das genealogias

Durante a anamnese dos pacientes, as genealogias foram desenhadas à mão pelos profissionais citados no item 1. As genealogias foram posteriormente redesenhadas com *software* GenoPro (GenoPro2011®, version 2.5.4.1).

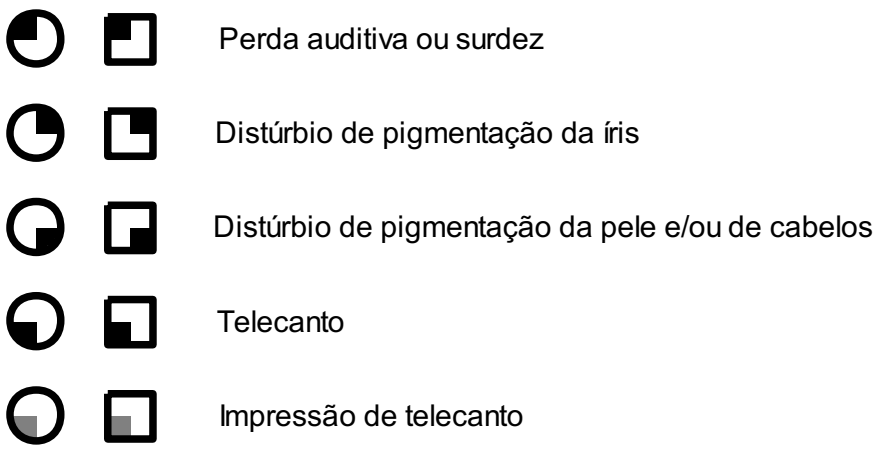
V Resultados e discussão

Inicialmente todos os exomas foram analisados em relação aos genes já conhecidos (*PAX3*, *MITF*, *SOX10*, *EDNRB*, *EDN3*, *SNAI2* e *KITLG*), cujas mutações causam a SW. Para cada gene, foram filtradas apenas as variantes exônicas, exônicas/*splicing* e de *splicing*. Variantes com frequência acima de 1% nos bancos de dados previamente citados foram descartadas e variantes com frequências abaixo ou igual a 1% foram avaliadas quanto à patogenicidade classificada e/ou prevista pelas ferramentas previamente descritas. É importante ressaltar que para o banco de dados de frequência de variantes brasileiras, ABraOM, a frequência é apresentada em número de alelos. O banco possui variantes de 609 idosos saudáveis da população brasileira, compondo então 1218 alelos, no qual aproximadamente 12 alelos equivalem a 1% (NASLAVSKY et al., 2017). As variantes candidatas classificadas e/ou previstas como provavelmente patogênicas foram selecionadas para confirmação por meio do sequenciamento de Sanger, conforme descrito no item 6.

Os resultados serão apresentados e discutidos, de acordo com sua classificação após a análise do exoma. (1) casos onde a variante que causa a SW foi detectada após sequenciamento do exoma; (2) casos submetidos à análise de trios, com e sem variante causativa encontrada após sequenciamento do exoma; (3) casos sem variante causativa detectada após sequenciamento do exoma. As variantes foram descritas de acordo com as normas do *Human Genome Variation Society* (HGVS) conforme descritas em Den Dunnen et al. (2016).

Em todas as genealogias, a representação dos fenótipos foi feita de acordo as seguintes convenções:

Figura 7 - Legenda dos símbolos utilizados na representação dos heredogramas.



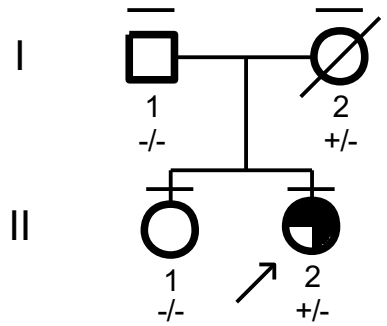
Nessas genealogias, o probando é sempre indicado por meio de uma seta. As barras horizontais acima dos símbolos indicam que a análise molecular foi realizada. O genótipo não alterado (-/-) e alterado em heterozigose (+/-) é indicado abaixo dos símbolos. As barras diagonais indicam que o indivíduo é falecido.

1. Descrição de dez casos com variante causativa detectada após sequenciamento do exoma

LGH3

Família de São Paulo, com caso isolado de SW2. Heredograma apresentado na Figura 8. A família consta da dissertação de Pardono (1999).

Figura 8 - Heredograma da família LGH3



Propósita (II-2), 24 anos, sexo feminino, com mecha branca frontal (primeiros meses de vida), medidas oculares normais com índice W = 1,74, íris azuis hipoplásicas e surdez neurossensorial profunda bilateral.

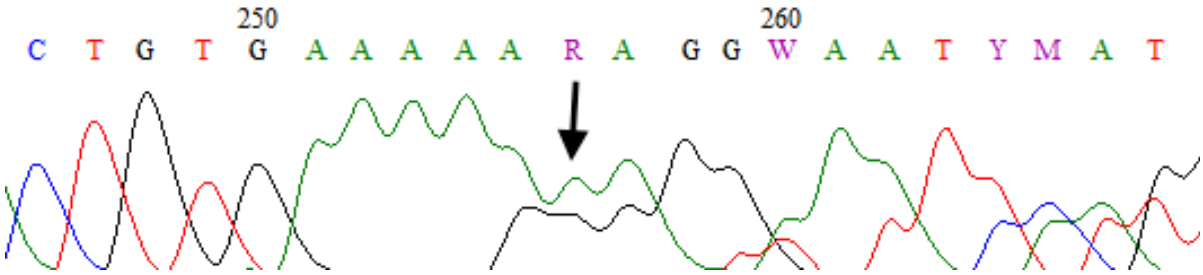
A variante no exon 3 do gene *MITF* (c.575_575delA; p.Glu194Argfs*19; NM_198159) em heterozigose foi encontrada após filtragem do VCF anotado. A deleção da base nitrogenada adenina, "A", ocorre na segunda base do códon que corresponde ao aminoácido da posição 192. Como é seguida por outras adeninas, o aminoácido glutamato da posição 192 não sofre alteração com o deslocamento do quadro de leitura. O aminoácido seguinte, uma lisina na posição 193, também não sofre alteração, pois é codificado tanto pela sequência "AAA", quanto pela sequência "AAG" originada na probanda. Finalmente, o deslocamento do quadro de leitura causa a troca de um glutamato por uma arginina na posição 194, acarretando a formação de um códon de parada prematuro 19 aminoácidos depois.

A variante nunca foi descrita em bancos de dados de indivíduos assintomáticos e é prevista como patogênica por interromper prematuramente da síntese da proteína MITF. A variante tampouco foi descrita em pacientes com SW e não está presente nos bancos de dados *Deafness Variation Database* ou *LOVD* (*Leiden Open Variation Database*).

Foi coletado material para extração do DNA dos pais e da irmã da probanda, tendo sido verificado, pelo sequenciamento de Sanger, que apenas a mãe da probanda possuía a mesma variante. O fato de a mãe assintomática I-2 ter apresentado a variante indica penetrância incompleta.

A identificação dessa mutação em *MITF* indica que a paciente tem SW2. A variante encontrada é coerente com o fenótipo exibido pela probanda e com a hipótese diagnóstica inicial. Variantes patogênicas no gene *MITF* correspondem a cerca de 15% dos casos de SW2. (PINGAULT et al., 2010; READ; NEWTON, 1997).

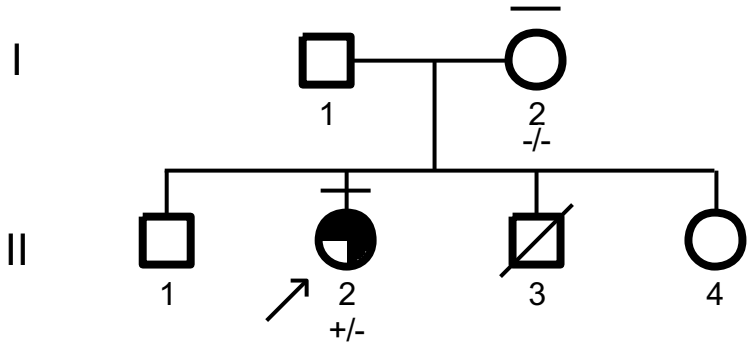
Figura 9 - Eletroferograma com resultado do sequenciamento convencional da amostra da paciente LGH3 indicando a variante c.575_575dealA no gene *MITF* no programa *Bioedit*.



LGH5

Família de São Paulo, com caso isolado de SW2. Heredograma apresentado na Figura 10. A família está descrita na tese de Pardono (2005).

Figura 10 - Heredograma da família LGH5.



Propósita (II-2), 37 anos, sexo feminino, com mecha branca frontal, surdez profunda unilateral à direita, sinófre, índice *W* = 1,58, heterocromia total (íris direita azul hipoplásica e esquerda castanha).

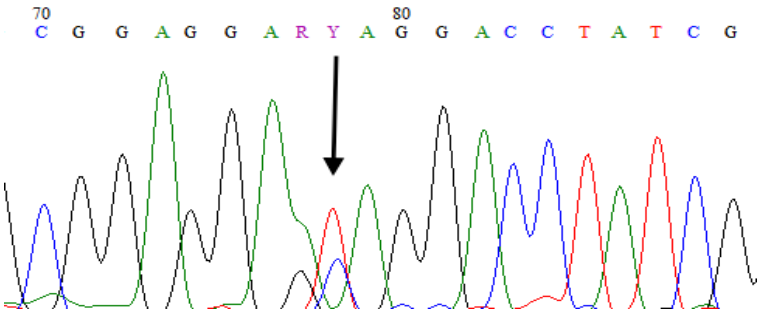
A variante no exon 2 do gene *SOX10* (c.13C>T; p.Gln5*; NM_006941) em heterozigose foi encontrada após filtragem do VCF anotado. A substituição de uma citosina "C" por uma timina "T" ocorre na primeira base do códon correspondente à glutamina na posição 5. A substituição gera um códon de parada prematuro, acarretando uma proteína com apenas 4 aminoácidos.

A variante nunca foi descrita em bancos de dados de indivíduos assintomáticos e é prevista como patogênica por interromper prematuramente a síntese da proteína SOX10. A variante não foi descrita em pacientes com SW e não está presente nos bancos de dados *Deafness Variation Database* ou *LOVD* (*Leiden Open Variation Database*).

Foi coletado material para extração do DNA de sua mãe, que não apresentava, pelo sequenciamento de Sanger, a mesma variante. O material genético de seu pai, no entanto, não foi coletado, não sendo possível com certeza excluir a hipótese de a variante ter sido herdada, apesar dos achados clínicos característicos de SW terem sido encontrados apenas na probanda.

A identificação dessa mutação em *SOX10* indica que a paciente tem SW2. A variante encontrada é condizente com o fenótipo exibido pela probanda e com o diagnóstico inicialmente proposto. Conforme já mencionado, variantes patogênicas no gene *SOX10* correspondem a cerca de 15% dos casos de SW2 (BONDURAND et al., 2007; PINGAULT et al., 2010).

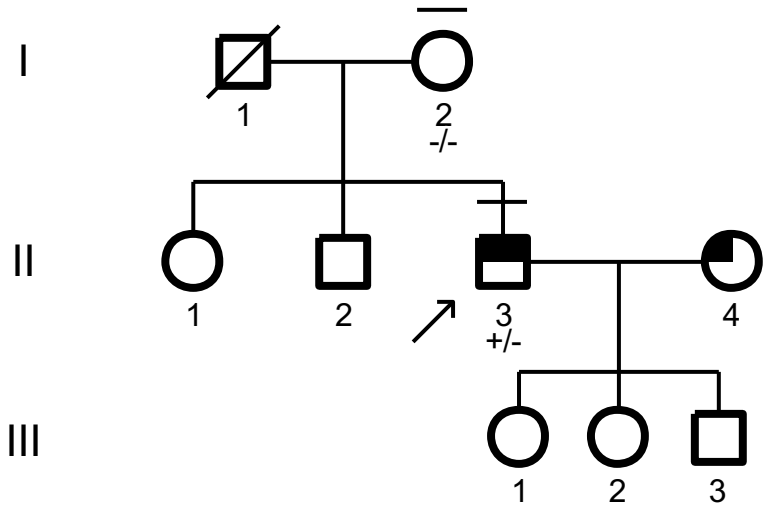
Figura 11 - Eletroferograma com resultado do sequenciamento convencional da amostra da paciente LGH5 indicando a variante c.13C>T no gene *SOX10* no programa *Bioedit*.



LGH10

Família de São Paulo, com caso isolado de SW2. Heredograma apresentado na Figura 12. A família está descrita na tese de Pardono (2005).

Figura 12 - Heredograma da família LGH10.



Propósito (II-3), 32 anos, sexo masculino, com surdez neurossensorial profunda bilateral e íris azuis hipoplásicas e índice $W = 1{,}46$.

A esposa do probando (II-4) apresenta surdez não sindrômica, provavelmente autossômica recessiva (filha de pais consanguíneos).

A variante no exon 2 do gene *SOX10* (c.275_276insCCCGT; p.Arg93Profs*18; NM_006941) em heterozigose foi encontrada após a filtragem do VCF anotado. A inserção de 5 bases nitrogenadas, iguais às 5 bases que imediatamente antecedem a inserção, a partir do aminoácido da posição 92, cria um deslocamento do quadro de leitura. Contudo, a valina da posição 92 permanece inalterada na paciente, pois a sequência "GTG" codifica o mesmo aminoácido para a sequência "GTC" originada no probando. A inserção, no entanto, causa a troca de uma arginina por uma prolina na posição seguinte, 93, e acarreta a formação de um códon de parada prematuro 18 aminoácidos depois.

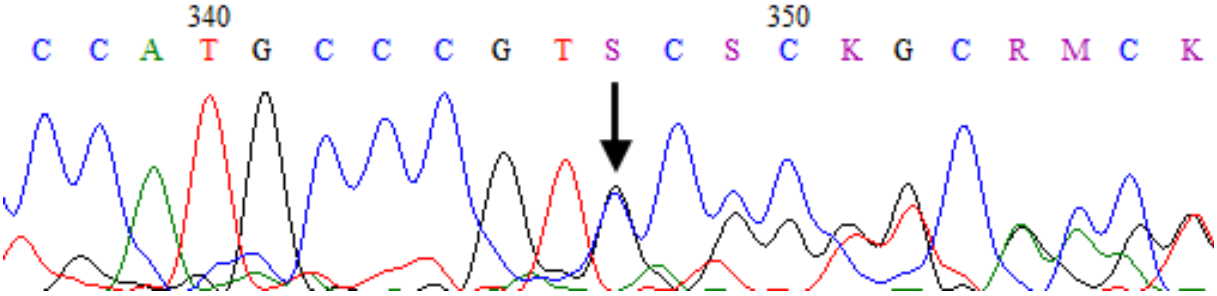
A variante nunca foi descrita em bancos de dados de indivíduos assintomáticos e é prevista como patogênica por interromper prematuramente a síntese da proteína SOX10. A variante tampouco foi descrita em pacientes com SW e não está presente nos bancos de dados *Deafness Variation Database* ou *LOVD* (*Leiden Open Variation Database*). Curiosamente, uma deleção dessas mesmas 5 bases (271_275delCCCGT; p.Pro91Alafs*41) já foi descrita no

ClinVar e no *Deafness Variation Database* como provavelmente patogênica. O estudo que a descreveu associou a deleção das 5 bases com o fenótipo de SW4 (TANG et al., 2015).

Foi coletado material para extração do DNA de sua mãe, que não apresenta, pelo sequenciamento de Sanger, a mesma variante. O material genético de seu pai, no entanto, não foi coletado, não sendo possível excluir a hipótese de a variante haver sido herdada, apesar dos achados clínicos terem sido encontrados apenas no probando.

A identificação dessa mutação em *SOX10* indica que o paciente tem SW2. A variante encontrada é consistente com o fenótipo exibido pelo probando e com o diagnóstico proposto inicialmente. Variantes patogênicas no gene *SOX10* correspondem com cerca de 15% dos casos de SW2 (BONDURAND et al., 2007; PINGAULT et al., 2010).

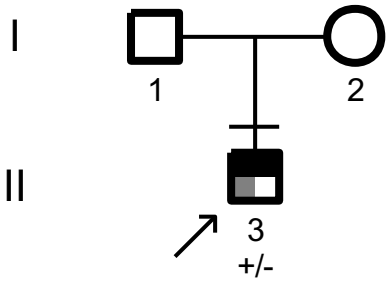
Figura 13 - Eletroferograma com resultado do sequenciamento convencional da amostra do paciente LGH10 indicando a variante c.275_276insCCCGT no gene *SOX10* no programa *Bioedit*.



LGH12

Família de Novo Hamburgo, Rio Grande do Sul, com caso isolado de SW1. Heredograma apresentado na Figura 14. A família está descrita na dissertação de Dias (2018) com registro 67.

Figura 14 - Heredograma da família LGH12.



Propósito (II-1), 6 anos, sexo masculino, com surdez neurossensorial profunda bilateral, heterocromia parcial à esquerda, íris azuis hipoplásicas e impressão de telecanto.

A variante sinônima no exon 10 do gene *MITF* (c.1212G>A; p.Thr404=; NM_198159) em heterozigose foi encontrada após a filtragem do VCF anotado. A substituição da base nitrogenada guanina, "G" por uma adenina "A", ocorre na última base do códon correspondente à treonina na posição 404. A substituição, no entanto, não altera o aminoácido que é adicionado nessa posição.

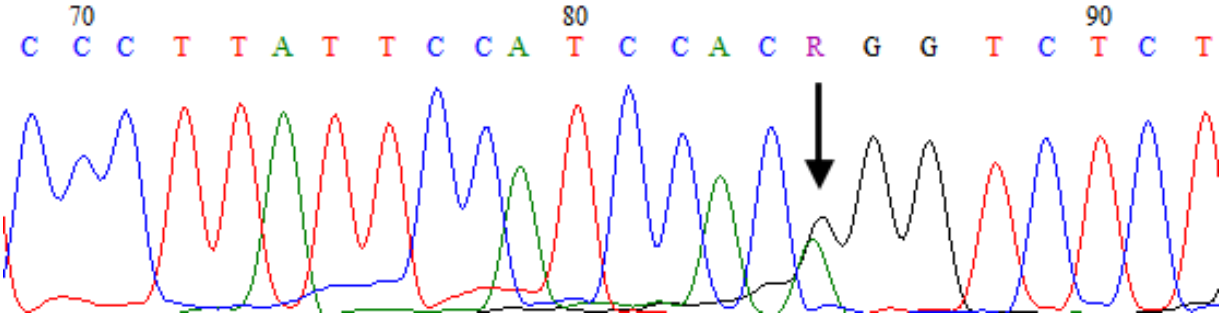
A variante nunca foi descrita em bancos de dados de indivíduos assintomáticos. A variante já foi descrita em pacientes com SW2 e está presente nos bancos de dados *Deafness Variation Database* e *LOVD* (*Leiden Open Variation Database*) como patogênica, apesar de ser uma substituição sinônima, sob o RefSNP rs1057521096. Brenner et al. (2011) descreveram a variante como patogênica após estudo de uma grande família com 13 afetados, da qual amostras de 29 indivíduos foram analisadas. Dos 13 indivíduos que manifestavam algum sinal da síndrome (canície precoce ou perda auditiva), todos possuíam a variante. No estudo, a variante foi encontrada usando-se preliminarmente análise de ligação, que revelou LOD *score* de 6,6 na região cromossômica 3p14.1, onde se localiza o gene *MITF*. Foi demonstrada como patogênica por meio da análise do cDNA do gene *MITF*. Foi observado que ela gerou um novo sítio de *splicing* que remove os primeiros 52 pares de bases do exon 9 e gera alteração no quadro de leitura, adicionando 7 aminoácidos novos na posição 387, e, em seguida, gerando um codón de parada prematuro. Com base nos achados sobre o cDNA, a variante pode ser descrita pela sua alteração gerada no RNA e na proteína final como r.859_910del e p.Glu287Valfs*8, respectivamente.

O material genético de seus pais não foi coletado, não sendo possível excluir com certeza a hipótese de a variante ter sido herdada, apesar dos achados clínicos pertinentes à SW terem sido encontrados apenas no probando.

A identificação dessa mutação em *MITF* indica que o paciente tem SW2. No entanto, nossa hipótese inicial era de que se tratava de SW1. Como o probando foi visto aos 9 meses de vida, o telecanto era duvidoso e as medidas para o cálculo do índice *W* não foram registradas na época. Como o paciente não foi reavaliado, não podemos confirmar a presença de telecanto, mas o estudo molecular indica que de fato o paciente tem SW2. Variantes patogênicas no gene

MITF correspondem com cerca de 15% dos casos de SW2 (PINGAULT et al., 2010; READ; NEWTON, 1997).

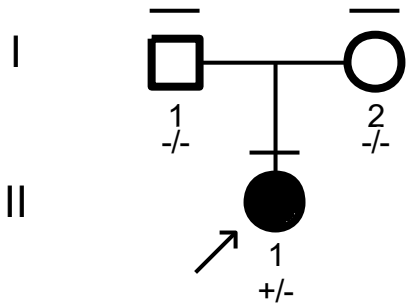
Figura 15 - Eletroferograma com resultado do sequenciamento convencional da amostra do paciente LGH12 indicando a variante c.1212G>A no gene *MITF* no programa *Bioedit*.



LGH13

Família de São Paulo, com caso isolado de SW1. Heredograma apresentado na Figura 16.

Figura 16 - Heredograma da família LGH13.



Propósita (II-1), 7 anos, sexo feminino, com canície precoce, surdez neurossensorial profunda bilateral, telecanto, heterocromia total, íris azul hipoplásica à esquerda, índice *W* = 2,3526 e hipoplasia das asas nasais.

A variante no exon 2 do gene *PAX3* (c.115A>G; p.Asn39Asp; NM_181459) em heterozigose foi encontrada após a filtragem do VCF anotado. A substituição de uma adenina "A" por uma guanina "G" ocorre na primeira base do códon correspondente à asparagina na posição 39. O aminoácido é substituído por um aspartato em uma região importante de ligação ao DNA.

A variante nunca foi descrita em pacientes com SW e não está presente nos bancos de dados *Deafness Variation Database* ou *LOVD* (*Leiden Open Variation Database*). Tampouco foi descrita em bancos de dados de indivíduos assintomáticos. É prevista como patogênica por programas computacionais de predição de patogenicidade (SIFT, *PolyPhen-2* e *Mutation taster*). A maior concentração de variantes patogênicas no gene *PAX3* está presente no exon 2 (PINGAULT et al., 2010), responsável pela codificação de parte do domínio de pareamento da proteína PAX3 (BALDWIN et al., 1995), que, junto com o domínio homeótico, formam o domínio de ligação ao DNA. Uma variante semelhante, a substituição c.115A>T; p.Asn39Tyr, no mesmo local da variante encontrada na probanda, já foi descrita como patogênica (PINGAULT et al., 2010).

O material genético da paciente havia sido triado para variantes patogênicas nos genes *PAX3* e *MITF* pelo sequenciamento de Sanger, que não revelou, *a priori*, a variante que foi encontrada após a filtragem do exoma. Durante a etapa de validação do achado do exoma, feita pelo sequenciamento de Sanger, a variante também não foi detectada. Após ajuste das condições da PCR, como mencionado em Materiais e Métodos, item 6, a variante foi confirmada. Blais et al. (2015) revê a problemática das falhas do sequenciamento convencional. Quando se sequencia DNA genômico diploide após amplificação do DNA pela PCR, existe a possibilidade de falha na amplificação de um dos dois alelos em um dado lócus, fenômeno conhecido como *allele dropout*. Essa falha pode ser causada por fatores independentes da sequência, como variações na quantidade e qualidade do DNA extraído, presença de inibidores de PCR, variações nos volumes de reagentes pipetados, flutuações nas temperaturas e velocidade de rampa do termociclador etc. Na maioria desses casos, não se consegue reproduzir novamente o fenômeno, que geralmente é solucionado após reanálise. Pode ainda ser causada por variações alelo-específicas da sequência, como a formação de estruturas secundárias induzidas por polimorfismos, que dificultam a ação da polimerase; por não hibridação estável dos *primers*; por conteúdo GC ou outras peculiaridades da sequência alvo. No diagnóstico molecular, erros de genotipagem podem levar à atribuição de um genótipo errado com consequências para o probando e para a família. O problema é realmente crítico porque, após a divulgação de resultados, dificilmente o mesmo teste será pedido novamente, devido à natureza constitucional do material genético de um indivíduo.

As condições de PCR utilizadas para a investigação dos pacientes que não possuíam análise molecular prévia, ou a confirmação de variantes possivelmente patogênicas encontradas

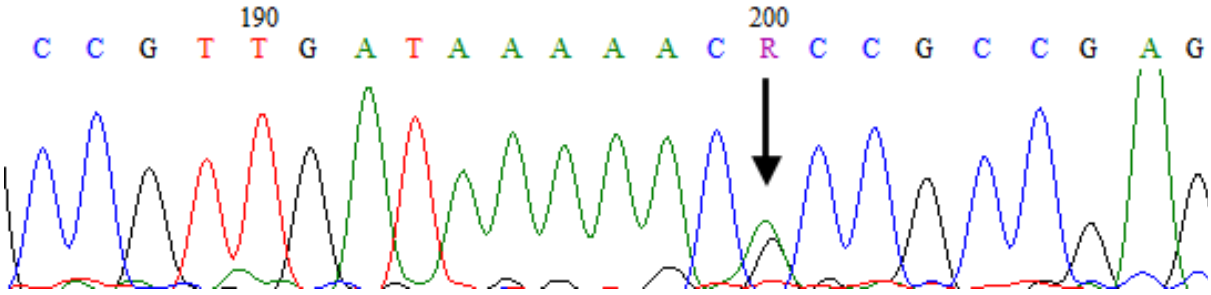
após filtragem dos dados do sequenciamento massivo em paralelo do exoma, incluíram, durante a fase de anelamento, uma temperatura inicial de 67ºC com diminuições sucessivas de 1ºC a partir do segundo ciclo, durante 15 ciclos. Essa diminuição gradual da temperatura de anelamento durante uma reação de PCR é conhecida como PCR *touchdown*. A estratégia *touchdown* é amplamente utilizada pois representa uma abordagem empírica para favorecer a interação mais específica entre o *primer* e a sequência alvo. É durante a fase de anelamento da reação de PCR que os *primers* se hibridam às sequencias alvo, sendo necessário que o termociclador alcance a temperatura de *melting* (TM) para determinado par de *primers*. A fidelidade da reação depende do cálculo exato da TM, que, no entanto, não existe consenso de como deve ser feito. Desviando da incerteza nos cálculos da TM, a estratégia *touchdown* inicia com uma temperatura acima da TM prevista para a maioria dos pares de *primers* e sucessivamente decresce a cada ciclo, chegando a temperaturas mais permissíveis após 10-15 ciclos. Essa estratégia compensa as limitações inerentes ao cálculo da TM e variações estocásticas da PCR que podem afetar rendimento e especificidade, sendo útil para a amplificação de uma vasta gama de sequências alvo que utilizam diferentes pares de *primers* com diferentes TMs, sem que seja necessário ajustar novas condições de temperatura de anelamento da reação para cada conjunto de *primers*. No entanto, a TM inicial em uma reação de PCR *touchdown* deve estar o mais próximo possível da TM para o par de *primers* a ser utilizado, afim de se explorar a natureza exponencial da PCR (KORBIE; MATTICK, 2008). Caso a TM inicial esteja muito distante da TM para o par de *primers* utilizado, é possível que apenas uma das fitas seja amplificada ou que o produto final não replique em quantidade e qualidade suficientes (BLAIS et al., 2015).

Após a confirmação da presença de 59 *reads* alteradas dentre um total de 114 *reads*, avaliadas por meio da visualização do arquivo BAM, e sucessivas falhas na etapa de confirmação da variante pelo método de sequenciamento convencional, foi utilizada PCR com temperatura fixa de 58ºC durante a etapa de anelamento, após a qual a variante foi então confirmada na probanda. Foi coletado material para extração do DNA de seus pais, onde constatamos, pelo sequenciamento de Sanger, sob as mesmas condições acima citadas, a ausência da variante em ambos. A variante é, portanto, *de novo*.

A identificação dessa mutação em *PAX3* indica que a paciente tem SW1. As evidências da relação do gene com o fenótipo clínico, da predição de patogenicidade por ferramentas computacionais e da ausência da variante em seus pais assintomáticos permitiu afirmar que a

variante em questão é a responsável pela SW1 na paciente, de acordo com o diagnóstico inicial. Variantes patogênicas no gene *PAX3* correspondem a mais de 90% dos casos de SW1 (PINGAULT et al., 2010).

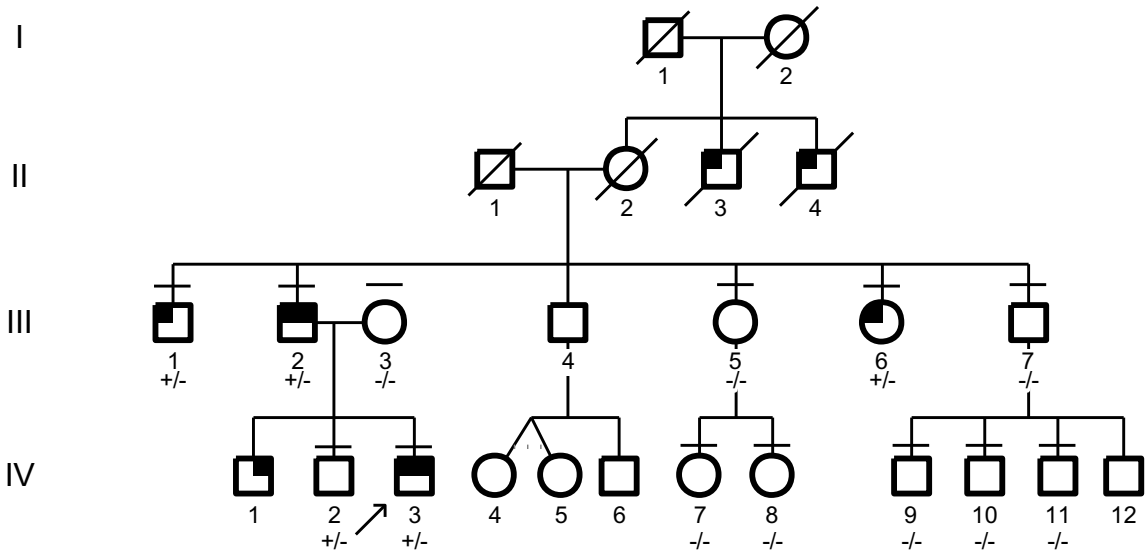
Figura 17 - Eletroferograma com resultado do sequenciamento convencional da amostra da paciente LGH13 indicando a variante c.115A>G no gene *PAX3* no programa *Bioedit*.



LGH15

Família de Penápolis, São Paulo, com caso familial de SW2. Heredograma apresentado na Figura 18. A família foi averiguada e descrita na dissertação de Pardono (1999).

Figura 18 - Heredograma da família LGH15.



Propósito (IV-3), 37 anos, sexo masculino, com surdez neurossensorial profunda bilateral, sinófre e íris azuis hipoplásicas. Os sinais e sintomas apresentados pelos demais membros da família são descritos abaixo:

II-3; II-4: surdez profunda bilateral.

III-1: surdez unilateral à esquerda.

III-2: surdez unilateral à esquerda e íris azuis hipoplásicas.

III-6: surdez profunda bilateral, mancha café com leite frontal acima do tornozelo esquerdo.

IV-1: heterocromia parcial à direita.

A variante no exon 9 do gene *MITF* (c.1066C>T; p.Arg356*; NM_198159) em heterozigose foi encontrada após filtragem do VCF anotado. A substituição de uma citosina "C" por uma timina "T" ocorre na primeira base do códon correspondente à arginina na posição 356. A substituição gera um códon de parada prematuro, gerando uma proteína mais curta que a normal.

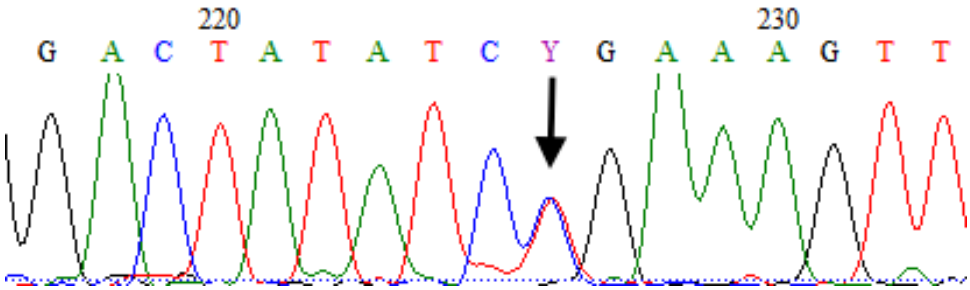
A variante nunca foi descrita em bancos de dados de indivíduos assintomáticos e é prevista como patogênica por interromper prematuramente a síntese da proteína MITF. A variante já foi descrita em pacientes com SW e está presente no banco de dados *Deafness Variation Database*, classificada como patogênica sob o RefSNP rs1057517966, mas não está no banco de dados *LOVD* (*Leiden Open Variation Database*). Yang et al. (2013) descreveram a variante em heterozigose em um indivíduo apresentando SW2 de origem chinesa e postularam que o produto proteico não teria a terminação 3' do domínio *helix-loop-helix*, o domínio *leucine zipper* e nem o terceiro domínio de transativação. Curiosamente, esse indivíduo com diagnóstico de SW2 teve um filho após casamento com uma paciente apresentando a SW1, também chinesa, com variante patogênica em *PAX3*. Eles geraram um filho com SW1, mostrando elevada expressividade dos distúrbios de pigmentação. O filho apresentou mecha branca frontal, sobrancelhas e cílios brancos e manchas hipopigmentadas na pele, sinais que não estão presentes em seus pais e que são mais comuns em caucasianos. Mutações em *PAX3* causam falha na transativação da expressão do gene *MITF*, logo, os autores postularam que a combinação das variantes diminuiu ainda mais a quantidade do produto de MITF expresso. Os autores chamaram a atenção para o aumento da expressividade dos defeitos de pigmentação nesses indivíduos de origem chinesa, já que, anteriormente, apenas uma grande família de indivíduos chineses SW1 havia sido descrita com mecha branca frontal e manchas

hipopigmentadas. Em comparação com orientais, caucasianos exibem com frequência maior os distúrbios de pigmentação.

Foi coletado material para extração do DNA dos pais e de vários integrantes da família, tendo sido verificado, pelo sequenciamento de Sanger, a presença da mesma variante nos indivíduos III-1; III-2 e III-6, que compartilhavam sinais típicos da SW e também no indivíduo assintomático IV-2. A variante foi, portanto, herdada de seu pai e foi confirmada em 4 indivíduos da família além do probando. Os indivíduos assintomáticos (III-3; III-5; III-7; IV-7; IV-8; IV-9; IV-10; IV-11) foram testados e nenhum apresentou a variante. O fato de o indivíduo assintomático IV-2 haver apresentado a variante pode indicar penetrância incompleta. A paciente II-2 era, até onde sabemos, também assintomática e provavelmente a portadora da variante, pois seus irmãos (II-3 e II-4) e filho (IV-3) apresentavam surdez profunda bilateral.

A identificação dessa mutação em *MITF* indica que o paciente e seus familiares igualmente afetados possuem SW2. A variante encontrada é compatível com o fenótipo exibido pelo probando e seus familiares igualmente afetados, e é coerente com o diagnóstico proposto. Variantes patogênicas no gene *MITF* contribuem com cerca de 15% dos casos de SW2 (PINGAULT et al., 2010; READ; NEWTON, 1997).

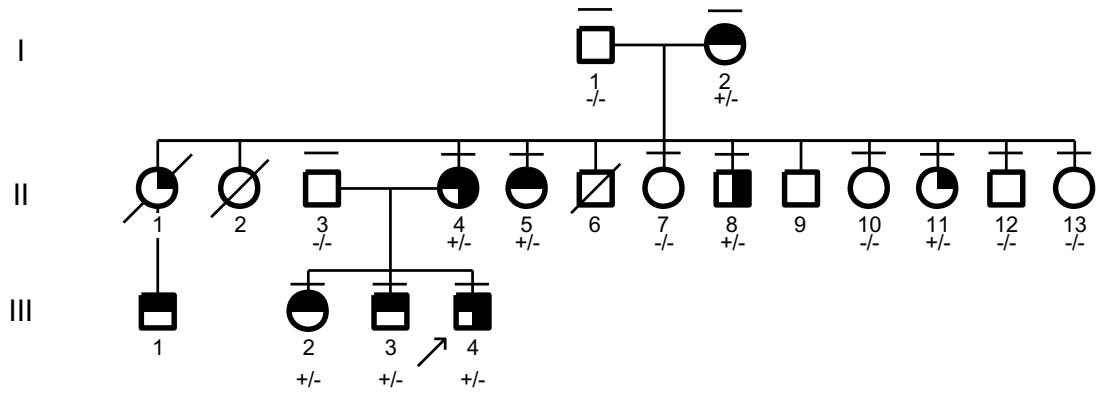
Figura 19 - Eletroferograma com resultado do sequenciamento convencional da amostra do paciente LGH15 indicando a variante c.1066C>T no gene *MITF* no programa *Bioedit*.



LGH18

Família de Arenápolis, Mato Grosso, com caso familial de SW2. Heredograma apresentado na Figura 20. A família foi averiguada e descrita na dissertação de Pardono (1999).

Figura 20 - Heredograma da família LGH18.



Propósito (III-4), 26 anos, sexo masculino, com canície precoce, surdez profunda neurossensorial bilateral, íris azuis hipoplásicas e índice W = 2,03. Os sinais e sintomas apresentados pelos demais membros da família são descritos abaixo:

I-2: heterocromia parcial à esquerda, surdez parcial bilateral e sardas pelo corpo todo.

II-1: heterocromia de íris (relatada pela família, estudo molecular não realizado).

II-4: canície (aos 15 anos), heterocromia total à direita com íris azul hipoplásica, surdez parcial à direita, sardas no rosto e corpo e mancha café com leite na coxa direita.

II-5: canície (aos 26 anos), heterocromia total à direita e parcial à esquerda (porção inferior azulada), surdez neurossensorial profunda bilateral, sardas, mancha café com leite na hemiface direita.

II-8: íris azuis hipoplásicas, manchas hipopigmentadas na região ilíaca direita, manchas café com leite disseminadas pelo tronco.

II-11: heterocromia total à esquerda e parcial à direita (porção superior azulada)

III-1: sinófre, surdez neurossensorial profunda bilateral, heterocromia parcial à direita e sardas (estudo molecular não realizado).

III-2: surdez parcial à esquerda, heterocromia total à esquerda com íris azul hipoplásica, mancha café com leite na coxa direita.

III-3: surdez neurossensorial profunda bilateral, heterocromia parcial bilateral e sardas.

A variante no exon 7 do gene *MITF* (c.910_911delAG; p.Arg304Alafs*10; NM_198159) em heterozigose foi encontrada após a filtragem do VCF anotado. A deleção das bases nitrogenadas adenina "A" e guanina "G" ocorrem na primeira e segunda base do códon do aminoácido arginina na posição 304, respectivamente. O deslocamento do quadro de leitura causa a troca da arginina por uma alanina, formando um códon de parada prematuro 10 aminoácidos depois.

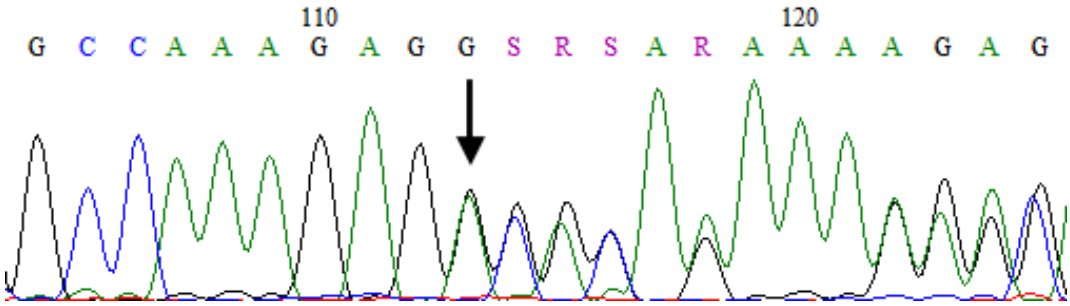
A variante nunca foi descrita em bancos de dados de indivíduos assintomáticos e é prevista como patogênica por interromper prematuramente a síntese da proteína MITF. Tampouco foi descrita em pacientes com SW e não está presente nos bancos de dados *Deafness Variation Database* ou *LOVD* (*Leiden Open Variation Database*).

Foi coletado material para extração do DNA de seus pais e de vários integrantes da família, onde constatamos, pelo sequenciamento de Sanger, a presença da mesma variante nos indivíduos (I-2; II-4; II-5; II-8; II-11; III-2; III-3) que também compartilhavam sinais típicos da SW. Os indivíduos afetados II-1 e III-1 não tiveram estudo molecular realizado. Os indivíduos assintomáticos (I-1; II-3; II-7; II-10; II-12 e II-13) que tiveram estudo molecular realizado não apresentaram a mesma variante. A variante foi, portanto, herdada de sua mãe e foi confirmada em sete indivíduos da família além do probando.

A identificação dessa mutação em *MITF* indica que o paciente e seus familiares afetados têm SW2. A variante encontrada é coerente com o fenótipo exibido pelo probando e seus familiares afetados. O valor médio do índice *W* da família é de 2,01, valor contido na zona de indecisão diagnóstica entre SW1 e SW2, que vai de 1,95 a 2,07 (READ; NEWTON, 1997). Medidas oculares de pacientes com SW1 e SW2 podem se sobrepor nessa zona de indecisão, principalmente quando há hipertelorismo. Não se pode, portanto, estabelecer como regra absoluta o limiar de 1,95 como fator de distinção entre SW1 e SW2, mas ainda assim é comprovado que o cálculo é um guia útil na distinção dos dois tipos, na maioria dos casos. Na família em questão foi observado aumento das medidas de distância intercantal interna, com aumento do índice *W*. A variante é, portanto, também compatível com o diagnóstico inicial.

Variantes patogênicas no gene *MITF* correspondem a cerca de 15% dos casos de SW2 (PINGAULT et al., 2010; READ; NEWTON, 1997).

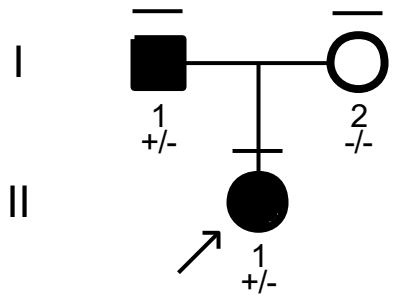
Figura 21 - Eletroferograma com resultado do sequenciamento convencional da amostra do paciente LGH18 indicando a variante c.910_911delAG no gene *MITF* no programa *Bioedit*.



LGH21

Família de São Paulo, com caso familial de SW1. Heredograma apresentado na Figura 22.

Figura 22 - Heredograma da família LGH21.



Propósita (II-1), 15 anos, sexo feminino, com mecha branca frontal congênita, surdez neurossensorial profunda bilateral, íris azuis hipoplásicas, telecanto, índice *W* = 2,1865 e hipoplasia das asas nasais.

Seu pai (I-1) apresentava canície precoce desde os 13 anos, mecha branca frontal, sinófre, surdez parcial bilateral, íris azuis hipoplásicas, índice *W* = 2,2676 e telecanto.

A variante no exon 6 do gene *PAX3* (c.896_897insT; p.Met299Ilefs*111; NM_181459) em heterozigose foi encontrada após a filtragem do VCF anotado. A inserção de uma timina "T" ocorre na última base do códon correspondente ao aminoácido metionina na posição 299. Esse é substituído por uma isoleucina e gera um deslocamento do quadro de leitura, criando um códon de parada prematuro 111 aminoácidos depois.

A variante nunca foi descrita em bancos de dados de indivíduos assintomáticos e é prevista como patogênica por interromper prematuramente a síntese da proteína PAX3. A variante tampouco foi descrita em pacientes com SW e não está presente nos bancos de dados *Deafness Variation Database* ou *LOVD* (*Leiden Open Variation Database*).

Foi coletado material para extração do DNA de seus pais, onde constatamos, pelo sequenciamento de Sanger, a presença da mesma variante em seu pai igualmente afetado pela SW.

O caso dessa paciente está descrito na publicação de Bocángel et al. (2018) com registro de família número 35. Porém, Bocángel et al. (2018) haviam inicialmente detectado na amostra somente a variante c.1195C>G; p.His399Asp; NM_181459. Essa variante, no entanto, se encontra fora dos domínios de pareamento e homeótico do gene *PAX3*. Tem registro RefSNP rs1553568937 e é prevista nos bancos de dados dbSNP, SIFT e *PolyPhen-2* como provavelmente benigna, tolerável e benigna, respectivamente. Apenas a ferramenta de predição de patogenicidade *Mutation taster* classificou a variante como *disease causing*. Porém, os estudos de segregação revelaram que a variante havia sido herdada de sua mãe não afetada, o que permitiu excluí-la como causativa. No nosso estudo, detectamos a variante adicional c.896_897insT; p.Met299Ilefs*111; NM_181459, para a qual os estudos de transmissão indicaram ter sido herdada de seu pai igualmente afetado.

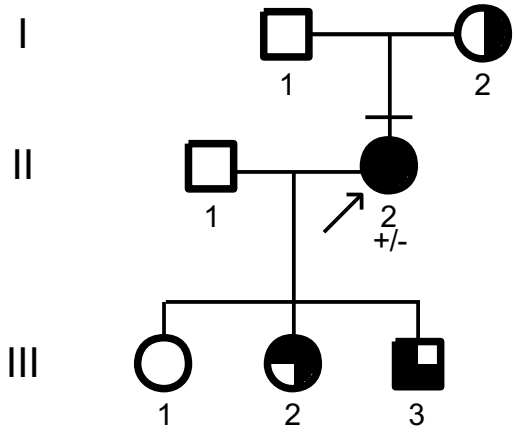
A identificação dessa mutação em *PAX3* indica que a paciente e seu pai têm SW1. A variante encontrada é coerente com o fenótipo exibido por ambos. É também compatível com o diagnóstico ao início do estudo. Variantes patogênicas no gene *PAX3* correspondem a cerca de 90% dos casos de SW1 (PINGAULT et al., 2010).

Figura 23 - Eletroferograma com resultado do sequenciamento convencional da amostra da paciente LGH21 indicando a variante c.896_897insT no gene *PAX3* no programa *Bioedit*.

LGH22

Família de Paraíba do Sul, Rio de Janeiro, com caso familial de SW1. Heredograma apresentado na Figura 24.

Figura 24 - Heredograma da família LGH22.



Propósita (II-2), 43 anos, sexo feminino, com mecha branca frontal, perda auditiva unilateral, heterocromia, íris azul hipoplásica à direita, telecanto e hipoplasia das asas nasais. Os sinais e sintomas apresentados pelos demais membros da família são descritos abaixo:

I-2: mecha branca frontal, heterocromia parcial da íris, mancha no corpo.

III-2: mecha branca frontal, surdez neurossensorial profunda bilateral, heterocromia de íris.

III-3: surdez neurossensorial profunda bilateral, telecanto, hipoplasia de asas nasais, manchas hipopigmentadas no quadrante superior direito do abdome.

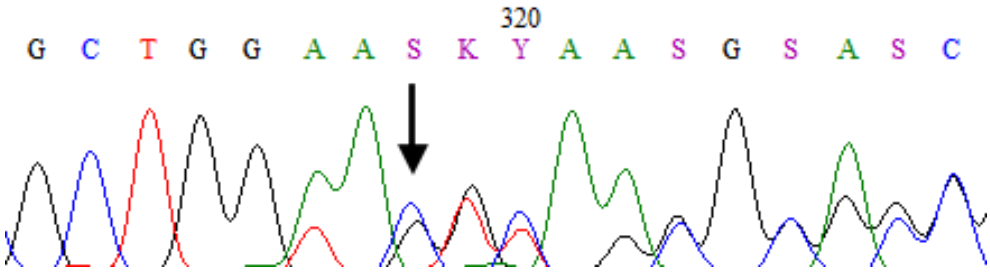
A variante no exon 1 do gene *PAX3* (c.85_85+12delGGTAAGGGAGGGC; p.Val29Cysfs*81; NM_181459) em heterozigose foi encontrada após a filtragem do VCF anotado. A deleção de 13 bases nitrogenadas acomete a última base do éxon 1 e as 12 primeiras bases do intron seguinte. A deleção da guanina "G" final do éxon 1 fazia parte da primeira base do códon para o aminoácido valina na posição 29, que era complementado pelas outras 2 bases presentes no início do éxon 2. Com a deleção, o quadro de leitura é deslocado e a valina é substituída por uma cisteína, gerando um códon de parada prematuro 81 aminoácidos depois.

A variante nunca foi descrita em bancos de dados de indivíduos assintomáticos e é prevista como patogênica por interromper prematuramente a síntese da proteína PAX3. A variante tampouco foi descrita em pacientes com SW e não está presente nos bancos de dados *Deafness Variation Database* ou *LOVD* (*Leiden Open Variation Database*).

O material de seus pais e filhos, no entanto, não foi coletado para extração de DNA, não sendo possível excluir a hipótese de a variante ter sido herdada de sua mãe, que também compartilhava sinais típicos da síndrome e de ser causativa do quadro semelhante presente em sua filha e filho.

A identificação dessa mutação em *PAX3* indica que a paciente tem SW1. A variante encontrada é compatível com o fenótipo exibido e é também compatível com o diagnóstico inicial. Variantes patogênicas no gene *PAX3* correspondem a mais de 90% dos casos de SW1 (PINGAULT et al., 2010).

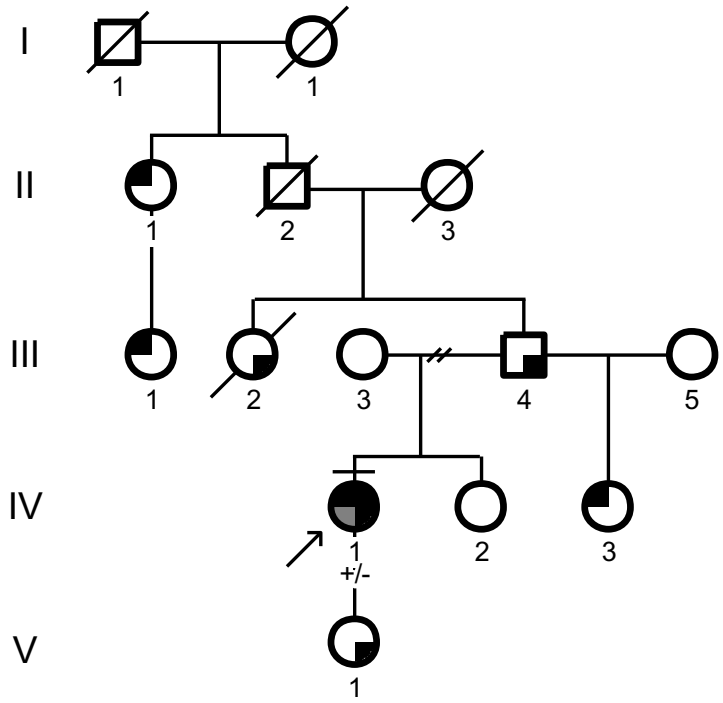
Figura 25 - Eletroferograma com resultado do sequenciamento convencional da amostra da paciente LGH22 indicando a variante c.85_85+12delGGTAAGGGAGGGC no gene *PAX3* no programa *Bioedit*.



LGH23

Família de São Paulo, com caso familial de SW1. Heredograma apresentado na Figura 26.

Figura 26 - Heredograma da família LGH23.



Propósita (IV-1), 44 anos, sexo feminino, com mecha branca frontal, perda auditiva unilateral profunda, heterocromia total, íris azul hipoplásica à esquerda, impressão de telecanto e hipoplasia das asas nasais. Os sinais e sintomas apresentados pelos demais membros da família são descritos abaixo:

II-1: surdez neurossensorial profunda bilateral, olhos azuis claros

III-1: surdez unilateral

III-2: impressão de hipertelorismo, canície

III-4: mecha branca frontal, impressão de hipertelorismo

IV-3: perda auditiva unilateral

V-1: mecha branca frontal

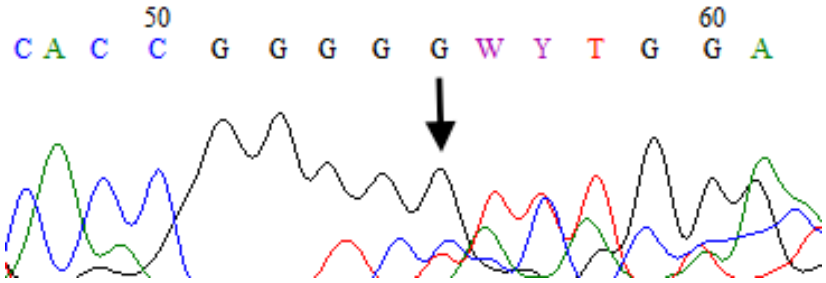
A variante no exon 8 do gene *PAX3* (c.1253_1253delG; p.Gly418Valfs*16; NM_181459) em heterozigose foi encontrada após a filtragem do VCF anotado. A deleção de uma guanina "G" ocorre na segunda base do códon que codifica o aminoácido glicina da posição 418. A deleção desloca o quadro de leitura e a glicina é substituída por uma valina, gerando um códon de parada prematuro 16 aminoácidos depois.

A variante já foi descrita no banco de dados de indivíduos assintomáticos ExAC com contagem de alelos = 1, ou seja, apenas um alelo foi reportado, no banco de dados de populações sul asiáticas, com uma frequência de 0,00006407, sob o RefSNP rs778236891. A variante nunca foi descrita em pacientes com SW e não está presente nos bancos de dados *Deafness Variation Database* ou *LOVD* (*Leiden Open Variation Database*). No entanto, a variante consta no dbSNP com o RefSNP rs778236891, e consta no ExAC, como mencionado anteriormente. Nenhum trabalho publicou a variante ou a relacionou ao fenótipo de SW. É prevista como patogênica por interromper prematuramente a síntese da proteína PAX3, através do deslocamento do quadro de leitura na produção da proteína, gerando uma proteína mais curta que a normal.

O material de seus pais e filha, no entanto, não foi coletado para extração de DNA, não sendo possível excluir com certeza a hipótese de a variante haver sido herdada de seu pai. Esse apresentou mecha branca frontal desde muito cedo, sinal também presente na filha ouvinte da propósita IV-1.

A identificação dessa mutação em *PAX3* indica que a paciente tem SW1. A variante encontrada é coerente com o fenótipo exibido e é também compatível com o diagnóstico inicial. Conforme já mencionado, variantes patogênicas no gene *PAX3* correspondem a cerca de 90% dos casos de SW1 (PINGAULT et al., 2010).

Figura 27 - Eletroferograma com resultado do sequenciamento convencional da amostra da paciente LGH23 indicando a variante c.1253_1253delG no gene *PAX3* no programa *Bioedit*.



O resumo dos achados moleculares das dez famílias acima descritas é apresentado na Tabela 8. Desses casos, apenas a amostra do paciente LGH12 não havia sido previamente avaliada pelo sequenciamento convencional para os genes típicos da SW. Detalhes dos testes moleculares realizados encontram-se descritos na Tabela 5 (página 39).

Durante o desenvolvimento do mestrado de Dias (2018), a amostra LGH12 passou por sequenciamento de nova geração de um painel desenvolvido para análise para genes de surdez que incluía os genes clássicos da SW. A variante encontrada neste estudo não havia sido reportada por Dias (2018). Uma possível explicação para o descarte dessa variante, durante as etapas de filtragem realizada por Dias (2018), é a de que, durante a filtragem dos bancos populacionais no arquivo VCF anotado, não foi tomado o cuidado de se manter variantes anotadas com informação "NA" – *not available*, o que tipicamente ocorre para variantes novas nunca antes descritas. Outra hipótese é a de que Dias (2018) tenha descartado variantes sinônimas, o que certamente faria com que a variante não fosse selecionada.

As amostras dos outros nove pacientes que haviam sido avaliadas previamente pelo sequenciamento convencional não tinham revelado, por esse método, as variantes reveladas neste estudo por meio do sequenciamento massivo paralelo. No caso do paciente LGH13, após a filtragem do VCF anotado, foi encontrada a variante causativa no gene *PAX3*, mas durante a confirmação pelo sequenciamento convencional, a variante não foi detectada repetidas vezes. Os motivos que explicam essa falha podem ser o fenômeno conhecido como *allele dropout* e as peculiaridades inerentes da estratégia *touchdown* utilizada nas reações de PCR deste estudo, como discutidas a fundo na descrição da paciente LGH13.

As outras oito amostras haviam sido avaliadas por meio do sequenciamento convencional durante o mestrado de Bocangél (2014). Nesse estudo, PCR do tipo *Touchdown* não havia sido utilizada. Mesmo utilizando temperatura de anelamento fixa de acordo com a TM para cada par de *primers*, também é possível, que o fenômeno de *allele dropout* tenha ocorrido. A estimativa imprecisa da TM para cada par de *primers* pode ter causado a amplificação de apenas uma fita, fenômeno denominado *allele dropout*, ou o produto final ter qualidade/quantidade não ideais. Em resumo, a detecção das variantes causativas nesses dez casos indicou numerosos eventos de problemas técnicos e falhas das análises anteriores. Nesta análise, foram identificadas quatro variantes patogênicas no gene *PAX3*, quatro no gene *MITF* e duas no gene *SOX10*. Como esperado, variantes no gene *PAX3* estavam presentes apenas nas amostras de pacientes com diagnóstico clínico de SW1.

Tabela 8 - Variantes patogênicas causativas da SW encontradas em 10 probandos.

	Probandos									
	LGH3	LGH5	LGH10	LGH12	LGH13	LGH15	LGH18	LGH21	LGH22	LGH23
Gene	*MITF*	*SOX10*	*SOX10*	*MITF*	*PAX3*	*MITF*	*MITF*	*PAX3*	*PAX3*	*PAX3*
Fenótipo	SW2	SW2	SW2	SW2	SW1	SW2	SW2	SW1	SW1	SW1
RefSeq	NM_198159	NM_006941	NM_006941	NM_198159	NM_181459	NM_198159	NM_198159	NM_181459	NM_181459	NM_181459
Variante - DNA	c.575_575delA	c.13C>T	c.275_276insCC CGT	c.1212G>A	c.115A>G	c.1066C>T	c.910_911delAG	c.896_897insT	c.85_85+12delGG TAAGGGAGGGC	c.1253_1253delG
Variante - Proteína	p.Glu194Argfs*19	p.Gln5*	p.Arg93Profs*18	p.Thr404=	p.Asn39Asp	p.Arg356*	p.Arg304Alafs*10	p.Met299Ilefs*111	p.Val29Cysfs*81	p.Gly418Valfs*16
dbSNP	-	-	-	rs1057521096	-	rs1057517966	-	-	-	rs778236891
Genótipo	Heterozigose	Heterozigose	Heterozigose	Heterozigose	Heterozigose	Heterozigose	Heterozigose	Heterozigose	Heterozigose	Heterozigose
1000 Genomas	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Exome Sequencing Project	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
ExAC	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	0,00006407 (ExAC SAS)
ABraOM	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
ClinVar - classificação	ND	ND	ND	Patogênica	ND	Patogênica	ND	ND	ND	ND
Deafness Variation Database - classificação	ND	ND	ND	Patogênica	ND	Patogênica	ND	ND	ND	Efeito desconhecido
SIFT	NA	ND	NA	NA	Deletéria	ND	NA	NA	NA	NA
PolyPhen-2	NA	ND	NA	NA	Provavelmente patogênica	ND	NA	NA	NA	NA
Mutation Taster	NA / *Disease causing*	*Disease causing*	NA / *Disease causing*	NA / *Disease causing*	*Disease causing*	*Disease causing*	NA / *Disease causing*	NA / *Disease causing*	NA / *Disease causing*	NA / *Disease causing*
Histórico familiar	Isolado	Isolado	Isolado	Isolado	Isolado	Pai, irmãos, tios e tia paternos e tios e tia avó afetados	Mãe, irmão, irmã, um tio e duas tias maternos e avó materna afetados	Pai afetado	Mãe e casal de filhos afetados	Pai e filha afetados
Análise de segregação	Herdada da mãe	NR	NR	NR	*de novo*	Herdada do pai	Herdada da mãe	Herdada do pai	NR	NR

NA – *Not available*; ND – Não descrito; NR – Não realizado; SAS – população sul asiática.

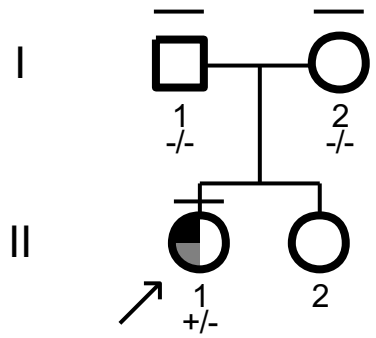
2. Descrição dos resultados de seis casos submetidos à análise de trios.

Para os indivíduos que eram casos isolados e cuja análise preliminar dos exomas não revelou variantes candidatas para explicar o quadro e para os quais havia disponível DNA dos genitores, foi feita uma análise comparativa dos trios probando-pai-mãe em busca de variantes *de novo*. Nesses casos, foram filtradas as variantes presentes em heterozigose no probando. Foram consideradas somente variantes com contagem de alelos (*allelic count* – AC) igual a 1, medida que implica que somente as variantes presentes no probando e ausentes em ambos os genitores foram selecionadas. Variantes com frequência igual ou inferior a 1 % nos bancos de dados foram selecionadas, tomando-se o cuidado para não excluir aquelas cuja informação não estava disponível (NA – *not available*). Destas, apenas as variantes exônicas, exônicas/*splicing* e *splicing* presentes no probando com mais de 10 *reads* foram avaliadas. Foram excluídas variantes presentes nos chamados genes hipervariáveis, com base em uma lista de 2157 genes, conforme (FUENTES FAJARDO et al., 2012). As variantes que preenchiam os critérios acima também foram avaliadas quanto ao fenótipo OMIM e quanto à previsão de patogenicidade.

LGH1

Família de Riberão Pires, São Paulo, com caso isolado de SW1. Heredograma apresentado na Figura 28. A família foi averiguada e descrita na dissertação de Pardono (1999).

Figura 28 - Heredograma da família LGH1.



Propósita (II-1), 44 anos, sexo feminino, apresenta: surdez profunda bilateral, anomalia de Mondini, hiperplasia da parte medial de sobrancelhas, tendência a telecanto [distância intercantal interna (DII) acima do percentil 97,5; distância intercantal externa (DIE) e bipupilar (DBP) aumentadas], índice $W = 2{,}02$, estrabismo divergente, íris azuis, ponte nasal alta e larga.

A amostra foi analisada em comparação com as amostras de seus pais, o que revelou variantes candidatas novas presentes apenas na probanda (Tabela 9).

Tabela 9 - Variantes candidatas não herdadas encontradas na probanda LGH1.

	LGH1				
Gene	*NCL*	*PCDHB14*	*ERICH1*	*TBC1D3*	*ACTG1*
Fenótipo OMIM	ND	ND	ND	ND	Síndrome de Baraitser-Winter tipo 2
RefSeq	NM_005381	NM_018934	NM_20733	NM_001123391	NM_001614
Variante - DNA	c.750_752delTCG	c.1780G>A	c.292G>C	c.984C>T	c.277G>A
Variante - Proteína	p.250_251del	p.Gly594Ser	p.Arg93Profs*18	p.Phe328=	p.Glu93Lys
dbSNP	rs66781921	rs77771848	-	rs763923729	-
Genótipo	Heterozigose	Heterozigose	Heterozigose	Heterozigose	Heterozigose
1000 Genomas	0,001597	0	0	0	0
Exome Sequencing Project	0,004	0	0	0	0
ExAC	0,0027	NA	NA	0,0023	NA
ABraOM	5	0	0	4	0
ClinVar - classificação	ND	ND	ND	ND	ND
Deafness Variation Database - classificação	ND	ND	ND	ND	ND
SIFT	NA	Tolerável	Deletéria	ND	ND
PolyPhen-2	NA	Benigna	Provavelmente patogênica	ND	Provavelmente patogênica
Mutation Taster	NA	Polimorfismo	Polimorfismo	ND	*Disease causing*
Histórico familiar			Isolado		
Análise de segregação			*de novo*		

NA – Not available; ND – Não descrito.

Dentre as variantes encontradas, chamou atenção a variante no gene *ACTG1*, que codifica a gama-actina, proteína não muscular presente em todas as estruturas que contêm actina nas células ciliadas da orelha interna (estereocílios, placa cuticular e junções aderentes) e em células intestinais (HÖFER; NESS; DRENCKHAHN, 1997; KHAITLINA, 2001). Como as células ciliadas cocleares não possuem capacidade regenerativa, eventos mutacionais do gene da gama-actina podem ter grande impacto na audição, em comparação às repercussões no epitélio intestinal, que se encontra em constante renovação. A actina interage com muitas outras proteínas, várias das quais ligadas ao sentido da audição, como as miosinas. É altamente conservada, ligando-se a outras proteínas para desempenhar diversas funções de movimento, de dar suporte a estruturas celulares e regular respostas celulares em diversos tecidos (ZHU et al., 2003).

A gama-actina foi relacionada à surdez não-sindrômica progressiva bilateral neurossensorial com padrão de herança autossômica dominante dos lócus DFNA20/26 (MIM #604717) (ZHU et al., 2003). Yang e Smith (2000) descreveram, em um resumo de congresso com dados que não chegaram a ser publicados, duas famílias americanas com surdez progressiva autossômica dominante e mapearam esse lócus no cromossomo 17q25, denominando-o DFNA26 (apud DEWAN; PARRADO; LEAL, 2003), com sobreposição ao lócus DFNA20 mapeado por Morell et al. (2000). Dewan; Parrado e Leal (2003) relataram outra família americana com perda auditiva bilateral autossômica dominante mapeando em 17q25.3, numa região contida entre os dois lócus, reduzindo-se assim a região para 6,05 cM. Os autores propuseram que a perda auditiva associada a esses dois lócus resulta, provavelmente, de alterações em apenas um gene situado em regiões que se sobrepõem e que provavelmente não constituem lócus separados. A identificação de variantes patogênicas no gene *ACTG1* nas famílias reportadas por Yang e Smith (2000) e Dewan; Parrado e Leal (2003) foi feita por Zhu et al. (2003), que estabeleceram de uma maneira definitiva que os lócus DFNA20 e DFNA26 são idênticos. A gama-actina foi também relacionada à surdez sindrômica com a síndrome de Baraitser-Winter tipo 2 (SBW2 OMIM #614583) (RIVIÈRE et al., 2012).

A síndrome de Baraitser-Winter (SBW), que possui poucos casos descritos na literatura, foi descrita em 1988 (BARAITSER; WINTER, 1988), caracterizando-se pela combinação de coloboma de íris, ptose bilateral, hipertelorismo, ponte nasal larga e dobra epicântica proeminente. Com a descrição de novos casos, o seu espectro fenotípico, além de haver ampliado, ficou mais bem caracterizado. Os defeitos crânio-faciais são variáveis (moderados a graves). A parte mediana da face é ampla com base nasal larga. O nariz é curto, possui ponte nasal larga com narinas antevertidas e com a ponta nasal igualmente larga. O filtro é longo e pouco marcado. Há retrognatia, palato alto e, em alguns casos, fenda lábio-palatina. A ptose palpebral é frequente, podendo ou não estar acompanhada de epicanto. As sobrancelhas arqueadas são também frequentes, com o arqueamento aumentando com a idade e sendo evidenciado quando o paciente levanta as pálpebras. O coloboma de íris é comum; microftalmia está presente apenas em uma minoria dos casos. As orelhas geralmente são pequenas, rotadas posteriormente, com antihélice pouco desenvolvida. Alguns pacientes apresentam déficit auditivo de grau variável. Defeitos musculares e articulares, como redução da massa muscular da cintura escapular, artrogripose congênita e rigidez articular progressiva, também podem estar presentes, evidenciando que actinas não musculares estão também, de alguma maneira, relacionadas ao desenvolvimento e à manutenção da musculatura esquelética. Repercussões

neuropsicomotoras são variáveis: crianças com arquitetura cerebral preservada tiveram atraso motor, com comprometimento apenas leve ou moderado do desenvolvimento neurológico; pacientes com distúrbio de migração neuronal tiveram o desenvolvimento neuro-psico-motor conspicuamente atrasado, com os casos com lisencefalia apresentando deficiência intelectual (DI) profunda e os casos com paquigiria anterior apresentando DI moderada. Esses dois defeitos cerebrais, a paquigiria e a lisencefalia, estão presentes em quase 70% dos afetados, apresentando geralmente correlação com variantes patogênicas do gene *ACTG1*. Agenesia do corpo caloso é outro defeito que pode estar presente nos afetados, associada ou não a outros defeitos cerebrais. Metade dos pacientes apresentam microcefalia, geralmente leve e de instalação pós-natal. A epilepsia é comum, geralmente ocorrendo em pacientes sem paquigiria ou outros defeitos estruturais cerebrais. A surdez neurossensorial foi relatada em muitos pacientes, com exame de imagem constatando frequentemente a presença de malformação coclear. São descritos também nos afetados baixa estatura, *pectus excavatum* e cardiopatia congênita. Apesar de não existirem ainda critérios mínimos estabelecidos para o diagnóstico clínico da SBW, os fenótipos faciais são os mais indicativos. Os defeitos resultantes de migração neural anormal e o coloboma de íris, quando de ocorrência isolada, são sinais apenas sugestivos da síndrome (VERLOES et al., 2015).

Assim como a SW, a SBW tem expressão clínica muito variável, o que dificulta muitas vezes o seu diagnóstico, principalmente antes da descoberta da sua alteração molecular, nos genes relacionados à actina. Assim sendo, muitos pacientes reavaliados mais recentemente haviam sido diagnosticados como afetados pelas síndromes de Noonan (OMIM #163950) ou de Waardenburg, devido à sobreposição dos espectros clínicos correspondentes, sendo as sobrancelhas arqueadas e nariz largo, porém curto, presentes na SBW, os sinais principais na distinção entre a SWB e a síndrome de Noonan (VERLOES et al., 2015) e a surdez e as medidas alteradas da região orbitária, comuns tanto à SBW como à SW.

A SBW tipo 1 é causada por variantes patogênicas *de novo* no gene *ACTB* e a SBW2 por variantes patogênicas no gene *ACTG1*. Os genes *ACTB* e *ACTG1* codificam, respectivamente, as actinas não musculares beta-actina e gama-actina, sendo a SBW o principal fenótipo associado às variantes patogênicas nesses genes (RIVIÈRE et al., 2012). Existe um caso publicado de uma variante patogênica do gene *ACTG1* segregando em 3 gerações de uma família em que alguns dos afetados possuíam o fenótipo completo da SBW2, enquanto outros exibiam apenas a perda auditiva (KEMERLEY et al., 2017). A surdez sindrômica, na SBW,

tem sido relatada em associação a variantes patogênicas com mecanismo provável de ganho de função ou efeito dominante negativo, presentes em ambos os genes citados acima. Nunca foi descrito um paciente com deleção ou mutação que levasse a proteína truncada, afastando-se assim a hipótese de haploinsuficiência (RIVIÈRE et al., 2012). Os casos com surdez não sindrômica foram descritos em associação apenas a variantes patogênicas que levam à perda de função, somente no gene *ACTG1* (VERLOES et al., 2015).

A variante no exon 3 do gene *ACTG1* (c.277G>A; p.Glu93Lys; NM_001614) em heterozigose foi encontrada na probanda durante a análise de trios. A substituição de uma guanina "G" por uma adenina "A" ocorre na primeira base do códon que codifica o aminoácido glutamato da posição 93, sendo substituído por uma lisina. A variante nunca foi descrita em bancos de dados de indivíduos assintomáticos e é prevista como patogênica pelas ferramentas de predição de patogenicidade *Polyphen-2* e *Mutation taster*. A variante tampouco foi descrita em pacientes com SBW e não está presente nos bancos de dados *Deafness Variation Database* ou *LOVD* (*Leiden Open Variation Database*). O fato de se tratar de uma mutação de sentido trocado (*missense*) permite especular os possíveis mecanismos de ganho de função ou efeito dominante negativo. De acordo com a literatura, as mutações *missense* levam a quadros sindrômicos. De fato, a paciente, além da surdez dava a impressão de apresentar, à vista desarmada, telecanto. A hipótese diagnóstica anterior de SW1 foi baseada na ocorrência do fenótipo de surdez com a impressão de telecanto, com índice *W* de 2,02, valor contido na zona de indecisão diagnóstica entre SW1 e SW2 que vai de 1,95 a 2,07 (READ; NEWTON, 1997). Pacientes com SW2 podem, apesar de menos frequentemente, ter valor de índice *W* acima de 1,95, principalmente quando há hipertelorismo. Além disso, as íris azuis exibiam manchas marrons que circundavam a borda pupilar, dando uma falsa impressão de heterocromia parcial bilateral. Essa hipótese, no entanto, já havia sido refutada após avaliação oftalmológica apropriada.

Estratégias de sequenciamento de nova geração do exoma de trios mostram-se ferramentas poderosas no diagnóstico de síndromes esporádicas como a SBW (ALLAWH; BROWN, 2016; JOHNSTON et al., 2013; RIVIÈRE et al., 2012). Há vários históricos de diagnósticos errôneos prévios ao diagnóstico da SBW, acertados após análise molecular, o que demonstra como a tecnologia de NGS, ao revelar as bases moleculares de diagnósticos definidos clinicamente, tem o poder de reavaliar a nosologia em muitas doenças do desenvolvimento (VERLOES et al., 2015). Os resultados do sequenciamento de nova geração,

combinados aos estudos de segregação, têm permitido encontrar os fenótipos a se analisar, fenômeno conhecido como fenotipagem reversa. Variantes sugestivas encontradas a partir dessas análises indicam um fenótipo que pode não ter sido visto *a priori*, indicando a necessidade de uma avaliação clínica retrospectiva. Da mesma forma, a identificação de fenótipos que ainda virão a se expressar no indivíduo podem ser avaliados (FERNANDEZ-MARMIESSE; GOUVEIA; COUCE, 2018). Ao fazer essa análise retrospectiva, foi possível constatar que a probanda apresentava outros sinais da SBW como a porção mediana da face ampla, hiperplasia medial de sobrancelhas, dobra epicântica, visto que a paciente apresentava DII, DIE e DBP aumentadas, a ponte, base e ponta nasal larga, filtro longo e liso, terminando em uma fina borda vermelha do lábio e retrognatia (Figura 29), o que contribuiu para a conclusão que, de fato, apresenta a SBW2.

Figura 29 - Probanda LGH1. (A) Dobra epicântica, vista lateral, orelhas posteriormente rotadas e retrognatia. (B) Parte mediana da face ampla, hiperplasia medial de sobrancelhas, dobra epicântica, hipertelorismo, ponte, base e ponta nasal larga, filtro longo e liso, terminando em uma fina borda vermelha do lábio. (C) Estrabismo, epicanto e ausência de coloboma e de heterocromia de íris.

Foi coletado material para extração do DNA de seus pais, onde confirmamos, pelo sequenciamento de Sanger, a ausência da variante em ambos. A variante é, portanto, *de novo*.

2.1 Descrição conjunta dos demais cinco casos submetidos à análise de trios.

Os resultados do estudo dos outros 5 pacientes que integraram a análise de trios serão apresentados em conjunto. As variantes novas, não herdadas, encontram-se descritas na Tabela 10. Todas as variantes foram encontradas em heterozigose e em apenas uma delas notou-se potencial causativo que pudesse explicar pelo menos algum sinal clínico presente no paciente, mas não o espectro fenotípico completo. A variante no gene *PRAG1* tem potencial de explicar apenas a despigmentação de cabelos do paciente LGH7 que apresentava canície. O gene já foi associado à via de sinalização NOTCH, sendo um componente crítico no desenvolvimento e na tumorigênese (WEAVER et al., 2014). A via de sinalização NOTCH é reguladora do desenvolvimento devido à função de determinar o destino celular através da regulação de programas transcricionais envolvidos na proliferação, diferenciação, renovação e apoptose celular. O nocaute do gene *PRAG1* em camundongos é letal quando em homozigose. Em células de linfócito T, tanto o produto do gene *PRAG1* quanto o complexo NOTCH1 são expressos no núcleo e se unem ao DNA. Com experimentos *in vivo* e *in vitro*, os autores postularam que o produto do gene *PRAG1* atua como regulador da transcrição NOTCH (WEAVER et al., 2014). Ainda, o receptor NOTCH1 já foi relacionado, em camundongos nocaute, com a influência no processo da canície em pelos (SCHOUWEY et al., 2007). A sinalização NOTCH é também fundamental para a sobrevivência de melanoblastos e células-tronco de melanócitos. Falhas na sinalização da via acarretam, em camundongos, defeitos de pigmentação de pelos, seguido de canície (MORIYAMA et al., 2006). Devido a esses estudos, outros autores já hipotetizaram se a via NOTCH poderia manter os melanócitos através da regulação de *MITF,* sugerindo uma intrincada rede de interações entre vias sinalizadoras como a KIT e EDNRB, ao invés de uma via linear única (HOU; PAVAN, 2008).

Também chamou nossa atenção a presença de variante no gene *OTOG*, que já foi associado a surdez não sindrômica autossômica recessiva (SCHRADERS et al., 2012). A variante sinônima c.7011C>T; p.Thr2337=; NM_001277269, em heterozigose, encontrada na paciente LGH2, não explica, portanto, seu quadro de surdez.

As demais variantes estão associadas a síndromes com características clínicas muito distintas da SW, o que torna improvável sua relação com a doença.

Os heredogramas das famílias LGH2, LGH4, LGH7, LGH11 e LGH14 encontram-se no Anexo B. Os indivíduos LGH2, LGH7 e LGH11 também tiveram seu material investigado

para detectar alterações cromossômicas por microarranjo genômico (*Array*-CGH), e os resultados foram considerados normais.

Tabela 10 - Variantes filtradas não herdadas encontradas em 5 probandos submetidos à análise de trio.

Gene	Fenótipo OMIM	RefSeq	Variante - DNA	Variante - Proteína	dbSNP	1000 Genomas	*Exome Sequencing Project*	ExAC	ABraOM	ClinVar - classificação	Deafness Variation Database - classificação	SIFT	*PolyPhen-2*	*Mutation Taster*
LGH2														
TNN	ND	NM_022093	c.3799A>T	p.Ile1267Phe	-	0	0	NA	0	ND	ND	Deletéria	Possivelmente patogênica	*Disease causing*
HMCN1	Degeneração macular relacionada à idade, 1, AD	NM_031935	c.2351A>G	p.Lys784Arg	-	0	0	NA	0	ND	ND	Tolerável	Benigna	Polimorfismo
MTBP	ND	NM_022045	c.1339+2T>G	-	-	0	0	NA	0	ND	ND	ND	ND	*Disease causing*
OTOG	Surdez não sindrômica AR	NM_001277269	c.7011C>T	p.Thr2337=	rs562104032	0,000199	0	NA	0	ND	Efeito desconhecido	NA	NA	NA / *Disease causing*
GOLGA6L3	ND	NM_001310153	c.717G>T	p.Gln239His	rs372171595	0	0	NA	0	ND	ND	NA	NA	NA
ZNF233	ND	NM_181756	c.675T>C	p.His675=	-	0	0	NA	0	ND	ND	NA	NA	NA
LGH4														
LOR	Síndrome de Vohwinkel com ictiose, AD	NM_000427	c.586T>G	p.Cys196Gly	rs142603426	0	0	0	0	ND	ND	ND	Benigna	Polimorfismo
ATM	Ataxia-telangiectasia, AR; Susceptibilidade ao câncer de mama, AD	NM_000051	c.2491G>A	p.Asp831Asn	rs1060501595	0	0	NA	0	Significado incerto	ND	Deletéria	Benigna	Polimorfismo
ZNF846	ND	NM_001077624	c.428A>G	p.Glu143Gly	rs781170385	0	0	0,00828	0	ND	ND	Deletéria	Benigna	Polimorfismo
SIGLEC16	ND	NM_001348364	c.847G>A	p.Asp283Asn	-	0	0	NA	0	ND	ND	NA	NA	NA
SIGLEC16	ND	NM_001348364	c.870C>T	p.His290=	rs779586136	0	0	0,0002	0	ND	ND	NA	NA	NA
MBTPS2	Síndrome de Olmsted; Síndrome IFAP com ou sem síndrome de BRESHECK; Queratose folicular espinulosa decalvante; Osteogênese imperfeita, LXR	NM_0158884	c.307G>A	p.Ala103Thr	rs146730876	0,00053	0,0009	0,0006	0	ND	ND	Tolerável	Benigna	*Disease causing*

AD – Autossômico Dominante; AR – Autossômico Recessivo; LXR – Ligado ao X Recessivo; NA – Not available; ND – Não descrito.

Tabela 10 (continuação) –Variantes filtradas não herdadas encontradas em 5 probandos submetidos à análise de trio.

Gene	Fenótipo OMIM	RefSeq	Variante - DNA	Variante - Proteína	dbSNP	1000 Genomas	*Exome Sequencing Project*	ExAC	ABraOM	ClinVar - classificação	Deafness Variation Database - classificação	SIFT	*PolyPhen-2*	*Mutation Taster*
						LGH7								
SIMC1	ND	NM_198567	c.80C>T	p.Pro27Leu	rs75304783	0	0	NA	0	ND	ND	Tolerável	Benigna	*Disease causing*
GUSB	Mucopolissacari dose VII, AR	NM_000181	c.1251C>G	p.Phe417Leu	-	0	0	NA	0	ND	ND	Tolerável	Benigna	Polimorfismo
PRAG1	ND	NM_001080826	c.3583G>A	p.Ala1195Thr	-	0	0	NA	0	ND	ND	ND	Benigna	Polimorfismo
EP400	ND	NM_015409	c.4856-3C>T	NA	-	0	0	NA	0	ND	ND	NA	NA	NA
USPL1	ND	NM_005800	c.1272A>T	p.Glu424Asp	rs770423148	0	0	NA	0	ND	ND	Deletéria	Benigna	*Disease causing*
NPIPB6	ND	NM_001282524	c.856G>A	p.Glu286Lys	rs747566858	0	0	0,00002	0	ND	ND	Deletéria	Provavelmente patogênica	Polimorfismo
THOC1	ND	NM_005131	c.1420G>A	p.Ala474Thr	-	0	0	NA	0	ND	ND	Tolerável	Possivelmente patogênica	*Disease causing*
GABRA3	ND	NM_000808	c.1019G>T	p.Trp340Leu	-	0	0	NA	0	ND	ND	Tolerável	Benigna	*Disease causing*
ZFY	ND	NM_003411	c.153T>C	p.Thr51=	-	0	0	NA	0	ND	ND	NA	NA	NA
						LGH11								
CFAP74	ND	NM_001304360	c.41T>C	p.Leu14Ser	-	0	0	NA	0	ND	ND	Deletéria	Possivelmente patogênica	Polimorfismo
PTPRU	ND	NM_133177	c.2824C>T	p.Arg942Trp	rs564512646	0,0002	0	0,03352	0	ND	ND	Tolerável	Provavelmente patogênica	*Disease causing*
HERC1	Macrocefalia, fácies dismórfica e atraso psicomotor, AR	NM_003922	c.13651C>T	p.Pro4551Ser	-	0	0	NA	0	ND	ND	Deletéria	Provavelmente patogênica	*Disease causing*
DENND4A	ND	NM_001320835	c.4669G>A	p.Glu1557Lys	-	0	0	NA	0	ND	ND	Deletéria	Benigna	*Disease causing*
CEP89	ND	NM_032816	c.471C>T	p.Tyr157=	rs766868554	0	0	0,0012	2	ND	ND	NA	NA	NA
						LGH14								
FSIP2	ND	NM_173651	c.5515A>G	p.Ile1839Val	rs201710369	0	0	0,0002	0	ND	ND	Tolerável	ND	Polimorfismo
DHRS7	ND	NM_016029	c.664G>T	p.Ala222Ser	-	0	0	NA	0	ND	ND	Tolerável	Benigna	Polimorfismo
TAOK2	ND	NM_004783	c.2552C>A	p.Thr851Lys	-	0	0	NA	0	ND	ND	Deletéria	Possivelmente patogênica	*Disease causing*

AR – Autossômico Recessivo; NA – Not available; ND – Não descrito.

Após obtenção da lista de variantes filtradas (Tabela 10) após a estratégia de comparação de trios, foi investigada se havia correspondência entre a lista dos genes encontrados com variantes em cada probando com os genes encontrados nas amostras de outros probandos que passaram por essa mesma análise, com o objetivo de encontrar genes novos alterados em comum entre probandos. Nenhum gene com variantes *de novo* foi compartilhado entre os probandos que compuseram essa análise.

Em resumo, a análise de trios possibilitou, portanto, que um caso fosse solucionado e que um gene ganhasse alguma relevância para futuras investigações de sua relação causativa com pelo menos um dos sinais da SW, a canície. O caso solucionado, no entanto, revelou não ser um caso de SW, mas possibilitou que o correto diagnóstico fosse encontrado. A síndrome em questão da paciente LGH1 era a síndrome de Baraitser-Winter tipo 2, condição rara de mecanismo autossômico dominante causada por variantes patogênicas no gene *ACTG1*, cuja literatura já apontava casos de diagnósticos errôneos acertados após análise de trios (VERLOES et al., 2015). O gene potencialmente relacionado à canície, no paciente LGH7, é o *PRAG1*, cujas evidências de estudos *in vivo* e *in vitro* (MORIYAMA et al., 2006; SCHOUWEY et al., 2007; WEAVER et al., 2014) o tornam um bom candidato a ser futuramente estudado.

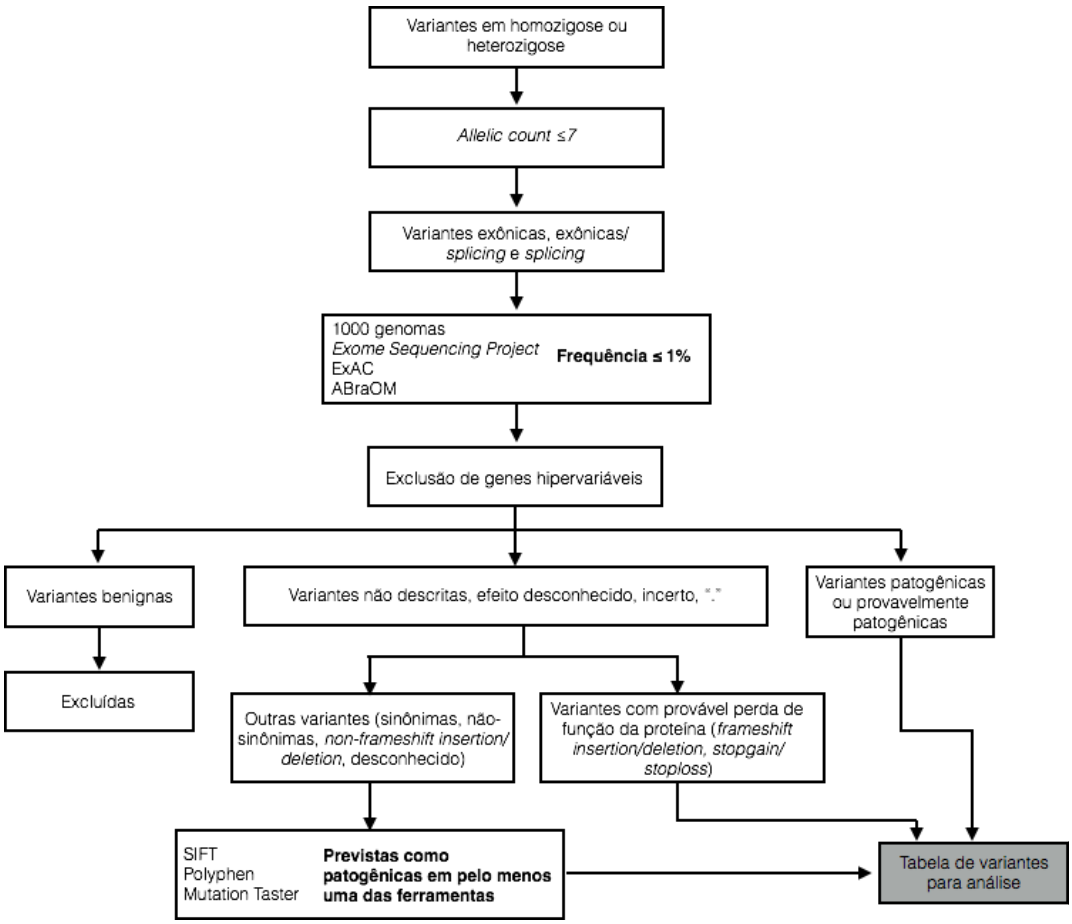
Alguns estudos relatam uma redução de até 10 vezes no número de variantes candidatas filtradas e um aumento do rendimento diagnóstico proporcionado pela análise de trios, quando comparado com o sequenciamento massivo em paralelo do exoma em casos isolados (FERNANDEZ-MARMIESSE; GOUVEIA; COUCE, 2018; WRIGHT et al., 2015). No nosso estudo analisamos seis trios, dos quais apenas um foi completamente solucionado. Possíveis explicações para o baixo rendimento diagnóstico incluem (1) a possibilidade de a variante causativa estar presente em um dos genitores, com penetrância incompleta ou expressividade reduzida, o que excluiria a variante durante a filtragem. (2) Variantes no número de cópias, para as quais a técnica de sequenciamento do exoma não demonstra performance adequada de detecção devido à natureza não adjacente das sequências dos exons capturados (FROMER et al., 2012). (3) Variantes causativas em regiões do genoma não cobertas pela técnica de sequenciamento do exoma. A possibilidade de penetrância incompleta e expressividade reduzida contradiz a ideia de o mecanismo *de novo*, crucial para que a análise de trio seja feita com sucesso. Essa análise reforça a importância do detalhamento fenotípico de todos os indivíduos em estudo, mesmo dos pais aparentemente não afetados, afim de afastar qualquer possibilidade de variabilidade na expressão fenotípica dos pais em comparação ao filho afetado

(ADAMS; ENG, 2018; SEABY; PENGELLY; ENNIS, 2016). As variantes de número de cópias provavelmente não tiveram forte influência na não detecção da variante causativa nas amostras submetidas à análise de trios, pois dos cinco casos não solucionados, três contavam com teste de *Array*-CGH realizado, com resultados normais. A possibilidade de a variante causativa estar presente em região não coberta pelo sequenciamento do exoma deve ser considerada. Há relato na literatura de variante em região não codificadora com atividade de *enhancer* do gene *SOX10* exibindo o fenótipo de SW4 (BONDURAND et al., 2012). Sequenciamento do genoma completo poderia revelar variações presentes em regiões regulatórias diversas e *enhancers* que poderiam explicar o quadro.

3. Descrição dos resultados do estudo de 14 casos sem variante detectada após sequenciamento do exoma.

Nos casos em que as duas abordagens descritas anteriormente não indicaram variantes candidatas a explicar os quadros clínicos, a filtragem foi refeita com uma outra abordagem. Foram filtradas variantes em heterozigose ou homozigose no probando, com contagem de alelos (*allelic count* – AC) inferior ou igual a 7. Foram filtradas somente variantes exônicas, exônicas/*splicing* e de *splicing*. Foram selecionadas variantes com frequências abaixo ou igual a 1% nos bancos de dados descritos, tomando-se o cuidado para não excluir aquelas cuja informação não estava disponível (NA – *not available*). Foram excluídas variantes presentes nos chamados genes hipervariáveis, conforme descrito anteriormente. Variantes classificadas pelo ClinVar como benignas ou provavelmente benignas foram excluídas. Variantes classificadas como patogênicas ou provavelmente patogênicas foram incluídas em tabela de variantes para análise. Dentre as variantes com classificação "efeito desconhecido", "não descrito", "incerto" etc, foram selecionadas para análise aquelas com provável perda de função da proteína (*frameshift insertion/deletion*, *stopgain/stoploss*). Das variantes restantes, apenas aquelas classificadas como patogênicas por pelo menos uma das ferramentas de predição de patogenicidade citadas foram também incluídas na tabela de variantes para análise, conforme apresentado na Figura 30. Os heredogramas das famílias LGH6, LGH8, LGH9, LGH16, LGH17, LGH19, LGH20, LGH24 e LGH25 encontram-se no Anexo C. Um resumo das variantes candidatas encontradas em cada paciente em todas as análises feitas encontra-se no Anexo F.

Figura 30 - Etapas da filtragem de variantes.



3.1 Análise de genes em comum listados como contendo variantes.

Todos os genes em comum listados na tabela de variantes filtradas com três ocorrências ou mais entre as amostras dos 14 pacientes submetidos a essa análise foram representados na Tabela 11.

Tabela 11 - Genes em comum contendo variantes filtradas entre os 14 indivíduos sem a variante causativa identificada nas análises preliminares.

	LGH2	LGH4	LGH6	LGH7	LGH8	LGH9	LGH11	LGH14	LGH16	LGH17	LGH19	LGH20	LGH24	LGH25	Ocorrências
AGAP4				■	■			■	■	■		■			6
ATP8B3			■			■				■		■			4
ZFHX3			■					■	■	■					4
ARHGAP23	■			■						■					3
ERBB3	■		■	■											3
IGSF3	■	■		■											3
NCOR2	■										■	■			3
P4HA3	■							■						■	3
TTC28	■		■					■							3
CLEC11A		■	■							■					3
GSE1		■	■											■	3
HTT			■		■					■					3
NRXN3			■	■							■				3
STOX2			■										■	■	3
VPS13B			■						■					■	3
HLA-DRB5		■			■		■								3
SPAG4		■					■						■		3
BMP2K										■		■	■		3
KIR2DL3					■			■		■					3
TMEM206		■								■				■	3
FOXM1								■			■		■		3
POTEM									■		■			■	3
TMEM247						■			■		■				3
KMT2C						■			■			■			3
LILRB2						■			■			■			3
NCOA6									■			■	■		3
USP17L20								■				■	■		3
ACTL7A		■			■				■						3
GGT1				■					■					■	3
PRTG					■	■			■						3

Variantes no gene *AGAP4* foram detectadas em seis pacientes. A variante c.1195C>T; p.Arg399Cys; NM_001291379 foi a mesma detectada nos indivíduos LGH7, LGH14, LGH17, LGH20. A variante não está descrita nos bancos de dados populacionais ExAC, *Exome*

Sequencing Project, e 1000 genomas, mas tem contagem de 7 alelos no banco de dados de população brasileira ABraOM. Há pouca literatura sobre o gene, no entanto, em um estudo recente, o gene *AGAP1*, da mesma família, foi associado à perda auditiva nas altas frequências em camundongos (INGHAM et al., 2019; SHIBA; RANDAZZO, 2014). A alta frequência no ABraOM torna pouco provável que a variante esteja relacionada à SW.

Variantes no gene *ATP8B3* foram detectadas em quatro pacientes. Nenhuma das variantes foi repetida e também não ocorreram no mesmo exon. Em camundongos, o gene é expresso nos acrossomos de espermátides e associado a organelas de membrana citoplasmática como Golgi e retículo endoplasmático em células não espermáticas. A proteína afetada causa distribuição fosfolipídica anormal na camada externa da membrana bilipídica dos espermatozoides (GONG et al., 2009; WANG; BESERRA; GARBERS, 2004).

Variantes no gene *ZFHX3* foram detectadas em quatro pacientes. Nenhuma das variantes foi repetida, mas duas ocorreram no exon 8. O gene suprime a expressão do gene que codifica a alfa-fetoproteína e já foi estabelecido como fator de supressão tumoral no câncer de próstata (HU et al., 2019; NINOMIYA et al., 2002; SUN et al., 2005).

O gene *ARHGAP23* teve 3 ocorrências, nas quais, nos pacientes LGH2 e LGH7, a posição do aminoácido afetado, 640, foi a mesma. Na paciente LGH2 a variante foi c.1919G>A; p.Arg640His, enquanto que no paciente LGH7 a variante foi c.1918C>A; p.Arg640Ser. A primeira variante tem frequência de 0,0004 no banco de dados de populações de europeus-não-finlandeses ExAC e de 0,000798722 no banco de dados 1000 genomas, não sendo descrita no *Exome Sequencing Project* e nem no ABraOM. A segunda variante não foi descrita em nenhum banco de dados. Sua proteína já foi descrita como parte de um complexo relacionado a migração celular (ZHANG et al., 2016). No entanto, não há evidencias de que essa migração esteja relacionada de alguma forma com a migração de células da crista neural. Esse complexo inibe RhoA, que é uma pequena proteína sinalizadora Rho GTPase com papel no remodelamento do citoesqueleto, migração, adesão etc (OSAKI, 2015). A inibição de RhoA causa uma desorganização da actomiosina, que é um complexo formado entre atina e miosina. Esse complexo com propriedades contráteis tem papel na extrusão celular e na manutenção da barreira superficial protetiva (ROSENBLATT; RAFF; CRAMER, 2001). Um estudo utilizando camundongos de linhagem específica com inativação de Cdc42 (um tipo de Rho GTPase) nas células que dão suporte às células ciliadas externas e com consequente defeito nas dinâmicas da actina evidenciou que falhas no processo de extrusão celular deixam espaços por onde a

endolinfa extravasa para o epitélio sensorial. Células ciliadas externas e neurônios que as inervam são vulneráveis ao vazamento de endolinfa. Ainda, o estudo evidencia a importância do ambiente celular no direcionamento e remoção de células ciliadas em apoptose (ANTTONEN et al., 2014). Essas relações tornam o gene um candidato a se considerar para explicar o quadro de surdez nos pacientes.

O gene *ERBB3* apresentou três ocorrências, das quais uma mesma variante esteve presente nos pacientes LGH6 e LGH7. A variante c.89C>T; p.Pro30Leu; NM_001005915 tem frequência abaixo de 1% em vários bancos populacionais do ExAC, com frequência global de 0,0021. No *Exome Sequencing Project* existe na frequência de 0,0015, no 1000 genomas, de 0,0009984 e no ABraOM em 4 alelos. Stankovic et al. (2004) mostraram evidências da relação entre as neuregulinas (NRG), seus receptores ERBB e a audição em camundongos. A NRG1 é expressa pelos neurônios ganglionares espirais, enquanto que os receptores ERBB2 e ERBB3 são expressos nas células suporte do órgão de Corti. Em camundongos com expressão de uma mutação de uma forma dominante negativa do receptor, foi observada perda auditiva profunda e perda pós-natal de 80% dos neurônios ganglionares espirais, sem perda das células sensoriais com que fazem contato. Essas evidências também revelam a possível relação com o quadro de surdez dos pacientes. Ainda, a amostra do indivíduo LGH19 continha a variante c.1988G>A; p.Arg663Gln; NM_001289936 no gene *ERBB2* classificada como provavelmente patogênica pelo ClinVar. A variante nunca foi descrita nos bancos de frequência populacionais.

Variantes no gene *IGSF3* foram detectadas em três pacientes, dos quais nenhum apresentou a mesma variante. O gene já foi relacionado à obstrução do canal nasolacrimal em humanos. Em camundongos, o transcrito foi encontrado nas glândulas e no canal nasolacrimal (FOSTER et al., 2014).

Variantes no gene *NCOR2* foram detectadas em três pacientes, sem repetições da mesma variante. O gene facilita a supressão da transcrição de receptores retinóides e receptores dos hormônios tireoidianos por meio do recrutamento de complexos de histona deacetilase e fatores de remodelação da cromatina (CHEN; EVANS, 1995; PERISSI et al., 2010).

Variantes no gene *P4HA3* foram detectadas em três pacientes, sem repetição de variantes. O gene pertence à família prolil-4-hidroxilase, enzimas que catalisam a formação da 4-hidroxiprolina em moléculas de colágeno. Sua função é necessária para o correto dobramento de novas cadeias de colágeno em uma conformação molecular tripla hélice. Sem a hidroxiprolina, a temperatura de *melting* da tripla hélice é próxima da temperatura fisiológica.

Existem três isoformas da enzima em vertebrados (KUKKOLA et al., 2003; KUO; LABELLE-DUMAIS; GOULD, 2012). Em camundongos deficientes em *P4HA1*, as membranas basais não possuem colágeno tipo 4 e rompem facilmente, sendo letais (HOLSTER et al., 2007). Em camundongos deficientes em *P4HA2*, não houve fenótipo aparente (MYLLYHARJU, 2008). Quanto ao gene *P4HA3*, estudos não foram realizados.

Variantes no gene *TTC28* foram detectadas em três pacientes, sem repetição de variantes. O gene já teve seu papel associado às fibras do fuso durante a divisão mitótica. No camundongo com nocaute por pequenos RNAs de interferência, foi suprimido o agrupamento dos microtúbulos interpolares remanescentes do fuso central ao final da citocinese, interrompendo a formação do corpo mediano. Com essa interrupção, a célula em mitose é mantida na fase G2 + M do ciclo celular (IZUMIYAMA et al., 2012).

O gene *CLEC11A*, apesar de não apresentar variantes repetidas, mostrou duas variantes com inserções que desencadeiam deslocamento do quadro de leitura do RNAm, o que acarreta um provável mecanismo de perda de função da proteína nos pacientes LGH6 e LGH17. Seu transcrito traduz uma glicoproteína sulfatada que é secretada na medula óssea, com potencial de promover a formação de colônias por células progenitoras hematopoiéticas (HIRAOKA et al., 1997).

Variantes no gene *GSE1* foram detectadas em três pacientes, sem repetição de variantes. A super-expressão do gene em câncer de mama induz proliferação celular, migração e invasão (CHAI et al., 2016).

O gene *HTT* apresentou três ocorrências, das quais duas variantes se repetiram nos pacientes LGH8 e LGH17. A variante c.6563A>C; p.His2188Pro; NM_002111 não foi descrita em nenhum banco populacional. A proteína huntingtina é expressa em citoplasma de uma grande variedade de células. Em células nervosas, é expressa também no núcleo (HOOGEVEEN et al., 1993). Expansões CAG no gene foram associadas à doença de Huntington, de mecanismo autossômico dominante (MACDONALD et al., 1993).

Variantes no gene *NRXN3* foram detectadas em três pacientes, sem repetição de variantes. O gene codifica uma dentre três proteínas de superfície celular de neurônios, as neurexinas. O gene de cada uma possui dois promotores, que codificam a forma alfa e beta da proteína (USHKARYOV et al., 1992). Estudos já associaram a deleção do gene com o espectro autista em quatro famílias americanas (VAAGS et al., 2012). Em camundongos nocaute para a forma alfa das três neurexinas, Missler et al. (2003) demonstraram que as alfa neurexinas são necessárias para a liberação de neurotransmissores, e que a sua deleção afeta a função sináptica de canais de cálcio.

A variante c.322G>T; p.Val108Phe; NM_020225 no gene *STOX2* foi a mesma na amostra dos 3 pacientes que a possuem. A variante tem frequência baixa em pelo menos 3 bancos populacionais do ExAC, com frequência global de 0,0003 e ausente em outros bancos. A proteína STOX2 é um fator de transcrição associado a pré-eclampsia (FENSTAD et al., 2010). Em um estudo, a expressão do gene, juntamente com a expressão de *MIA* (*melanoma inhibitory activity*) estavam elevadas no carcinoma oral de células escamosas (OSCC), em comparação com células normais da mucosa oral. Com o nocaute de *STOX2* em linhagens celulares HSC3 e HSC4, foi observada a redução do crescimento celular e aumento de atividade apoptótica. Os autores concluem que o gene promove crescimento celular e inibe apoptose celular (SASAHIRA et al., 2016).

Variantes no gene *VPS13B* foram detectadas em três pacientes, sem repetição de variantes. O gene já foi associado à síndrome de Cohen, de mecanismo autossômico recessivo (KOLEHMAINEN et al., 2003). Em um estudo com células humanas de fibroblastos e pré-adipócitos, o nocaute do gene acelerou a diferenciação dessas células em adipócitos (LIMOGE et al., 2015).

O gene *HLA-DRB5* teve duas ocorrências da mesma variante c.635C>T; p.Pro212Leu; NM_002125 nos pacientes LGH4 e LGH8. A variante nunca foi descrita nos bancos de dados populacionais. A alta variabilidade em moléculas HLA é devido ao segmento da cadeia beta. Essa alta variabilidade que possivelmente possibilita a resposta imune específica a uma infinidade de patógenos (TIEBER et al., 1986). Devido a essas características, as variantes são muito pouco prováveis de explicarem os fenótipos dos pacientes.

Variantes no gene *SPAG4* foram detectadas em três pacientes, sem repetição de variantes. O gene já foi associado a uma outra proteína, ODF27, sendo transcritos exclusivamente em células germinativas masculinas com uma alta interação durante a espermatogênese (TARNASKY et al., 1998).

A variante c.2071G>A; p.Glu691Lys; NM_198892 no gene *BMP2K* ocorreu duas vezes. Uma no indivíduo LGH17 e outra no indivíduo LGH20. Suas frequências nos bancos populacionais ExAC, *Exome Sequencing Project,* 1000 genomas e ABraOM foram, respectivamente, 0.0048; 0,003; 0,00179 e em 2 alelos. O gene foi associado à regulação negativa na maturação de osteoblastos por controlar a taxa de diferenciação e de depósito de minerais (KEARNS et al., 2001).

Variantes no gene *KIR2DL3* foram detectadas em três pacientes, sem repetição de variantes. O produto proteico é um receptor *killer immunoglobulin-like* que estimula ou inibe as células *natural killer*. Seu papel no sistema imunológico e interação com moléculas HLA

dependem de certo grau de variabilidade (HE et al., 2015). Os genes *KIR3DL0, KIR3DL1,* da mesma família, estão inclusos na lista de genes polimórficos (FUENTES FAJARDO et al., 2012). O gene, portanto, é candidato pouco provável a explicar o quadro clínico dos pacientes.

O gene *TMEM206*, também conhecido como *PACC1*, teve a variante c.631delC; p.Leu211fs; NM_01852 repetida nos pacientes LGH17 e LGH25. A variante é a delação de uma base citosina, o que desencadeia deslocamento do quadro de leitura do RNAm, que por sua vez acarreta um provável mecanismo de perda de função da proteína nos pacientes. A frequência da variante nos bancos populacionais foi, no ExAC, *Exome Sequencing Project,* 1000 genomas e ABraOM de, respectivamente, 0,0020; 0,0042; 0,00059904 e 6 alelos. Seu produto é uma proteína de membrana, um canal de cloreto ativado por próton (YANG et al., 2019).

O gene *FOXM1* exibiu duas ocorrências da mesma variante c.2132C>T; p.Pro711Leu; NM_202002 nos pacientes LGH14 e LGH19. A variante tem frequência nos bancos populacionais ExAC, *Exome Sequencing Project,* 1000 genomas e ABraOM de, respectivamente, 0,0063; 0,0081; 0,00439 e em 9 alelos. Sanchez-Calderon et al. (2010) descreveram as atividades da proteína FOXM1 sendo moduladas pelo fator de crescimento semelhante à insulina tipo 1 (IGF-1) na cóclea, de camundongos ainda em desenvolvimento. Em camundongos IGF-1 -/-, o gene *FOXM1* foi fortemente expresso durante o desenvolvimento, decaindo após o nascimento em comparação a camundongos IGF-1 +/+. Quinze dias após o nascimento, a proteína FOXM1 foi encontrada, em ambos os genótipos, na estria vascular, no gânglio espiral e no órgão de Corti. A proteína é necessária durante a progressão mitótica e durante a resposta transcricional na sinalização de dano/ponto de checagem do DNA (TAN; RAYCHAUDHURI; COSTA, 2007; WANG et al., 2005). Em camundongos IGF-1 -/-, há aumento de apoptose neuronal e um atraso na maturação neuronal, sem que haja proliferação alterada ou dano celular (CAMARERO et al., 2001). Os autores sugerem que o aumento da expressão de *FOXM1* compensa a progressão desbalanceada do ciclo celular causada pela ausência de IGF-1 -/-. As evidências da presença da proteína na estria vascular, estrutura chave na surdez observada em pacientes com SW e em outras estruturas relacionadas com a audição sugerem ser importante investigar uma possível relação das variantes com o fenótipo de perda auditiva apresentada pelos pacientes.

A variante c.379G>A; p.Ala127Thr; NM_001145442 no gene *POTEM* foi a mesma na amostra dos 3 pacientes que a possuem. A variante não foi encontrada nos bancos populacionais. A família gênica POTE já teve seu papel especulado na sinalização do sistema reprodutivo, no entanto, há poucos estudos sobre a isoforma M (BERA et al., 2004). As

isoformas B, G, K e KP constam na lista de genes hipervariáveis de Fuentes Fajardo et al. (2012).

A variante c.386G>A; p.Arg129Gln; NM_001145051 no gene *TMEM247* foi a mesma nos três pacientes que a possuem. A variante está presente apenas no banco de dados de populações brasileiras ABraOM com 9 alelos. Não há literatura científica específica para o gene, no entanto, o gene *TMEM14D*, da mesma família, está presente na lista de genes hipervariáveis já mencionada, indicando possível hipervariabilidade.

Variantes no gene *KMT2C* foram detectadas em três pacientes, sem repetição de variantes. O gene já foi associado à síndrome de Kleefstra, de mecanismo autossômico dominante (KLEEFSTRA et al., 2012). No entanto, os fenótipos descritos nessa síndrome não são compatíveis com os fenótipos apresentados pelos nossos pacientes. O nocaute do gene ortólogo em *D. melanogaster* revelou papel na memória de curto prazo, sem alterações morfológicas observáveis (KOEMANS et al., 2017).

A variante c.951C>G; p.Ile317Met; NM_005874 no gene *LILRB2* foi a mesma nos indivíduos LGH16 e LGH20. Tem frequência nos bancos de dados ExAC, 1000 genomas e ABraOM de, respectivamente 0,0065; 0,0041 e 12 alelos, estando ausente no *Exome Sequencing Project*. Os genes da mesma família, *LILBR1* e *LILBR3,* estão presentes na lista de genes hipervariáveis já mencionada, indicando provável hipervariabilidade. O gene é um receptor imunoglobulina-*like* de leucócitos, com interação com HLA-G1 (WANG et al., 2019).

Variantes no gene *NCOA6* foram detectadas em três pacientes, sem repetição de variantes. O nocaute do gene em camundongos não causou fenótipo aparente nos heterozigotos. Em homozigotos, observou-se restrição de crescimento e letalidade cerca de 10 dias pós-concepção, estando a letalidade relacionada a defeitos no desenvolvimento da rede vascular da placenta e hipoplasia cardíaca (ANTONSON et al., 2003; KUANG et al., 2002).

Variantes no gene *USP17L20* foram detectadas em três pacientes, sem repetição de variantes. A literatura sobre o gene é ínfima. Ainda assim, os genes *USP17L6* e *USP17L6P,* da mesma família, estão presentes na lista de genes hipervariáveis já mencionada, indicando provável hipervariabilidade. As variantes nos pacientes LGH14 e LGH24 foram mutações sem sentido.

A variante c.640G>A; p.Gly214Ser; NM_006687 no gene *ACTL7A* foi a mesma nos indivíduos LGH4 e LGH8. Tem frequência nos bancos de dados ExAC, *Exome Sequencing Project*, 1000 genomas e ABraOM de, respectivamente, 0,0048; 0,0047; 0,0025 e 4 alelos. A proteína correspondente em camundongos, T-ACTIN2, é expressa no núcleo de células germinativas no testículo, presente na cabeça e cauda do espermatozoide (TANAKA et al.,

2003). Estudos em camundongos (FU et al., 2012) e o rastreio de variantes no gene em indivíduos férteis e inférteis já o associaram com infertilidade em homens (TANAKA et al., 2019).

A variante c.G1387A; p.Gly463Ser; NM_001288833 no gene *GGT1* foi a mesma nos indivíduos LGH7 e LGH25 e nunca foi descrita nos bancos de dados populacionais. Ainda, o paciente LGH25 carrega outra variante no mesmo gene, a c.C319T; p.Arg107Cys com frequência apenas no banco populacional ExAC de leste e sul asiáticos de 0,0002 e 0,00011, respectivamente. Variantes patogênicas no gene já foram associadas a deficiência gama-glutamil transpeptidade, de mecanismo autossômico recessivo (DARIN et al., 2018). Em camundongos nocaute, foi observado o fenótipo de nanismo, catarata e anormalidade pigmentar de pelos. A anormalidade pigmentar foi relatada como pelos grisalhos sutis (YAMADA; TSUJI; KUNIEDA, 2013). O gene, pode, portanto, estar associado à canície do paciente LGH7. Há ainda a possibilidade de mecanismo de heterozigose composta para o paciente LGH25, que carrega duas variantes raras no gene.

Variantes no gene *PRTG* foram detectadas em três pacientes, sem repetição de variantes, no entanto, todas as variantes acometeram o exon 20 do gene. Em camundongos nocaute, foi observado defeitos craniofaciais. Esse defeito é devido a apoptose anormal de células da crista neural cefálica rostral entre os dias embrionários 9 e 10, e essas células tem sua habilidade migratória reduzida (WANG et al., 2013). Ainda, em células nocaute foi observado falha na transição epitelial-mesenquimal (ITO; NAKAMURA; WATANABE, 2011), processo também desencadeado pelo gene *SNAIL2* (COBALEDA et al., 2007).

Em resumo, com base na revisão bibliográfica aqui apresentada, destacam-se os seguintes genes com maior probabilidade de contribuir com pelo menos uma das características fenotípicas da SW ou com funções semelhantes às desempenhadas pelas proteínas dos genes conhecidos que, quando alterados, causam a SW: *ARHGAP23, ERBB3, P4HA3, FOXM1, GGT1* e *PRTG*. Esses genes, todos com três ocorrências de variantes ou mais na amostra, se relacionam de alguma forma com algum componente relacionado a audição, com destaque para o gene *FOXM1*, cujo produto proteico foi encontrado na estria vascular, estrutura afetada quando há surdez em pacientes com SW (LIU et al., 2016). Outro destaque é o gene *PRTG*, já associado à apoptose de células da crista neural e ao processo de transição epitelial-mesenquimal, processo também desencadeado pelo gene *SNAIL2* já relacionado à SW (COBALEDA et al., 2007). O gene *PRTG* tem semelhança com a função desempenhada pela proteína do gene *SNAIL2*, já relacionada com a SW. Estudos de transmissão das variantes nas famílias são necessários para confirmar as hipóteses levantadas.

Uma possível falha da análise realizada consistiu na inclusão de genes que são potencialmente hipervariáveis (*HLA-DRB5, KIR2DL3, POTEM, TMEM247, LILRB2, USP17L20*), demonstrando algumas variantes em comum, mas que não estavam inclusos na lista de genes hipervariáveis formulada por Fuentes Fajardo et al. (2012).

3.2 Análise das variantes candidatas presentes em genes relacionados à lista das proteínas potencialmente relacionadas a SW e em genes já relacionados ao fenótipo de surdez.

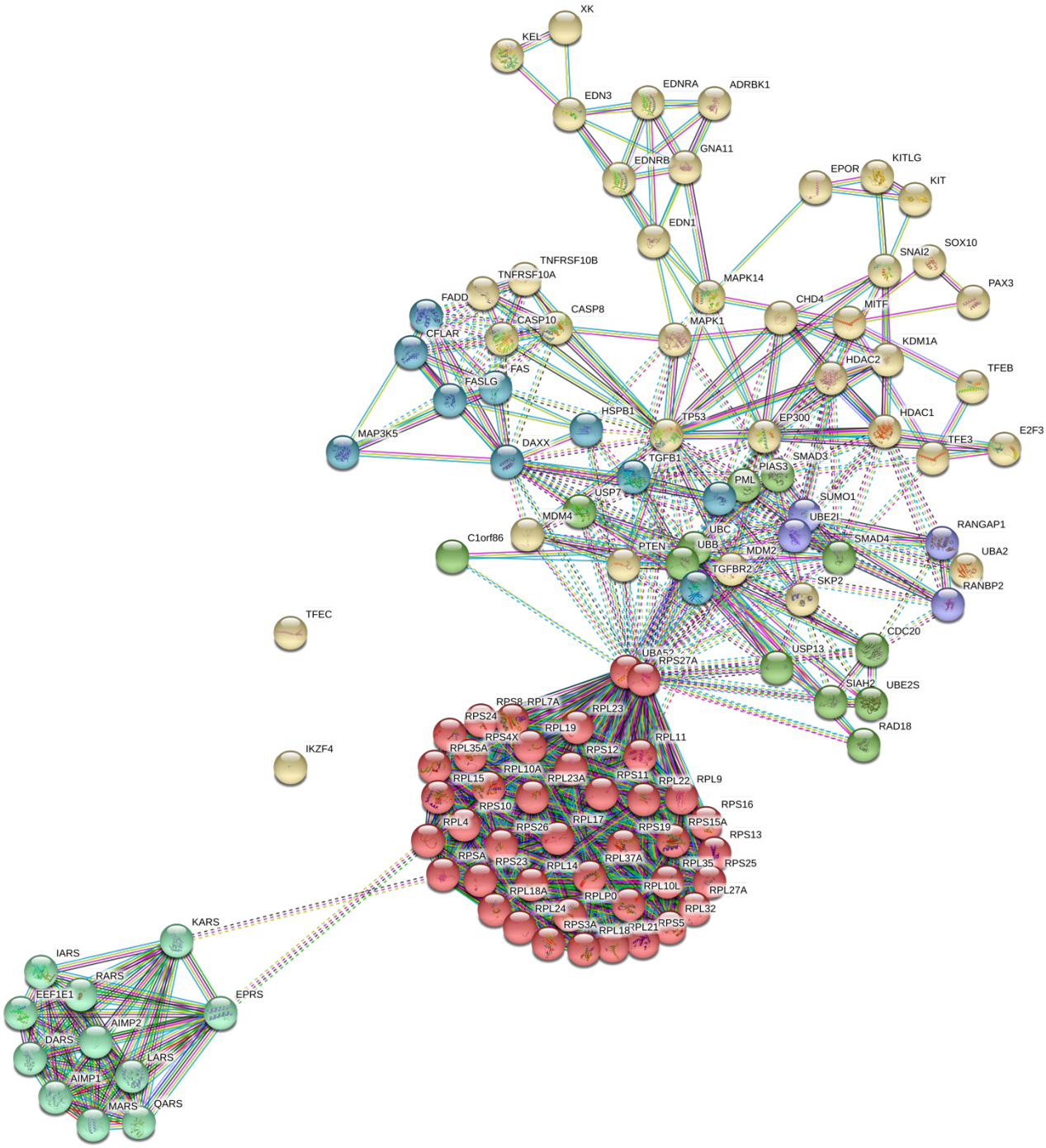
Após obtenção da lista de variantes após a estratégia de filtragem descrita na Figura 30 aplicada ao VCF dos 14 pacientes, foi verificado se havia genes com variantes filtradas em comum com duas listas de genes candidatos por nós elaborada.

3.2.1 Correspondência entre genes contendo variantes candidatas filtradas com lista de genes relacionados às proteínas potencialmente relacionadas à SW.

A primeira lista de genes construída para análise corresponde a uma lista de genes obtida após a construção de uma rede de proteínas relacionadas com as proteínas codificadas pelos genes clássicos de SW. Essa lista foi gerada pela ferramenta e banco de dados STRING (https://string-db.org/) por meio da inclusão das proteínas, que quando alteradas, são relacionadas ao fenótipo de SW. Foram feitos ajustes de parâmetros para ampliar a lista de proteínas incluídas na rede.

Em primeiro lugar, a ferramenta STRING sugeriu proteínas que deveriam ser adicionadas à lista inicial que é usada como *input*. Foram incluídas as proteínas sugeridas pela ferramenta. Foi utilizada a pontuação mínima de interação de 0,150. Foram utilizados apenas dados de experimentos e de bancos de dados. Foram estipuladas 50 interações máximas tanto no primeiro como no segundo *cluster*. As proteínas obtidas foram agrupadas e submetidas à ferramenta novamente, utilizando-se dessa vez dados de todos os tipos de interações (*textmining*, *neighborhood*, *gene fusion*, *co-occurence*, *co-expression*) além dos dados de experimentos e bancos de dados, com ajustes mais rigorosos de pontuação mínima de interação para 0,900. Foi gerada uma rede de 113 proteínas, mostrada na Figura 31, que corresponde a uma lista de 113 genes (Anexo D).

Figura 31 - Rede de proteínas relacionadas às proteínas codificadas pelos genes conhecidos relacionados à SW.



A correspondência entre a lista de genes contendo variantes filtradas com os genes que resultaram da rede de proteínas ocorreu apenas nas amostras dos indivíduos LGH2, LGH6, LGH7 e LGH24. Os genes foram, respectivamente, *MAP3K5*, *EP300*, *IARS*, *MDM4*. Desses, apenas o primeiro apresentou mutação com provável perda de função da proteína.

Em redes complexas de proteínas, a proximidade entre os *nodes*, ou seja, as proteínas, é indicativo de uma maior relação entre si, fenômeno chamado *betweenness centrality* (BARABÁSI; GULBAHCE; LOSCALZO, 2011). Na rede de proteínas construída (Figura 31), a proteína MAP3K5 homônima ao seu gene está a duas proteínas de distância da proteína MITF na rede de proteínas. A variante encontrada no gene *MAP3K5* foi c.2099_2100delCA; p.Leu700fs; NM_005923, não sendo descrita em nenhum dos bancos de dados de frequência populacionais. A via das MAPK's (*mitogen-activated protein kinase*) regula processos celulares como a migração, proliferação e sobrevivência (ROBINSON; COBB, 1997). Na ligação entre a proteína KITLG e seu receptor KIT, é desencadeada uma sinalização que fosforila, através de MAPK, a proteína MITF, degradando parte das proteínas MITF expressas (HEMESATH et al., 1998; PRICE et al., 1998; SATO-JIN et al., 2008). Em células de melanoma, mutações somáticas em *MAP3K5* reduzem a capacidade da proteína de promover apoptose da célula, aumentando sua sobrevida (PRICKETT et al., 2014). A variante no gene *MAP3K5* é uma boa candidata a estudo de transmissão na família.

A proteína EP300 está diretamente conectada à proteína MITF na rede de proteínas. A variante encontrada no gene *EP300* foi c.689T>C; p.Met230Thr; NM_001429, não sendo descrita em nenhum dos bancos de dados de frequência populacionais. Estudos antigos já revisavam o papel da proteína na ativação da transcrição do gene *MITF*. A proteína EP300, junto com a proteína CBP, que é cofator de transcrição, formam um complexo que media reguladores que ativam a transcrição. O complexo tem a capacidade de modificar a estrutura da cromatina por possuir atividade de histona acetiltransferase. Esse complexo possui região de ligação à proteína E1A de adenovírus, que possui grande homologia com uma região da proteína MITF (SATO et al., 1997). A proteína EP300 também está diretamente conectada à proteína de supressão tumoral P53, codificada pelo gene *TP53,* formando um complexo proteico. A proteína P53 é dependente da proteína EP300 para inibir *enhancers* regulados por AP1 e para ativar a transcrição de promotores regulados por P53 (AVANTAGGIATI et al., 1997). Camundongos com atividade aumentada de P53 apresentam queratinócitos com aumento de expressão do gene *KITLG,* que é alvo transcricional da proteína P53 (BOWEN; ATTARDI, 2019). O gene *KITLG* codifica um fator de crescimento que estimula melanócitos e causa hiperpigmentação em camundongos (CHANG et al., 2017; MCGOWAN et al., 2008). Tumores em humanos já foram descritos contendo mutações em *EP300* ou *CBP* (BORROW et al., 1996; KOSHIISHI et al., 2004). No entanto, não há estudos que correlacionem diretamente alterações no gene *EP300* com o fenótipo de SW, mas sua função na ativação da transcrição do

gene *MITF* e evidências de distúrbios de pigmentação em melanócitos tornam a variante uma candidata interessante para estudo de segregação na família.

A proteína IARS (*Isoleucil-tRNA* sintetase) está a quatro proteínas de distância da proteína *MITF* na rede de proteínas. A variante encontrada no gene *IARS* foi c.3727G>A; p.Val1243Met; NM_013417. A variante tem frequência nos bancos de dados populacionais ExAC, *Exome Sequencing Project* e ABraOM de, respectivamente, 0,0010; 0,0008 e 1 alelo. A variante não foi descrita no 1000 genomas. O gene *IARS* ou *IARS1*, já foi relacionado a atraso de crescimento, deficiência intelectual, hipotonia e doença hepática (OMIM #617093), com herança autossômica recessiva. A proteína faz parte de um grupo de enzimas denominadas ARS (aminoacil-RNAt sintetases), com funções de carregar aminoácidos aos seus respectivos RNAt a partir da aminoacetilação dos RNAt, fornecendo-os para a síntese de proteínas (YAO; FOX, 2013). Kopajtich et al. (2016) descreveram três pacientes não aparentados com variantes bialélicas no gene, encontradas pela técnica de sequenciamento massivo paralelo do exoma. Os três apresentaram atraso de crescimento pré-natal e deficiência intelectual. Dois apresentaram hipotonia muscular e doença hepática com fibrose e esteatose e um indivíduo apresentou diabetes mellitus e perda auditiva neurossensorial. Orenstein et al. (2017) descreveram um paciente adicional com variantes bialélicas no gene, também encontradas pelo sequenciamento massivo paralelo do exoma, confirmando os sinais já reportados e sugerindo expansão do fenótipo com adição de atraso leve do desenvolvimento, aumento de elasticidade da pele, frouxidão ligamentar e hipervitaminose D. Nosso paciente, LGH7, no entanto, não exibe sinais de atraso de crescimento, deficiência intelectual e hipotonia. Sua evolução neuropsicomotora foi normal e não há registros de doenças hepáticas. A variante na amostra do paciente estava em heterozigose, ao contrário dos casos descritos nos quais as variantes estavam em homozigose.

A proteína MDM4 está a duas proteínas de distância da proteína MITF na rede. A variante encontrada no gene *MDM4* foi c.1162C>G; p.Pro388Ala; NM_002393. Tem frequência nos bancos populacionais ExAC, *Exome Sequencing Project*, 1000 genomas e ABraOM de, respectivamente, 0,0006; 0,0005; 0,00059904 e 6 alelos. O gene *MDM4* é regulador da proteína p53, restringindo sua atividade transcricional. Sua ausência é letal e em numerosos cânceres seu RNAm está elevado. Na sinalização mitogênica através de Ras-MAPK, há também aumento da expressão de *MDM4*. Nessa sinalização, há especificidade para o câncer de melanócitos (HAUPT et al., 2019; MARINE; JOCHEMSEN, 2016). Bowen e Attardi (2019)

revisam o papel da proteína p53 em síndromes do desenvolvimento, e mostram que o aumento de p53 pode causar hipo e hiperpigmentação. A hiperpigmentação decorre em estágio pós-natal, devido ao aumento de expressão de *KITLG*, como descrito para o gene *EP300* acima. Já a hipopigmentação é hipoteticamente causada por um decréscimo no número de melanoblastos provenientes do neuroepitélio em estágios embrionários. Em camundongos *Mdm2+/-* e *Mdm4+/-* foi observado mancha branca ventral (ZHANG et al., 2017). Essas evidências são sugestivas em modelos animais usados na investigação de genes da SW (TACHIBANA; KOBAYASHI; MATSUSHIMA, 2003). Essa variante também é considerada importante para investigações futuras de segregação na família.

Em conclusão, dos genes encontrados na análise comparativa com os genes obtidos a partir da lista de proteínas associadas às proteínas já relacionadas com a SW, foram encontrados os genes *MAP3K5, EP300, IARS* e *MDM4*. Desses, apenas o gene *IARS*, cuja proteína é a mais distante da proteína MITF, não demonstrou evidências na literatura que pudessem associar sua função com o papel desempenhado pelas proteínas já estabelecidas ou com algum fenótipo da SW. A construção da rede de proteínas requer, em um primeiro momento, evidências científicas fortes de experimentos e de bancos de dados para que as conexões entre as proteínas sejam estabelecidas. Para se ampliar a rede, as evidências de interação das proteínas são ampliadas para *textmining*, *neighborhood*, *gene fusion*, *co-occurence*, *co-expression*, que são mais flexíveis. Isso indica que nem todas as relações resultam, necessariamente, de indícios concretos de uma relação funcional entre essas proteínas. Portanto, apenas as variantes nos genes *MAP3K5, EP300* e *MDM4* consideramos como indicadas a estudo de transmissão nas famílias.

3.2.2 Correspondência entre genes contendo variantes filtradas com genes já relacionados ao fenótipo de surdez.

A segunda lista por nós construída corresponde aos genes já estabelecidos na literatura relacionados ao fenótipo de surdez sindrômica e não sindrômica. A lista de 172 genes (Anexo E) foi construída a partir do portal *Hereditary Hearing Loss* (https://hereditaryhearingloss.org) e a partir do banco de dados *Deafness Variation Database* (http://deafnessvariationdatabase.org). O gene *MT-ATP6* não constava nas duas fontes acima, mas há ao menos 3 estudos que o relacionam com perda auditiva sindrômica, e por isso o gene foi também incluído (BURRAGE et al., 2014; DEGOUL et al., 1995; LÓPEZ-GALLARDO et al., 2009).

A correspondência entre a lista de genes com variantes candidatas com a lista de genes já relacionados ao fenótipo de surdez ocorreu em todas as amostras dos 14 indivíduos. Todas as variantes estavam em heterozigose. As variantes estão descritas na Tabela 12. Variantes em genes com possível relação com o fenótipo dos pacientes serão destacadas a seguir.

Tabela 12 - Variantes candidatas encontradas em comparação com lista de genes já relacionados ao fenótipo de surdez.

Gene	Fenótipo OMIM	RefSeq	Variante - DNA	Variante - Proteína	dbSNP	1000 Genomas	*Exome Sequencing Project*	ExAC	ABraOM	ClinVar - classificação	Deafness Variation Database - classificação	SIFT	*PolyPhen-2*	*Mutation Taster*
							LGH2							
GIPC3	Surdez AR não sindrômica	NM_133261	c.122C>A	p.Thr41Lys	rs727503062	0	0	NA	0	Provavelmente patogênica	Patogênica	Tolerável	Benigna	*Disease causing*
TMPRSS 3	Surdez AR não sindrômica	NM_032405	c.572G>A	p.Arg191Lys	-	0	0	NA	0	ND	ND	Tolerável	Possivelmente patogênica	*Disease causing*
							LGH4							
EYA1	Síndrome branquio-otorrenal AD	NM_000503	c.884T>C	p.Leu295Ser	rs146687496	0,000199	0,0003	0.0001	2	ND	Significado incerto	Tolerável	Possivelmente patogênica	*Disease causing*
STRC	Surdez AR não sindrômica	NM_153700	c.3460C>T	p.Arg1154*	rs576724182	0,001996	0	0.0010	0	ND	Significado incerto	ND	ND	*Disease causing*
TRIOBP	Surdez AR não sindrômica	NM_001039141	c.634G>A	p.Gly212Ser	rs201794404	0,000199	0,0008	0,0014	6	Significado incerto	Provavelmente benigna	Deletéria	Benigna	Polimorfismo
							LGH6							
CHD7	Síndrome de CHARGE, AD	NM_017780	c.1958C>T	p.Pro653Leu	rs200536932	0,000199	0	0.0003	0	ND	ND	Tolerável	Provavelmente patogênica	*Disease causing*
DSPP	Surdez AD com dentinogênese; Displasia dentinária tipo 2, AD; Dentinogênese imperfeita, Shields tipo 2 e 3, AD	NM_014208	c.731G>A	p.Gly244Glu	-	0	0	NA	0	ND	ND	ND	Provavelmente patogênica	*Disease causing*
COL9A2	Síndrome de Stickler, AR; Displasia epifisária múltipla 2, AD	NM_001852	c.1982C>T	p.Pro661Leu	rs150687987	0,000599	0,0034	0.0024	1	Interpretações conflitantes de patogenicidade	Significado incerto	Deletéria	Provavelmente patogênica	*Disease causing*
MYO15A	Surdez AR não sindrômica	NM_016239	c.320T>C	p.Met107Thr	rs1002458470	0	0	NA	1	ND	ND	Deletéria	Provavelmente patogênica	*Disease causing*
							LGH7							
ADGRV1	Síndrome de Usher tipo 2C, AR; Convulsões febris, AD	NM_032119	c.8401G>T	p.Gly2801*	rs760510612	0	0	NA	0	ND	Benigna	ND	ND	*Disease causing*

AD – Autossômico dominante; AR – Autossômico recessivo; NA – Not available; ND – Não descrito.

Tabela 12 (continuação) - Variantes candidatas encontradas em comparação com lista de genes já relacionados ao fenótipo de surdez.

Gene	Fenótipo OMIM	RefSeq	Variante - DNA	Variante - Proteína	dbSNP	1000 Genomas	*Exome Sequencing Project*	ExAC	ABraOM	ClinVar - classificação	Deafness Variation Database - classificação	SIFT	*PolyPhen-2*	*Mutation Taster*
LGH7 (continuação)														
CDH23	Surdez AR não sindrômica; Síndrome de Usher tipo 1D, DR, AR; Adenoma pituitário, AD	NM_022124	c.6421A>G	p.Arg2141Gly	rs376414352	0	0,000079	0,0002	1	Significado incerto	Significado incerto	ND	Benigna	*Disease causing*
SLC22A4	Suscetibilidade a artrite reumatoide, Surdez AR não sindrômica	NM_003059	c.830T>C	p.Ile277Thr	-	0	0	NA	0	ND	ND	Deletéria	Possivelmente patogênica	*Disease causing*
LGH8														
MYO15A	Surdez AR não sindrômica	NM_016239	c.1634C>T	p.Ala545Val	rs199740747	0,000399	0,0006	0,0013	1	Significado incerto	Significado incerto	Deletéria	Possivelmente patogênica	Polimorfismo
LGH9														
LOXHD1	Surdez AR não sindrômica	NM_001145472	c.128G>A	p.Gly43Asp	rs727503142	0	0	NA	0	Significado incerto	Significado incerto	Tolerável	Benigna	*Disease causing*
LGH11														
MYO7A	Surdez AD e AR não sindrômica; Síndrome de Usher 1B, AR	NM_001127180	c.2886G>C	p.Gln962His	rs200641606	0,000399	0,0006	0,0007	1	Significado incerto	ND	Tolerável	Possivelmente patogênica	*Disease causing*
COL9A2	Síndrome de Stickler, AR; Displasia epifisária múltipla 2, AD	NM_001852	c.562C>A	p.Leu188Met	rs139455364	0,001996	0,002	0,0005	1	ND	Benigna	Tolerável	Provavelmente patogênica	*Disease causing*
LGH14														
LRTOMT	Surdez AR não sindrômica	NM_001145308	c.780T>G	p.Cys260Trp	rs886048633	0	0	NA	0	Significado incerto	ND	Deletéria	Possivelmente patogênica	*Disease causing*
OTOGL	Surdez AR não sindrômica	NM_173591	c.1913G>A	p.Trp638*	rs377708973	0	0,000083	0,0001 (ExAC NFE)	0	Patogênica	Significado incerto	ND	ND	*Disease causing*
OTOGL	Surdez AR não sindrômica	NM_173591	c.5675T>C	p.Ile1892Thr	rs775475186	0	0	0,0001 (ExAC NFE)	0	Significado incerto	Provavelmente benigna	Deletéria	ND	Polimorfismo

AD – Autossômico dominante; AR – Autossômico recessivo; DR – Digênico recessivo; NA – Not available; ND – Não descrito; NFE – População europeia-não-finlandesa.

Tabela 12 (continuação) - Variantes candidatas encontradas em comparação com lista de genes já relacionados ao fenótipo de surdez.

Gene	Fenótipo OMIM	RefSeq	Variante - DNA	Variante - Proteína	dbSNP	1000 Genomas	*Exome Sequencing Project*	ExAC	ABraOM	ClinVar - classificação	Deafness Variation Database - classificação	SIFT	*PolyPhen-2*	*Mutation Taster*
							LGH16							
HARS ou *HARS1*	Doença de Charcot-Marie-Tooth, tipo 2W, AD; Síndrome de Usher tipo 3B, AR	NM_002109	c.1177G>A	p.Val393Met	rs192923161	0,0002	0	0,0002 (ExAC EAS)	0	ND	ND	Tolerável	Benigna	*Disease causing*
							LGH17							
FGFR1	Lipomatose encéfalo crânio cutânea; Síndrome de Hartsfield, AD; Hipogonadismo hipogonadotrófico 2 com ou sem anosmia, AD; Síndrome de Jackson-Weiss, AD; Displasia osteoglofônica, AD; Síndrome de Pfeiffer, AD; Trigonocefalia 1, AD	NM_001174067	c.2557C>T	p.Arg853Cys	rs17182463	0	0,0003	0,0002	1	Significado incerto	Provavelmente patogênica	Deletéria	Possivelmente patogênica	*Disease causing*

AD – Autossômico dominante; AR – Autossômico recessivo; NA – Not available; ND – Não descrito; EAS – População leste asiática.

Tabela 12 (continuação) - Variantes candidatas encontradas em comparação com lista de genes já relacionados ao fenótipo de surdez.

Gene	Fenótipo OMIM	RefSeq	Variante - DNA	Variante - Proteína	dbSNP	1000 Genomas	*Exome Sequencing Project*	ExAC	ABraOM	ClinVar - classificação	Deafness Variation Database - classificação	SIFT	*PolyPhen-2*	*Mutation Taster*
LGH17 (continuação)														
TBC1D24	Surdez AD e AR não sindrômica; Síndrome de DOORS, AR; Epilepsia rolândica, distonia paroxística induzida pelo exercício e distonia do escrivão, AR; Encefalopatia epiléptica infantil, AR; Epilepsia mioclônica infantil, AR	NM_001199107	c.344G>A	p.Arg115His	rs201174513	0,000199	0,000078	0,0001	0	Significado incerto	Significado incerto	Tolerável	Benigna	*Disease causing*
LOXHD1	Surdez AR não sindrômica	NM_001145472	c.1742A>G	p.Lys581Arg	-	0	0	NA	0	ND	ND	Tolerável	Provavelmente patogênica	*Disease causing*
LGH19														
ATP2B2	Surdez AR não sindrômica	NM_001001331	c.1555G>A	p.Val519Ile	rs144118750	0,000399	0,0028	0,0018	1	ND	Provavelmente benigna	Tolerável	Benigna	*Disease causing*
COL4A5	Síndrome de Alport 1, LXD	NM_000495	c.2981G>A	p.Gly994Glu	-	0	0	NA	0	ND	ND	Deletéria	Provavelmente patogênica	*Disease causing*
SLC26A5	Surdez AR não sindrômica	NM_198999	c.2168A>G	p.Glu723Gly	rs144115730	0	0,0003	0,0000907	0	ND	ND	Tolerável	Benigna	*Disease causing*
TECTA	Surdez AD e AR não sindrômica	NM_005422	c.5836T>C	p.Tyr1946His	rs144343770	0,000599	0,0005	0,0004	0	Interpretações conflitantes de patogenicidade	Benigna	Deletéria	Provavelmente patogênica	*Disease causing*
TNC	Surdez AD não sindrômica	NM_002160	c.6211G>A	p.Glu2071Lys	rs140573419	0	0,0002	0,0003	0	ND	ND	Deletéria	Provavelmente patogênica	*Disease causing*

AD – Autossômico dominante; AR – Autossômico recessivo; LXD – Ligado ao X dominante; NA – Not available; ND – Não descrito.

Tabela 12 (continuação) - Variantes candidatas encontradas em comparação com lista de genes já relacionados ao fenótipo de surdez.

Gene	Fenótipo OMIM	RefSeq	Variante - DNA	Variante - Proteína	dbSNP	1000 Genomas	*Exome Sequencing Project*	ExAC	ABraOM	ClinVar - classificação	Deafness Variation Database - classificação	SIFT	*PolyPhen-2*	*Mutation Taster*
							LGH20							
MYH9	Surdez AD não sindrômica; Macrotrombocitopenia e inclusões granulocíticas com/sem nefrite ou perda auditiva neurossensorial, AD	NM_002473	c.906C>G	p.Phe302Leu	rs375657864	0	0,000077	0,00823	0	ND	Significado incerto	Deletéria	Provavelmente patogênica	*Disease causing*
SLC26A4	Surdez AR não sindrômica, com aqueduto vestibular alargado, AR; Síndrome de Pendred, AR	NM_000441	c.1246A>C	p.Thr416Pro	rs28939086	0	0,0002	0,0002	0	Patogênica	Patogênica	Deletéria	Provavelmente patogênica	*Disease causing*
							LGH24							
COL11A2	Surdez AD e AR não sindrômica; Fibrocondrogenese 2, AD e AR; Displasia espondilo epifisária, AD e AR	NM_080679	c.1861A>T	p.Ile621Phe	rs188490457	0,000599	0	0,0002	5	Interpretações conflitantes de patogenicidade	Significado incerto	Deletéria	Provavelmente patogênica	*Disease causing*
COL4A3	Síndrome de Alport 2, AR; Síndrome de Alport 3, AD; Hematúria familial benigna, AD	NM_000091	c.4778G>T	p.Gly1593Val	rs373407763	0	0,000084	0,0002 (ExAC AFR); 0,0011 (ExAC OTH)	0	ND	Significado incerto	Deletéria	Provavelmente patogênica	*Disease causing*
DIAPH3	Neuropatia auditiva, AD	NM_001042517	c.1480+1G>T	NA	-	0	0	NA	0	ND	ND	ND	ND	*Disease causing*

AD – Autossômico dominante; AR – Autossômico recessivo; NA – Not available; ND – Não descrito; AFR – Populações africanas e afro-americanas; OTH – Outras populações.

Tabela 12 (continuação) - Variantes candidatas encontradas em comparação com lista de genes já relacionados ao fenótipo de surdez.

Gene	Fenótipo OMIM	RefSeq	Variante - DNA	Variante - Proteína	dbSNP	1000 Genomas	*Exome Sequencing Project*	ExAC	ABraOM	ClinVar - classificação	Deafness Variation Database - classificação	SIFT	*PolyPhen-2*	*Mutation Taster*
LGH24 (continuação)														
PDZD7	Surdez AR não sindrômica; Síndrome de Usher tipo 2C, AR; Doença de retina na síndrome de Usher 2A, AR	NM_024895	c.971G>A	p.Ser324Asn	rs200592310	0,000199	0,0013	0,0035	3	Significado incerto	Significado incerto	Deletéria	Possivelmente patogênica	*Disease causing*
LGH25														
LRTOMT	Surdez AR não sindrômica	NM_001145307	c.37G>A	p.Glu13Lys	rs146942815	0,001597	0,0044	0,0048	6	ND	Benigna	Tolerável	Benigna	*Disease causing*
SLC26A4	Surdez AR não sindrômica, com aqueduto vestibular alargado, AR; Síndrome de Pendred	NM_000441	c.85G>C	p.Glu29Gln	rs111033205	0	0	0,0001 (ExAC NFE)	0	Patogênica / Provavelmente patogênica	Patogênica	Tolerável	Benigna	*Disease causing*

AR – Autossômico recessivo; ND – Não descrito; NFE – População europeia-não-finlandesa.

Genes relacionados somente à surdez autossômica recessiva foram descartados como candidatos à causa do fenótipo de surdez, dado que as variantes filtradas encontradas nos pacientes estavam sempre em heterozigose e nunca foram observadas em homozigose ou heterozigose composta, com exceção do paciente LGH14 que tinha duas mutações no *OTOGL*. Esse gene está relacionado à surdez autossômica recessiva não sindrômica (YARIZ et al., 2012) e estudos de transmissão das variantes são necessárias para elucidar o caso.

Algumas variantes em genes associados a síndromes de mecanismo de herança autossômico dominante cujos sinais clínicos eram muito discrepantes dos sinais clínicos da SW presente nos nossos pacientes não serão comentadas, pois sua relação com o fenótipo da SW parece improvável.

A seguir, apresentaremos a descrição de variantes em genes com maior potencial de relação com o fenótipo dos pacientes.

A variante c.884T>C; p.Leu295Ser; NM_000503 no gene *EYA1* (*eyes absent gene 1*) foi encontrada na amostra do indivíduo LGH4. O gene *EYA1* já foi relacionado à síndrome branquio-otorrenal (BOR), de mecanismo autossômico dominante (ABDELHAK et al., 1997). A BOR tem penetrância incompleta e expressividade variável, afetando principalmente estruturas do arco branquial, como orelha e rins (AZUMA et al., 2000). A surdez é a característica mais frequente, presente em 93% dos afetados (FRASER; SPROULE; HALAL, 1980). Anomalias oculares em humanos são raras, porém um estudo relatou 3 pacientes com anomalias oculares como opacidade central da córnea, adesão à íris (anomalia de Peters), catarata leve e persistência bilateral da membrana pupilar (AZUMA et al., 2000). Em *D. melanogaster*, o gene é associado ao desenvolvimento dos olhos (BONINI; LEISERSON; BENZER, 1993). Em camundongos, o gene foi associado ao desenvolvimento de todos os componentes da orelha interna (ABDELHAK et al., 1997; XU et al., 1999). Em camundongos nocaute, heterozigotos têm anormalidades renais e perda auditiva condutiva similares às vistas na BOR. Homozigotos não desenvolvem orelhas e rins. Esses camundongos nocaute possibilitaram a observação indicativa de que o gene controla eventos de sinalizações indutivas cruciais no início do desenvolvimento de orelhas e rins, em uma hierarquia regulatória envolvendo a família de genes *PAX* e *SIX* (XU et al., 1999). Em *X. laevis*, *PAX7* e *MSX1* reprimem a transcrição de *SIX1*, cujo produto também está relacionado ao desenvolvimento da orelha interna e tem interações sinérgicas com proteínas EYA durante a organogênese (LI et

al., 2003; SATO et al., 2010). Em *G. gallus*, *SIX1* reprime a expressão de *PAX3* (CHRISTOPHOROU et al., 2009). Os genes *SIX1*, *EYA1* e *EYA2* são expressos na região pré-placóide, lateralmente às células da crista neural durante o fechamento da placa neural. Apesar de existir evidências, por meio de marcadores moleculares, de uma divisão entre esses domínios, estudos de migração indicam que essas células progenitoras ainda se misturam, sem um destino final fixo (SELLECK; BRONNER-FRASER, 1995; SIMÕES-COSTA; BRONNER, 2015). Ainda, o gene *EYA1* representa uma família de proteínas tirosina-fosfatases e seu produto é regulado por MAPK, com dois sítios de fosforilação (HSIAO et al., 2001; RAYAPUREDDI et al., 2003). Dadas as evidências acima, o gene poderia ser candidato para estudo de segregação na família, se considerarmos que a expressividade da síndrome BOR é extremamente variável. O caso é isolado e exames que avaliassem a integridade da orelha interna não foram fornecidos. No entanto, fica difícil explicar os distúrbios de pigmentação da paciente.

A variante c.1958C>T; p.Pro653Leu; NM_017780 no gene *CHD7* foi encontrada na amostra da paciente LGH6. O gene é associado à síndrome de CHARGE, acrônimo que inclui os sinais de coloboma, cardiopatia, atresia de coanas, atraso no desenvolvimento e de crescimento, hipoplasia genital, malformação da orelha/surdez e malformações de extremidades, com mecanismo autossômico dominante (VISSERS et al., 2004). A proteína CHD7 é altamente conservada entre humanos e a rã *X. laevis*. Foi comprovado o papel do gene na formação da crista neural, em rãs e em células-tronco embrionárias humanas. Nos anfíbios, o nocaute do gene produz o fenótipo observado na síndrome de CHARGE. Neles, a expressão de *SNAIL2*, *TWIST* e *SOX9*, que são especificadores multipotentes migratórios da crista neural, foi diminuída drasticamente. Ainda, a observação do fenótipo de coloboma e defeitos em otólitos sugere a associação do gene no desenvolvimento dos placóides óptico e ótico, respectivamente, durante a embriogênese. Em células-tronco embrionárias humanas, a proteína CHD7 se associa à proteína PBAF, promovendo, em sinergia, a migração de células da crista neural e a expressão de seus genes. Nessas células modelo, o nocaute causou redução da expressão de *TWIST* e *SNAIL2* (BAJPAI et al., 2010). O fato de o gene desempenhar papeis importantes nas células da crista neural e o seu nocaute afetar o gene *SNAIL2*, que já foi associado à SW2, dão fortes indícios de uma possível relação causativa da variante em questão. Estudos de segregação serão realizados para corroborar essa hipótese, mas deve ser ressaltado que o paciente não apresenta sinais clínicos da síndrome de CHARGE, que usualmente é muito mais grave que a SW.

A variante c.2886G>C; p.Gln962His; NM_001127180 no gene *MYO7A* foi encontrada na amostra da paciente LGH11. O gene já foi associado à síndrome de Usher 1B, com mecanismo de herança autossômico recessivo e à surdez não sindrômica com mecanismo recessivo e dominante (LIU et al., 1997a, 1997b; WELL et al., 1995). Como a variante foi encontrada em heterozigose, é possível que o fenótipo de surdez possa ser explicado por esse gene. Das três ferramentas de predição de patogenicidade, apenas uma classificou a variante como tolerável. As outras duas ferramentas potencialmente a relacionaram a um certo grau de patogenicidade. O ClinVar a classifica com significado incerto e a variante não está descrita no banco de dados de variantes de surdez *Deafness variation database*. A busca na literatura não revelou artigos que já tenham descrito a variante. Estudos de segregação são necessários para confirmar ou refutar essa hipótese na paciente cujo caso é isolado. Ainda assim, a variante no gene *MYO7A* isoladamente não tem potencial para explicar os outros sinais relacionados à SW presentes na paciente LGH11.

A variante c.344G>A; p.Arg115His; NM_001199107 no gene *TBC1D24* foi encontrada na amostra do paciente LGH17, de caso familial. O gene já foi relacionado à surdez não sindrômica de mecanismo de herança autossômico dominante (ZHANG et al., 2014) e a outras condições sindrômicas de mecanismo recessivo, como descritas na Tabela 12. No entanto, a variante está descrita no ClinVar e no *Deafness Variation Database* como de significado incerto. Em camundongos, a proteína mostrou-se expressa nos estereocílios das células ciliadas internas e externas e nos neurônios ganglionares espirais (AZAIEZ et al., 2014; ZHANG et al., 2014). A partir da observação dos locais da proteína que são acometidos pelas variantes patogênicas já associadas aos fenótipos estabelecidos na literatura, é possível estabelecer que a variante encontrada acomete o domínio TBC da proteína TBC1D24. A relação genótipo-fenótipo ainda é complexa, já que não existe correlação aparente entre o tipo de mutação, sua localização e o fenótipo clínico (AZAIEZ et al., 2014). A variante tem potencial baixo de explicar o quadro de surdez, já que apenas uma variante (p.Ser178Leu) foi relacionada com surdez de mecanismo autossômico dominante (ZHANG et al., 2014) e do fato de apenas um indivíduo da família apresentar surdez, mas estudos de segregação podem auxiliar na elucidação do significado da variante.

Na amostra da paciente LGH19, de caso familial, foram encontradas três variantes em genes relacionados ao fenótipo de surdez com mecanismo de herança autossômico dominante. São elas: c.2981G>A; p.Gly994Glu; NM_000495 no gene *COL4A5*; c.5836T>C;

p.Tyr1946His; NM_005422 no gene *TECTA* e c.6211G>A; p.Glu2071Lys; NM_002160 no gene *TNC*. Variantes patogênicas no gene *COL4A5* são associados à síndrome de Alport tipo 1, de mecanismo de herança dominante ligado ao X (KASHTAN, 1999). O gene codifica a cadeia alfa 5 do colágeno tipo 4. Na cóclea, essa cadeia é expressa na membrana de Reissner, no ligamento e limbo espiral e na membrana basal acima da membrana basilar. A cadeia 5 do colágeno tipo 4 também é componente da membrana basal de diversos outros tecidos, como rins e olhos (ZEHNDER et al., 2005). A síndrome de Alport tipo 1 manifesta nos pacientes, além do fenótipo de surdez, hematúria e anomalias oculares como catarata, miopia e alterações pigmentares da região perimacular (KASHTAN, 1999). O padrão de herança observado na família, com transmissão do gene alterado de homem não afetado para homem afetado, no entanto, não é condizente com a herança ligada ao cromossomo X. Ainda, vários indivíduos da família têm apenas o fenótipo de despigmentação de pele/cabelos que não está presente na síndrome de Alport. Não há também registros de doença renal, sinal muito frequente da síndrome de Alport. É, portanto, pouco provável uma relação causativa dessa variante com o quadro clínico de SW da família. Variantes patogênicas no gene *TECTA* são associadas à surdez autossômica dominante e recessiva não sindrômica (VERHOEVEN et al., 1998). O gene codifica a alfa-tectorina, um dos principais componentes da membrana tectorial, que é a matriz extracelular que entra em contato com os estereocílios das células ciliadas (LEGAN et al., 1997). Estudos de segregação são necessários para desvendar o significado da variante. A revisão da literatura não permite estabelecer uma relação com os fenótipos de despigmentação exibidos na SW presente na família. Na literatura, duas variantes patogênicas no gene *TNC* foram associadas à surdez autossômica dominante não sindrômica. O gene codifica a tenascina-C, componente da matriz extracelular presente na membrana basilar e na lâmina espiral óssea da cóclea (ZHAO et al., 2013). Estudos de segregação são importantes para confirmar ou refutar o impacto dessas variantes na paciente em questão. É interessante ressaltar que a amostra da paciente apresenta três variantes associadas a genes que codificam componentes de matriz extracelular na cóclea.

A amostra do paciente LGH20 revelou a variante c.906C>G; p.Phe302Leu; NM_002473 no gene *MYH9*. O gene já foi associado à surdez autossômica dominante não sindrômica. Sua proteína correspondente foi observada, em ratos, nas células ciliadas externas, na região subcentral do ligamento espiral e na membrana de Reissner, não sendo observada na estria vascular (LALWANI et al., 2000). É um, componente da miosina não muscular 2A (NM IIA). A partir da estrutura proteica, é possível prever que a variante encontrada no paciente

afeta aminoácido localizado no domínio da cabeça da proteína, mais especificamente a cabeça globular (PECCI et al., 2018). Em camundongos, a NM IIA foi observada nas células ciliadas (fortemente expressa nos estereocílios), no ligamento e limbo espiral. A partir dessas observações, os autores hipotetizaram que o quadro de perda auditiva é devido a um funcionamento inadequado dos estereocílios (LALWANI et al., 2008; MHATRE et al., 2006). Em uma família que apresentava surdez autossômica dominante, mapeada na região do gene *MYH9*, foi observada, na avaliação histológica do osso temporal do probando, displasia cócleo-sacular (de Scheibe), com degeneração do órgão de Corti, do epitélio do sáculo e da estria vascular. A disfunção da estria vascular é geralmente considerada como a causa da displasia cócleo-sacular. Entretanto, a ausência da MYH9 na estria vascular de ratos sugere que essa estrutura não está diretamente relacionada à displasia cócleo-sacular (LALWANI et al., 2000). Na descrição da família, feita por Lalwani et al. (1997), não houve descrição de anomalias pigmentares. A variante encontrada tem potencial para explicar somente o distúrbio auditivo compartilhado na família e depende de estudos de segregação para que seu papel seja confirmado.

A variante c.1861A>T; p.Ile621Phe; NM_080679 no gene *COL11A2* foi encontrada na amostra do paciente LGH24, um caso familial de SW. O gene já foi associado à surdez autossômica dominante não sindrômica. Camundongos com o gene nocauteado em homozigose apresentaram o fenótipo de perda auditiva de moderada a grave. Alterações no gene acometem a membrana tectorial, situação em que as fibras de colágeno perdem seu estado de organização (MCGUIRT et al., 1999). A variante c.1480+1G>T; NM_001042517 no gene *DIAPH3* foi encontrada na amostra do mesmo paciente. A variante afeta a primeira base após o exon 13, ou seja, afeta o sítio doador de *splicing*. Variantes patogênicas no gene já foram associadas à neuropatia auditiva. Schoen et al. (2010) associaram pela primeira vez o gene à neuropatia auditiva. Os autores descreveram uma variante com mecanismo de ganho de função na região 5' UTR, aumentando a sua expressão. O lócus que contém a variante nesse gene havia sido previamente mapeado em 2004 (KIM et al., 2004). Os autores hipotetizam que a super-expressão de *DIAPH3* pode causar dano às células ciliares internas, já que essas possuem 95% das inervações aferentes do nervo auditivo (SPOENDLIN, 1985). A variante pode, portanto, ser causativa apenas do fenótipo de surdez. Análises de segregação serão feitas para confirmar ou refutar essa hipótese.

Em resumo, dentre os genes contendo variantes encontradas na análise comparativa com os genes já associados ao fenótipo de surdez, foram encontradas variantes nos genes *EYA1, CHD7, MYO7A, TBC1D24, COL4A5, TECTA, TNC, MYH9, COL11A2* e *DIAPH3*. Destes, os potencialmente mais relacionados aos fenótipos de SW são *EYA1* e *CHD7* devido às evidências associativas de vias e proteínas em comum com os genes já relacionados à SW, no caso do gene *EYA1*, e do papel na migração de células da crista neural e diminuição da expressão de *SNAIL2* no camundongo nocaute, no caso do gene *CHD7*. Os outros genes têm potencial de explicar a perda auditiva, mas estudos de transmissão são necessários para confirmar essas hipóteses, além de evidências oriundas de outros tipos de análises.

A não detecção de uma variante claramente causativa nesse grupo de 14 pacientes pode significar que a causa da SW são variantes no número de cópias ou variantes em regiões não cobertas pela técnica de sequenciamento do exoma. A técnica de sequenciamento do exoma nem sempre demonstra desempenho adequado para a detecção de variação de número de cópias devido à natureza não adjacente dos exons capturados e devido ao *kit* de captura que seleciona apenas exons (SEABY; PENGELLY; ENNIS, 2016). Além disso, há de se considerar nesses casos a possibilidade de herança digênica, oligogênica ou poligênica, mecanismo pelos quais a combinação de variantes presentes em dois genes ou mais poderiam resultar no quadro de SW.

Análises de "enriquecimento" de variantes podem auxiliar a priorizar certos genes como candidatos a participar da origem do fenótipo de SW, sob a ótica de herança oligogênica ou poligênica. Tais análises requerem, no entanto, para serem implementadas, amostras maiores de pacientes e comparação com bases de dados de sequências de indivíduos controle. Essas análises são uma interessante perspectiva para o prosseguimento das pesquisas sobre a SW.

VI Conclusões

Dentre 25 probandos com amostras submetidas ao sequenciamento massivo em paralelo do exoma, foram encontradas as variantes causativas nos genes conhecidos da SW em 10 pacientes; quatro no gene *PAX3*, quatro no gene *MITF* e duas no gene *SOX10*. Como parte das amostras dos pacientes haviam sido rastreadas pelo sequenciamento de Sanger nos mesmos genes, os resultados indicam que houve falhas de cunho técnico, sendo provavelmente o *allele dropout* o principal fator que influenciou na não detecção das alterações nos estudos prévios conduzidos no laboratório.

A análise comparativa de trios de exomas realizada com amostras de seis famílias permitiu identificar a variante c.277G>A; p.Glu93Lys; NM_001614 no gene *ACTG1* como causa do quadro clínico da paciente LGH1, o que possibilitou o seu correto diagnóstico como Síndrome de Baraitser-Winter tipo 2. Essa mesma análise de trios possibilitou evidenciar a variante c.3583G>A; p.Ala1195Thr; NM_001080826 no gene *PRAG1* como potencialmente responsável pelo sinal clínico de canície no paciente LGH7.

Os 14 casos que não tiveram a variante causativa identificada pelas técnicas e análises anteriores foram submetidos a análises adicionais de filtragem de variantes: (1) análise de genes em comum contendo variantes, (2) análise da correspondência entre genes com variantes filtradas e lista de genes obtidos de uma rede de proteínas, e (3) análise da correspondência entre genes com variantes filtradas e lista de genes já estabelecidos no fenótipo da surdez sindrômica e não sindrômica. A primeira análise (1) evidenciou variantes nos genes *ARHGAP23, ERBB3, P4HA3, FOXM1, GGT1* e *PRTG* como algum potencial para explicar a surdez nos indivíduos. Desses seis genes, os mais provavelmente associados aos fenótipos de SW são *FOXM1* e *PRTG*, pois o primeiro afeta a estria vascular, que quando alterada leva à perda auditiva em pacientes com SW, e o segundo têm relação com funções desempenhadas por gene já estabelecido como causa da SW (*SNAIL2*). A segunda análise (2) evidenciou variantes nos genes *MAP3K5*, *EP300*, *IARS* e *MDM4* como potencialmente relacionadas ao fenótipo. Desses quatro genes, a revisão da literatura sugere associação aos fenótipos de SW aos genes *MAP3K5*, *EP300* e *MDM4*, devido às evidencias da relação com vias e proteínas já associadas à SW, além de evidências de relação com despigmentação em modelo animal. A terceira análise (3) evidenciou variantes nos genes *EYA1, CHD7, MYO7A, TBC1D24, COL4A5, TECTA, TNC, MYH9, COL11A2* e *DIAPH3* como potenciais para estar relacionadas à surdez nos indivíduos, com herança autossômica dominante. Dentre esses 10 genes, os mais potencialmente relacionados aos fenótipos de SW são *EYA1* e *CHD7*. O gene *EYA1* tem evidências de participar de vias que incluem proteínas em comum com as vias e proteínas dos genes já relacionados à SW. O gene *CHD7* tem papel na migração de células da crista neural e diminui a expressão de *SNAIL2,* gene relacionado à SW2, no camundongo nocaute.

A elucidação do papel das variantes nesses genes depende de estudos de segregação para que se confirmem suas relações com os sinais clínicos nos pacientes. Ao nosso ver, os genes que devem ser priorizados nesses estudos seriam: *PRAG1, FOXM1, PRTG, MAP3K5*, *EP300*, *MDM4, EYA1* e *CHD7*. Nossos resultados também sugerem que investigar a SW sob a ótica da herança oligogênica pode ser um dos próximos passos para sua melhor elucidação.

VII Referências

ABDELHAK, S. et al. A human homologue of the Drosophila eyes absent gene underlies Branchio-Oto-Renal (BOR) syndrome and identifies a novel gene family. **Nature Genetics**, v. 15, n. 2, p. 157–164, fev. 1997.

ADAMS, D. R.; ENG, C. M. Next-Generation Sequencing to Diagnose Suspected Genetic Disorders. **The New England journal of medicine**, v. 379, n. 14, p. 1353–1362, 2018.

ALLAWH, T.; BROWN, B. The Clinical Manifestations and Genetic Implications of Baraitser–Winter Syndrome Type 2. **Journal of Pediatric Genetics**, v. 06, n. 02, p. 107–110, 2016.

AMIEL, J. et al. Disruption of long-distance highly conserved noncoding elements in neurocristopathies. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1214, n. 1, p. 34–46, 2010.

ANTONSON, P. et al. Inactivation of the Nuclear Receptor Coactivator RAP250 in Mice Results in Placental Vascular Dysfunction. **Molecular and Cellular Biology**, v. 23, n. 4, p. 1260–1268, 2003.

ANTTONEN, T. et al. How to Bury the Dead: Elimination of Apoptotic Hair Cells from the Hearing Organ of the Mouse. **JARO - Journal of the Association for Research in Otolaryngology**, v. 15, n. 6, p. 975–992, 2014.

ARIAS, S; MOTA, M. Apparent non-penetrance for dystopia in Waardenburg syndrome type I, with some hints on the diagnosis of dystopia canthorum. **Journal de Genetique Humaine**, v. 26, n. 2, p. 103–31, 1978.

ATTIÉ, T. et al. Mutation of the endothelin-receptor B gene in Waardenburg-Hirschsprung disease. **Human Molecular Genetics**, v. 4, n. 12, p. 2407–2409, 1995.

AVANTAGGIATI, M. L. et al. Recruitment of p300/CBP in p53-dependent signal pathways. **Cell**, v. 89, n. 7, p. 1175–1184, 1997.

AYBAR, M. J. Snail precedes Slug in the genetic cascade required for the specification and migration of the Xenopus neural crest. **Development**, v. 130, n. 3, p. 483–494, 2003.

AZAIEZ, H. et al. TBC1D24 Mutation Causes Autosomal-Dominant Nonsyndromic Hearing Loss. **Human Mutation**, v. 35, n. 7, p. 819–823, 2014.

AZUMA, N. et al. Mutations of a human homologue of the Drosophila eyes absent gene (EYA1) detected in patients with congenital cataracts and ocular anterior segment anomalies. **Human molecular genetics**, v. 9, n. 3, p. 363–6, 12 fev. 2000.

BAJPAI, R. et al. CHD7 cooperates with PBAF to control multipotent neural crest formation. **Nature**, v. 463, n. 7283, p. 958–962, 2010.

BALDWIN, C. T. et al. An exonic mutation in the HuP2 paired domain gene causes Waardenburg ' s syndrome. **Nature**, v. 355, n. February, p. 637–638, 1992.

BALDWIN, C. T. et al. Mutations in PAX3 that cause Waardenburg syndrome type I: Ten new mutations and review of the literature. **American Journal of Medical Genetics**, v. 58, n. 2, p. 115–122, 1995.

BARABÁSI, A. L.; GULBAHCE, N.; LOSCALZO, J. Network medicine: A network-based approach to human disease. **Nature Reviews Genetics**, v. 12, n. 1, p. 56–68, 2011.

BARAITSER, M.; WINTER, R. M. Iris coloboma, ptosis, hypertelorism, and mental retardation: a new syndrome. **Journal of Medical Genetics**, v. 25, n. 1, p. 41–43, 1 jan. 1988.

BARAL, V. et al. Screening of MITF and SOX10 regulatory regions in Waardenburg

syndrome type 2. **PLoS ONE**, v. 7, n. 7, p. 1–8, 2012.
BAYNASH, A. G. et al. Interaction of endothelin-3 with endothelin-B receptor is essential for development of epidermal melanocytes and enteric neurons. **Cell**, v. 79, n. 7, p. 1277–85, 30 dez. 1994.
BENNICELLI, J L; FREDERICKS, W J; WILSON, R B; RAUSCHER, F J 3RD; BARR, F. G. Wild type PAX3 protein and the PAX3-FKHR fusion protein of alveolar rhabdomyosarcoma contain potent, structurally distinct transcriptional activation domains. **Oncogene**, v. 11, n. 1, p. 119–30, 1995.
BERA, T. K. et al. Five POTE paralogs and their splice variants are expressed in human prostate and encode proteins of different lengths. **Gene**, v. 337, n. SUPPL., p. 45–53, 2004.
BERTOLOTTO, C. et al. Different cis-acting elements are involved in the regulation of TRP1 and TRP2 promoter activities by cyclic AMP: pivotal role of M boxes (GTCATGTGCT) and of microphthalmia. **Molecular and cellular biology**, v. 18, n. 2, p. 694–702, 1998.
BLAIS, J. et al. Risk of misdiagnosis due to allele dropout and false-positive PCR artifacts in molecular diagnostics analysis of 30,769 genotypes. **Journal of Molecular Diagnostics**, v. 17, n. 5, p. 505–514, 2015.
BLOCH, K. D. et al. cDNA Cloning and Chromosomal Assignment of the Gene Encoding ndothelin 3. **J Biological Chemistry**, v. 264, p. 18156–61, 1989.
BOCÁNGEL, M. A. P. **Estudo genético e molecular da síndrome de Waardenburg**. 2014. Dissertação (Mestrado em Ciências - Genética e Biologia Evolutiva) - Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, São Paulo.
BOCÁNGEL, M. A. P. et al. Waardenburg syndrome: Novel mutations in a large Brazilian sample. **European Journal of Medical Genetics**, v. 61, n. 6, p. 348–354, 2018.
BONDURAND, N. Interaction among SOX10, PAX3 and MITF, three genes altered in Waardenburg syndrome. **Human Molecular Genetics**, v. 9, n. 13, p. 1907–1917, 2000.
BONDURAND, N. Maintenance of mammalian enteric nervous system progenitors by SOX10 and endothelin 3 signalling. **Development**, v. 133, n. 10, p. 2075–2086, 2006.
BONDURAND, N. et al. Deletions at the SOX10 Gene Locus Cause Waardenburg Syndrome Types 2 and 4. **The American Journal of Human Genetics**, v. 81, n. 6, p. 1169–1185, 2007.
BONDURAND, N. et al. Alu-mediated deletion of SOX10 regulatory elements in Waardenburg syndrome type 4. **European Journal of Human Genetics**, v. 20, n. 9, p. 990–994, 2012.
BONINI, N. M.; LEISERSON, W. M.; BENZER, S. The eyes absent gene: Genetic control of cell survival and differentiation in the developing Drosophila eye. **Cell**, v. 72, n. 3, p. 379–395, 1993.
BORROW, J. et al. The translocation t(8;16)(p11;p13) of acute myeloid leukaemia fuses a putative acetyltransferase to the CREB-binding protein. **Nature Genetics**, v. 14, n. 1, p. 33–41, 1996.
BOWEN, M. E.; ATTARDI, L. D. The role of p53 in developmental syndromes. **Journal of Molecular Cell Biology**, v. 11, n. 3, p. 200–211, 2019.
BOWLES, J.; SCHEPERS, G.; KOOPMAN, P. Phylogeny of the SOX family of developmental transcription factors based on sequence and structural indicators. **Developmental Biology**, v. 227, n. 2, p. 239–255, 2000.
BRENNER, L. et al. Novel splice mutation in microthalmia-associated transcription

factor in waardenburg syndrome. **Genetic Testing and Molecular Biomarkers**, v. 15, n. 7–8, p. 525–529, 2011.
BURRAGE, L. C. et al. Mitochondrial myopathy, lactic acidosis, and sideroblastic anemia (MLASA) plus associated with a novel de novo mutation (m.8969G>A) in the mitochondrial encoded ATP6 gene. **Molecular Genetics and Metabolism**, v. 113, n. 3, p. 207–212, 2014.
CAMARERO, G. et al. Delayed inner ear maturation and neuronal loss in postnatal Igf-1-deficient mice. **Journal of Neuroscience**, v. 21, n. 19, p. 7630–7641, 2001.
CHAI, P. et al. GSE1 negative regulation by miR-489-5p promotes breast cancer cell proliferation and invasion. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 471, n. 1, p. 123–128, 2016.
CHALEPAKIS, G.; WIJNHOLDS, J.; GRUSS, P. Pax-3 - DNA interaction: flexibility in the DNA binding and induction of DNA conformational changes by paired domains. **Nucleic Acids Research**, v. 22, n. 15, p. 3131–3137, 1994.
CHANG, C. H. et al. CK1α ablation in keratinocytes induces p53-dependent, sunburn-protective skin hyperpigmentation. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 114, n. 38, p. E8035–E8044, 2017.
CHEN, J. D.; EVANS, R. M. A transcriptional co-repressor that interacts with nuclear hormone receptors. **Nature**, v. 377, n. 6548, p. 454–457, 1995.
CHONG, J. X. et al. The Genetic Basis of Mendelian Phenotypes: Discoveries, Challenges, and Opportunities. **American Journal of Human Genetics**, v. 97, n. 2, p. 199–215, 2015.
CHRISTOPHOROU, N. A. D. et al. Activation of Six1 target genes is required for sensory placode formation. **Developmental Biology**, v. 336, n. 2, p. 327–336, 2009.
COBALEDA, C. et al. Function of the Zinc-Finger Transcription Factor *SNAI2* in Cancer and Development. **Annual Review of Genetics**, v. 41, n. 1, p. 41–61, 2007.
DARIN, N. et al. γ-glutamyl transpeptidase deficiency caused by a large homozygous intragenic deletion in GGT1. **European Journal of Human Genetics**, v. 26, n. 6, p. 808–817, 2018.
DEGOUL, F. et al. Clinical, biochemical, and molecular analysis of a maternally inherited case of Leight syndrome (MILS) associated with the mtDNA T8993G point mutation. **Journal of Inherited Metabolic Disease**, v. 18, n. 6, p. 682–688, 1995.
DEN DUNNEN, J. T. et al. HGVS Recommendations for the Description of Sequence Variants: 2016 Update. **Human Mutation**, v. 37, n. 6, p. 564–569, 2016.
DEWAN, A. T.; PARRADO, A. R.; LEAL, S. M. A second kindred linked to DFNA20 (17q25.3) reduces the genetic interval. **Clinical Genetics**, v. 63, n. 1, p. 39–45, 2003.
DIAS, A. M. M. **Estudo da Heterogeneidade genética da surdez por sequenciamento de nova geração**. 2018. Dissertação (Mestrado em Aconselhamento Genético e Genômica Humana) - Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, São Paulo.
DOURMISHEV, A. L. et al. Waardenburg syndrome. **International Journal of Dermatology**, v. 38, n. 9, p. 656–663, 1999.
EDERY, P. et al. Mutation of the endothelin-3 gene in the Waardenburg-Hirschsprung disease (Shah-Waardenburg syndrome). **Nature Genetics**, v. 12, n. 4, p. 442–444, 1996.
EMISON, E. S. et al. A common sex-dependent mutation in a RET enhancer underlies

Hirschsprung disease risk. **Nature**, v. 434, n. 7035, p. 857–863, abr. 2005.
FALAH, N. et al. 22q11.2q13 duplication including SOX10 causes sex-reversal and peripheral demyelinating neuropathy, central dysmyelinating leukodystrophy, Waardenburg syndrome, and Hirschsprung disease. **American Journal of Medical Genetics, Part A**, v. 173, n. 4, p. 1066–1070, 2017.
FARRER, L. A. 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**, v. 50, n. 5, p. 902–13, 1992.
FENSTAD, M. H. et al. STOX2 but not STOX1 is differentially expressed in decidua from preeclamptic women: Data from the Second Nord-Trøndelag Health Study. **Molecular Human Reproduction**, v. 16, n. 12, p. 960–968, 2010.
FERNANDEZ-MARMIESSE, A.; GOUVEIA, S.; COUCE, M. L. NGS Technologies as a Turning Point in Rare Disease Research , Diagnosis and Treatment. **Current Medicinal Chemistry**, v. 25, n. 3, p. 404–432, 2018.
FERNÁNDEZ, R. M. et al. Waardenburg syndrome type 4: Report of two new cases caused by SOX10 mutations in Spain. **American Journal of Medical Genetics, Part A**, v. 164, n. 2, p. 542–547, 2014.
FOSTER, J. et al. Identification of an IGSF3 mutation in a family with congenital nasolacrimal duct obstruction. **Clinical Genetics**, v. 86, n. 6, p. 589–591, 2014.
FRASER, F. C.; SPROULE, J. R.; HALAL, F. Frequency of the branchio-oto-renal (BOR) syndrome in children with profound hearing loss. **American Journal of Medical Genetics**, v. 7, n. 3, p. 341–349, 1980.
FROMER, M. et al. Discovery and statistical genotyping of copy-number variation from whole-exome sequencing depth. **American Journal of Human Genetics**, v. 91, n. 4, p. 597–607, 2012.
FU, J. et al. Anti-ACTL7a antibodies: A cause of infertility. **Fertility and Sterility**, v. 97, n. 5, p. 1226–1233.e8, 2012.
FUENTES FAJARDO, K. V. et al. Detecting false-positive signals in exome sequencing. **Human Mutation**, v. 33, n. 4, p. 609–613, abr. 2012.
GETTELFINGER, J.; DAHL, J. Syndromic Hearing Loss: A Brief Review of Common Presentations and Genetics. **Journal of Pediatric Genetics**, v. 07, n. 01, p. 001–008, 2018.
GONG, E. Y. et al. Expression of Atp8b3 in murine testis and its characterization as a testis specific P-type ATPase. **Reproduction**, v. 137, n. 2, p. 345–351, 2009.
GOODMAN, R. M. et al. Upper limb involvement in the Klein-Waardenburg syndrome. **American Journal of Medical Genetics**, v. 11, n. 4, p. 425–433, 1982.
GOPAL RAO, V. V. N.; LÖFFLER, C.; HANSMANN, I. The gene for the novel vasoactive peptide endothelin 3 (EDN3) is localized to human chromosome 20q13.2-qter. **Genomics**, v. 10, n. 3, p. 840–841, 1991.
HADDAD, N. M. et al. Molecular study of three lebanese and syrian patients with waardenburg syndrome and report of novel mutations in the EDNRB and MITF genes. **Molecular Syndromology**, v. 1, n. 4, p. 169–175, 2011.
HAUPT, S. et al. The long and the short of it: The MDM4 tail so far. **Journal of Molecular Cell Biology**, v. 11, n. 3, p. 231–244, 2019.
HE, Y. et al. Investigation of killer cell immunoglobulin-like receptors KIR2DL2 and KIR2DL3 diversity and identification of ten novel KIR2DL3 alleles in the Chinese han population. **Scandinavian Journal of Immunology**, v. 81, n. 4, p. 265–271, 2015.
HEATHER, J. M.; CHAIN, B. The sequence of sequencers: The history of sequencing DNA. **Genomics**, v. 107, n. 1, p. 1–8, 2016.

HEMESATH, T. J. et al. microphthalmia , a critical factor in melanocyte development , defines a discrete transcription factor family . **Genes & Development**, v. 8, p. 2770–2780, 1994.

HEMESATH, T. J. et al. MAP kinase links the transcription factor Microphthalmia to c-Kit signalling in melanocytes. **Nature**, v. 391, n. 6664, p. 298–301, 1998.

HEMMI, A. et al. Waardenburg syndrome type IIE in a Japanese patient caused by a novel non-frame-shift duplication mutation in the SOX10 gene. **Journal of Dermatology**, v. 45, n. 5, p. e110–e111, 2018.

HERBARTH, B. et al. Mutation of the Sry-related Sox10 gene in Dominant megacolon, a mouse model for human Hirschsprung disease. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 95, n. April, p. 5161–5165, 1998.

HIRAOKA, A. et al. Cloning, expression, and characterization of a cDNA encoding a novel human growth factor for primitive hematopoietic progenitor cells. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 94, n. 14, p. 7577–7582, 1997.

HÖFER, D.; NESS, W.; DRENCKHAHN, D. Sorting of actin isoforms in chicken auditory hair cells. **Journal of Cell Science**, v. 110, n. 6, p. 765–770, 1997.

HOFSTRA, R. M. W. et al. A homozygous mutation in the endothelin-3 gene associated with a combined Waardenburg type 2 and Hirschsprung phenotype (Shah-Waardenburg syndrome). **Nature Genetics**, v. 12, n. 4, p. 445–447, abr. 1996.

HOLSTER, T. et al. Loss of assembly of the main basement membrane collagen, type IV, but not fibril-forming collagens and embryonic death in collagen prolyl 4-hydroxylase i null mice. **Journal of Biological Chemistry**, v. 282, n. 4, p. 2512–2519, 2007.

HONG, C. S.; SAINT-JEANNET, J. P. Sox proteins and neural crest development. **Seminars in Cell and Developmental Biology**, v. 16, n. 6, p. 694–703, 2005.

HOOGEVEEN, A. T. et al. Characterization and localization of the huntington disease gene product. **Human Molecular Genetics**, v. 2, n. 12, p. 2069–2073, 1993.

HOSODA, K. et al. Targeted and natural (piebald-lethal) mutations of endothelin-B receptor gene produce megacolon associated with spotted coat color in mice. **Cell**, v. 79, n. 7, p. 1267–1276, 1994.

HOTH, C. F. et al. Mutations in the paired domain of the human PAX3 gene cause Klein-Waardenburg syndrome (WS-III) as well as Waardenburg syndrome type I (WS-I). **American journal of human genetics**, v. 52, n. 3, p. 455–62, 1993.

HOU, L.; PAVAN, W. J. Transcriptional and signaling regulation in neural crest stem cell-derived melanocyte development: Do all roads lead to Mitf? **Cell Research**, v. 18, n. 12, p. 1163–1176, 2008.

HSIAO, F. C. et al. Eyes Absent Mediates Cross-Talk between Retinal Determination Genes and the Receptor Tyrosine Kinase Signaling Pathway. **Developmental Cell**, v. 1, n. 1, p. 51–61, 2001.

HU, Q. et al. ZFHX3 is indispensable for ERβ to inhibit cell proliferation via MYC downregulation in prostate cancer cells. **Oncogenesis**, v. 8, n. 4, 2019.

INGHAM, N. J. et al. Mouse screen reveals multiple new genes underlying mouse and human hearing loss. **PLoS biology**, v. 17, n. 4, p. e3000194, 2019.

INOUE, K. et al. Molecular mechanism for distinct neurological phenotypes conveyed by allelic truncating mutations. **Nature Genetics**, v. 36, n. 4, p. 361–369, 2004.

ISSA, S. et al. EDNRB mutations cause Waardenburg syndrome type II in the heterozygous state. **Human Mutation**, v. 38, n. 5, p. 581–593, 2017.

ITO, K.; NAKAMURA, H.; WATANABE, Y. Protogenin mediates cell adhesion for ingression and re-epithelialization of paraxial mesodermal cells. **Developmental Biology**, v. 351, n. 1, p. 13–24, 2011.

IZUMIYAMA, T. et al. A novel big protein TPRBK possessing 25 units of TPR motif is essential for the progress of mitosis and cytokinesis. **Gene**, v. 511, n. 2, p. 202–217, 2012.

JOHNSTON, J. J. et al. Functional analysis of a de novo ACTB mutation in a patient with atypical baraitser-winter syndrome. **Human Mutation**, v. 34, n. 9, p. 1242–1249, 2013.

JONES, M. C. The Neurocristopathies: Reinterpretation Based Upon the Mechanism of Abnormal Morphogenesis. **Cleft Palate Journal**, v. 27, n. 2, p. 136–140, 1990.

KASHTAN, C. E. Alport Syndrome: An Inherited Disorder of Renal, Ocular, and Cochlear Basement Membranes. **Medicine**, v. 78, n. 5, p. 338–360, set. 1999.

KAWABATA, E. et al. Waardenburg syndrome: A variant with neurological involvement. **Ophthalmic Genetics**, v. 8, n. 3, p. 165–170, 1987.

KEARNS, A. E. et al. Cloning and Characterization of a Novel Protein Kinase That Impairs Osteoblast Differentiation in Vitro. **Journal of Biological Chemistry**, v. 276, n. 45, p. 42213–42218, 2001.

KELSH, R. N. Sorting out Sox10 functions in neural crest development. **BioEssays**, v. 28, n. 8, p. 788–798, 2006.

KEMERLEY, A. et al. A novel mutation in ACTG1 causing Baraitser-Winter syndrome with extremely variable expressivity in three generations. **Ophthalmic Genetics**, v. 38, n. 2, p. 152–156, 4 mar. 2017.

KHAITLINA, S. Y. Functional specificity of actin isoforms. **International Review of Cytology**, v. 202, p. 35–98, 2001.

KIM, J. H. et al. New variations of the EDNRB gene and its association with sporadic Hirschsprung's disease in Korea. **Journal of Pediatric Surgery**, v. 41, n. 10, p. 1708–1712, 2006.

KIM, T. B. et al. A gene responsible for autosomal dominant auditory neuropathy (AUNA1) maps to 13q14-21. **Journal of Medical Genetics**, v. 41, n. 11, p. 872–876, 2004.

KLEEFSTRA, T. et al. Disruption of an EHMT1-associated chromatin-modification module causes intellectual disability. **American Journal of Human Genetics**, v. 91, n. 1, p. 73–82, 2012.

KLEIN, D. Albinisme partiel (leucisme) accompagne de surdimutite, d'osteomyodysplasie, de raideurs articulaires congenitales multiples et d'autres malformations congenitales. **Arch. Julius Klaus Stift. Vererbungsforsch**, v. 22, p. 336–342, 1947.

KLEIN, D. Historical background and evidence for dominant inheritance of the Klein-Waardenburg syndrome (Type III). **American Journal of Medical Genetics**, v. 14, n. 2, p. 231–239, 1983.

KOEMANS, T. S. et al. Functional convergence of histone methyltransferases EHMT1 and KMT2C involved in intellectual disability and autism spectrum disorder. **PLOS Genetics**, v. 13, n. 10, p. e1006864, 25 out. 2017.

KOLEHMAINEN, J. et al. Cohen syndrome is caused by mutations in a novel gene, COH1, encoding a transmembrane protein with a presumed role in vesicle-mediated sorting and intracellular protein transport. **American Journal of Human Genetics**, v. 72, n. 6, p. 1359–1369, 2003.

KOPAJTICH, R. et al. Biallelic IARS Mutations Cause Growth Retardation with Prenatal Onset, Intellectual Disability, Muscular Hypotonia, and Infantile

Hepatopathy. **American Journal of Human Genetics**, v. 99, n. 2, p. 414–422, 2016.
KORBIE, D. J.; MATTICK, J. S. Touchdown PCR for increased specificity and sensitivity in PCR amplification. **Nature Protocols**, v. 3, n. 9, p. 1452–1456, 2008.
KOSHIISHI, N. et al. P300 Gene Alterations in Intestinal and Diffuse Types of Gastric Carcinoma. **Gastric Cancer**, v. 7, n. 2, p. 85–90, 2004.
KUANG, S. Q. et al. Deletion of the cancer-amplified coactivator AIB3 results in defective placentation and embryonic lethality. **Journal of Biological Chemistry**, v. 277, n. 47, p. 45356–45360, 2002.
KUBIC, J. D. et al. Pigmentation PAX-ways: The role of Pax3 in melanogenesis, melanocyte stem cell maintenance, and disease. **Pigment Cell and Melanoma Research**, v. 21, n. 6, p. 627–645, 2008.
KUHLBRODT, K. et al. Functional analysis of Sox10 mutations found in human Waardenburg-Hirschsprung patients. **The Journal of biological chemistry**, v. 273, n. 36, p. 23033–8, 1998.
KUKKOLA, L. et al. Identification and Characterization of a Third Human, Rat, and Mouse Collagen Prolyl 4-Hydroxylase Isoenzyme. **Journal of Biological Chemistry**, v. 278, n. 48, p. 47685–47693, 2003.
KUO, D. S.; LABELLE-DUMAIS, C.; GOULD, D. B. Col4a1 and col4a2 mutations and disease: Insights into pathogenic mechanisms and potential therapeutic targets. **Human Molecular Genetics**, v. 21, n. R1, 2012.
KURIHARA H, KURIHARA Y, NAGAI R, Y. Y. Endothelin and neural crest development. **Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)**, v. 45, p. 639–651, 1999.
LAHAV, R. Endothelin receptor B is required for the expansion of melanocyte precursors and malignant melanoma. **International Journal of Developmental Biology**, v. 49, n. 2–3 SPEC. ISS., p. 173–180, 2005.
LALWANI, A. K. et al. A Five-Generation Family with Late-Onset Progressive Hereditary Hearing Impairment Due to Cochleosaccular Degeneration. **Audiology and Neurotology**, v. 2, n. 3, p. 139–154, 1997.
LALWANI, A. K. et al. Human nonsyndromic hereditary deafness DFNA17 is due to a mutation in nonmuscle myosin MYH9. **American Journal of Human Genetics**, v. 67, n. 5, p. 1121–1128, 2000.
LALWANI, A. K. et al. Localization in stereocilia, plasma membrane, and mitochondria suggests diverse roles for NMHC-IIa within cochlear hair cells. **Brain Research**, v. 1197, p. 13–22, 2008.
LANG, D. et al. Pax3 is required for enteric ganglia formation and functions with Sox10 to modulate expression of c-ret. **Journal of Clinical Investigation**, v. 106, n. 8, p. 963–971, 2000.
LECERF, L. et al. An impairment of long distance SOX10 regulatory elements underlies isolated hirschsprung disease. **Human Mutation**, v. 35, n. 3, p. 303–307, 2014.
LEGAN, P. K. et al. The Mouse Tectorins. **Journal of Biological Chemistry**, v. 272, n. 13, p. 8791–8801, 1997.
LI, H.; DURBIN, R. Fast and accurate short read alignment with Burrows-Wheeler transform. **Bioinformatics**, v. 25, n. 14, p. 1754–1760, 2009.
LI, W. et al. New Genotypes and Phenotypes in Patients with 3 Subtypes of Waardenburg Syndrome Identified by Diagnostic Next-Generation Sequencing. **Neural Plasticity**, v. 2019, n. endothelin 3, p. 1–12, 2019.
LI, X. et al. Eya protein phosphatase activity regulates Six1-Dach-Eya transcriptional

effects in mammalian organogenesis. **Nature**, v. 426, n. 6964, p. 247–254, 2003.
LIMOGE, F. et al. Insulin response dysregulation explains abnormal fat storage and increased risk of diabetes mellitus type 2 in Cohen Syndrome. **Human molecular genetics**, v. 24, n. 23, p. 6603–6613, 2015.
LIU, H. et al. Organ of corti and stria vascularis: Is there an interdependence for survival? **PLoS ONE**, v. 11, n. 12, p. 1–21, 2016.
LIU, X.-Z. et al. Autosomal dominant non-syndromic deafness caused by a mutation in the myosin VIIA gene. **Nature Genetics**, v. 17, n. 3, p. 268–269, nov. 1997a.
LIU, X. et al. Mutations in the myosin VIIA gene cause non-syndromic recessive deafness. **Nature Genetics**, v. 16, n. 2, p. 188–190, jun. 1997b.
LIU, X. Z.; NEWTON, V. E.; READ, A. P. Waardenburg syndrome type II: Phenotypic findings and diagnostic criteria. **American Journal of Medical Genetics**, v. 55, n. 1, p. 95–100, 1995.
LÓPEZ-GALLARDO, E. et al. NARP syndrome in a patient harbouring an insertion in the MT-ATP6 gene that results in a truncated protein. **Journal of Medical Genetics**, v. 46, n. 1, p. 64–67, 2009.
MACDONALD, M. E. et al. A Novel Gene Containing a Trinucleotide That Is Expanded and Unstable on Huntington ' s Disease Chromosomes. **Cell**, v. 72, p. 971–983, 1993.
MACINA, R. A. et al. Genomic Organization of the Human PAX3 Gene : DNA Sequence Analysis of the Region Disrupted in Alveolar Rhabdomyosarcoma. **Genomics**, v. 8, p. 1–8, 1995.
MARINE, J. C.; JOCHEMSEN, A. G. MDMX (MDM4), a promising target for p53 reactivation therapy and beyond. **Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine**, v. 6, n. 7, p. 1–16, 2016.
MCCALLION, A. S.; CHAKRAVARTI, A. EDNRB/EDN3 and Hirschsprung disease Type II. **Pigment Cell Research**, v. 14, n. 3, p. 161–169, 2001.
MCGOWAN, K. A. et al. Ribosomal mutations cause p53-mediated dark skin and pleiotropic effects. **Nature Genetics**, v. 40, n. 8, p. 963–970, 2008.
MCGUIRT, W. T. et al. Mutations in COL11A2 cause non-syndromic hearing loss (DFNA13). **Nature Genetics**, v. 23, n. 4, p. 413–419, 1999.
MHATRE, A. N. et al. Expression of Myh9 in the mammalian cochlea: Localization within the stereocilia. **Journal of Neuroscience Research**, v. 84, n. 4, p. 809–818, set. 2006.
MILUNSKY, A., LIPSKY, N., SHEFFER, R., ZLOTOGORA, J., BALDWIN, C. A mutation in the Waardenburg syndrome (WS-I) gene in a family with "WS-III". (Abstract). **American journal of human genetics**, v. 51, n. Supplementary, p. A222, 1992.
MILUNSKY, J. M. et al. The Value of MLPA in Waardenburg Syndrome. **Genetic Testing**, v. 11, n. 2, p. 179–182, 2007.
MISSLER, M. et al. α-neurexins couple Ca 2+ channels to synaptic vesicle exocytosis. **Nature**, v. 423, n. 6943, p. 939–948, 2003.
MOLLAAGHABABA, R.; PAVAN, W. J. The importance of having your SOX on: Role of SOX10 in the development of neural crest-derived melanocytes and glia. **Oncogene**, v. 22, n. 20, p. 3024–3034, 2003.
MORELL, R. J. et al. A new locus for late-onset, progressive, hereditary hearing loss DFNA20 maps to 17q25. **Genomics**, v. 63, n. 1, p. 1–6, 2000.
MORIMOTO, N. et al. Homozygous EDNRB mutation in a patient with Waardenburg syndrome type 1. **Auris Nasus Larynx**, v. 45, n. 2, p. 222–226, 2018.
MORIYAMA, M. et al. Notch signaling via Hes1 transcription factor maintains survival

of melanoblasts and melanocyte stem cells. **Journal of Cell Biology**, v. 173, n. 3, p. 333–339, 2006.
MORRILL, S.; HE, D. Z. Z. Apoptosis in inner ear sensory hair cells. **Journal of Otology**, v. 12, n. 4, p. 151–164, 2017.
MYLLYHARJU, J. Prolyl 4-hydroxylases, key enzymes in the synthesis of collagens and regulation of the response to hypoxia, and their roles as treatment targets. **Annals of Medicine**, v. 40, n. 6, p. 402–417, 2008.
NAGY, N.; GOLDSTEIN, A. M. Endothelin-3 regulates neural crest cell proliferation and differentiation in the hindgut enteric nervous system. **Developmental Biology**, v. 293, n. 1, p. 203–217, 2006.
NASLAVSKY, M. S. et al. Exomic variants of an elderly cohort of Brazilians in the ABraOM database. **Human Mutation**, v. 38, n. 7, 2017.
NAYAK, C. S.; ISAACSON, G. **Worldwide distribution of Waardenburg syndromeAnnals of Otology, Rhinology and Laryngology**, 2003.
NIETO, M. et al. Control of cell behavior during vertebrate development by Slug, a zinc finger gene. **Science**, v. 264, n. 1987, p. 835–9, 1994.
NIETO, M. A. The snail superfamily of zinc-finger transcription factors. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 3, n. 3, p. 155–166, 2002.
NINOMIYA, T. et al. Regulation of the alpha-fetoprotein gene by the isoforms of ATBF1 transcription factor in human hepatoma. **Hepatology (Baltimore, Md.)**, v. 35, n. 1, p. 82–7, jan. 2002.
NOUBIAP, J. J. N. et al. Waardenburg syndrome in childhood deafness in Cameroon. **SAJCH South African Journal of Child Health**, v. 8, n. 1, p. 3–6, 2014.
ORENSTEIN, N. et al. Bi-allelic IARS mutations in a child with intra-uterine growth retardation, neonatal cholestasis, and mild developmental delay. **Clinical Genetics**, v. 91, n. 6, p. 913–917, 2017.
OSAKI, J. H. **O papel de RhoA e Rac1 GTPases nas respostas celulares após danos no DNA induzidos por radiação ionizante gama**. 2015. Tese (Doutorado em Ciências - Bioquímica) - Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.
PANDYA, A. et al. Phenotypic variation in Waardenburg syndrome: Mutational heterogeneity, modifier genes or polygenic background? **Human Molecular Genetics**, v. 5, n. 4, p. 497–502, 1996.
PANG, X. et al. A homozygous MITF mutation leads to familial Waardenburg syndrome type 4. **American Journal of Medical Genetics, Part A**, v. 179, n. 2, p. 243–248, 2019.
PARDONO, E. **Estudo genético-clínico da síndrome de Waardenburg**. 1999. Dissertação (Mestrado em Biologia) - Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, São Paulo.
PARDONO, E. et al. Waardenburg syndrome: Clinical differentiation between types I and II. **American Journal of Medical Genetics**, v. 117A, n. 3, p. 223–235, 2003.
PARDONO, E. **Estudo genético-clínico e molecular da síndrome de Waardenburg e de suas condições afins**. 2005. Tese (Doutorado em Genética) - Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, São Paulo.
PARKER, M.; BITNER-GLINDZICZ, M. Genetic investigations in childhood deafness. **Arch Dis Child**, p. 1–8, 2014.
PECCI, A. et al. MYH9: Structure, functions and role of non-muscle myosin IIA in human disease. **Gene**, v. 664, n. April, p. 152–167, 2018.
PEIRANO, R. I. et al. Protein zero gene expression is regulated by the glial transcription factor Sox10. **Molecular and cellular biology**, v. 20, n. 9, p. 3198–

209, 2000.
PÉREZ-LOSADA, J. et al. Zinc-finger transcription factor Slug contributes to the function of the stem cell factor c-kit signaling pathway. **Blood**, v. 100, n. 4, p. 1274–1286, 2002.
PERISSI, V. et al. Deconstructing repression: Evolving models of co-repressor action. **Nature Reviews Genetics**, v. 11, n. 2, p. 109–123, 2010.
PINGAULT, V. et al. SOX10 mutations in patients with Waardenburg-Hirschsprung disease. **Nature Genetics**, v. 18, n. 2, p. 171–173, fev. 1998.
PINGAULT, V. A heterozygous endothelin 3 mutation in Waardenburg-Hirschsprung disease: is there a dosage effect of EDN3/EDNRB gene mutations on neurocristopathy phenotypes? **Journal of Medical Genetics**, v. 38, n. 3, p. 205–209, 2001.
PINGAULT, V. et al. SOX10 mutations in chronic intestinal pseudo-obstruction suggest a complex physiopathological mechanism. **Human Genetics**, v. 111, n. 2, p. 198–206, 2002.
PINGAULT, V. et al. Review and update of mutations causing Waardenburg syndrome. **Human Mutation**, v. 31, n. 4, p. 391–406, 2010.
POTTERF, S. B. et al. Transcription factor hierarchy in Waardenburg syndrome: Regulation of MITF expression by SOX10 and PAX3. **Human Genetics**, v. 107, n. 1, p. 1–6, 2000.
PRICE, E. R. et al. Lineage-specific signaling in melanocytes. C-kit stimulation recruits p300/CBP to microphthalmia. **J Biological Chemistry**, v. 273, n. 29, p. 17983–17987, 1998.
PRICKETT, T. D. et al. Somatic mutations in MAP3K5 attenuate its proapoptotic function in melanoma through increased binding to thioredoxin. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 134, n. 2, p. 452–460, 2014.
PUFFENBERGER, E. G. et al. Identity-by-descent and association mapping of a recessive gene for Hirschsprung disease on human chromosome 13q22. **Human Molecular Genetics**, v. 3, n. 8, p. 1217–1225, 1994a.
PUFFENBERGER, E. G. et al. A missense mutation of the endothelin-B receptor gene in multigenic hirschsprung's disease. **Cell**, v. 79, n. 7, p. 1257–1266, dez. 1994b.
RAUSCHENDORF, M. A. et al. Homozygous intronic MITF mutation causes severe Waardenburg syndrome type 2A. **Pigment Cell and Melanoma Research**, v. 32, n. 1, p. 85–91, 2019.
RAYAPUREDDI, J. P. et al. Eyes absent represents a class of protein tyrosine phosphatases. **Nature**, v. 426, n. 6964, p. 295–298, 2003.
READ, A. P.; NEWTON, V. E. E. Syndrome of the month. **Journal of medical genetics**, v. 34, p. 744, 1997.
RIVIÈRE, J. B. et al. De novo mutations in the actin genes ACTB and ACTG1 cause Baraitser-Winter syndrome. **Nature Genetics**, v. 44, n. 4, p. 440–444, 2012.
ROBINSON, M. J.; COBB, M. H. Mitogen-activated protein kinase pathways. **Current Opinion in Cell Biology**, v. 9, n. 2, p. 180–186, 1997.
ROSENBLATT, J.; RAFF, M. C.; CRAMER, L. P. An epithelial cell destined for apoptosis signals its neighbors to extrude it by an actin- and myosin-dependent mechanism. **Current Biology**, v. 11, n. 23, p. 1847–1857, nov. 2001.
ROTHSCHILD, G. et al. A role for kit receptor signaling in Leydig cell steroidogenesis. **Biology of reproduction**, v. 69, n. 3, p. 925–32, 2003.
SALDANA-CABOVERDE, A.; KOS, L. Roles of endothelin signaling in melanocyte development and melanoma. **Pigment Cell and Melanoma Research**, v. 23, n. 2, p. 160–170, 2010.

SANCHEZ-CALDERON, H. et al. RNA microarray analysis in prenatal mouse cochlea reveals novel IGF-I target genes: Implication of MEF2 and FOXM1 transcription factors. **PLoS ONE**, v. 5, n. 1, 2010.

SÁNCHEZ-MARTÍN, M. et al. SLUG (SNAI2) deletions in patients with Waardenburg disease. **Human molecular genetics**, v. 11, n. 25, p. 3231–3236, 2002.

SÁNCHEZ-MARTÌN, M.; GONZÁLEZ-HERRERO, I.; SÁNCHEZ-GARCÎA, I. SNAI2 (snail homolog 2). **Atlas of Genetics and Cytogenetics in Oncology and Haematology**, v. 8, n. 2, p. 81–83, 2004.

SANGER, F. et al. Nucleotide sequence of bacteriophage φX174 DNA. **Nature**, v. 265, n. 5596, p. 687–695, fev. 1977.

SANGER, F.; NICKLEN, S.; COULSON, A. R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 74, n. 12, p. 5463–5467, 1 dez. 1977.

SASAHIRA, T. et al. Storkhead box 2 and melanoma inhibitory activity promote oral squamous cell carcinoma progression. **Oncotarget**, v. 7, n. 18, p. 26751–26764, 2016.

SATO-JIN, K. et al. Epistatic connections between microphthalmia-associated transcription factor and endothelin signaling in Waardenburg syndrome and other pigmentary disorders. **The FASEB Journal**, v. 22, n. 4, p. 1155–1168, abr. 2008.

SATO, S. et al. CBP/p300 as a co-factor for the Microphthalmia transcription factor. **Oncogene**, v. 14, n. 25, p. 3083–3092, 1997.

SATO, S. et al. Conserved expression of mouse Six1 in the pre-placodal region (PPR) and identification of an enhancer for the rostral PPR. **Developmental Biology**, v. 344, n. 1, p. 158–171, 2010.

SCHOEN, C. J. et al. Increased activity of Diaphanous homolog 3 (DIAPH3)/diaphanous causes hearing defects in humans with auditory neuropathy and in Drosophila. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 107, n. 30, p. 13396–13401, 2010.

SCHOUWEY, K. et al. Notch1 and Notch2 receptors influence progressive hair graying in a dose-dependent manner. **Developmental Dynamics**, v. 236, n. 1, p. 282–289, 2007.

SCHRADERS, M. et al. Mutations of the gene encoding otogelin are a cause of autosomal-recessive nonsyndromic moderate hearing impairment. **American Journal of Human Genetics**, v. 91, n. 5, p. 883–889, 2012.

SCHWARZBRAUN, T. et al. A new 3p interstitial deletion including the entireMITF gene causes a variation of Tietz/Waardenburg type IIA syndromes. **American Journal of Medical Genetics Part A**, v. 143A, n. 6, p. 619–624, 15 mar. 2007.

SEABY, E. G.; PENGELLY, R. J.; ENNIS, S. Exome sequencing explained: A practical guide to its clinical application. **Briefings in Functional Genomics**, v. 15, n. 5, p. 374–384, 2016.

SEFTON, M.; SÁNCHEZ, S.; NIETO, M. A. Conserved and divergent roles for members of the Snail family of transcription factors in the chick and mouse embryo. **Development (Cambridge, England)**, v. 125, n. 16, p. 3111–3121, 1998.

SELICORNI, A. et al. Cytogenetic mapping of a novel locus for type II Waardenburg syndrome. **Human Genetics**, v. 110, n. 1, p. 64–67, 2002.

SELLECK, M. A. J.; BRONNER-FRASER, M. Origins of the avian neural crest: The role of neural plate-epidermal interactions. **Development**, v. 121, n. 2, p. 525–538, 1995.

SHAH, K. N. et al. White forelock, pigmentary disorder of irides, and long segment Hirschsprung disease: Possible variant of Waardenburg syndrome. **The Journal of Pediatrics**, v. 99, n. 3, p. 432–435, 1981.

SHEFFER, R; ZLOTOGORA, J. Autosomal Dominant Inheritance of Klein-Waardenburg Syndrome. v. 42, p. 320–322, 1992.

SHIBA, Y.; RANDAZZO, P. A. ArfGAPs: key regulators for receptor sorting. **Receptors & Clinical Investigation**, v. 1, n. 5, p. 1–12, 2014.

SIMÕES-COSTA, M.; BRONNER, M. E. Establishing neural crest identity: a gene regulatory recipe. **Development (Cambridge, England)**, v. 142, n. 2, p. 242–257, 2015.

SONG, J. et al. Hearing loss in Waardenburg syndrome: A systematic review. **Clinical Genetics**, v. 89, n. 4, p. 416–425, 2016.

SPOENDLIN, H. Anatomy of Cochlear Innervation. **American Journal of Otolaryngology--Head and Neck Medicine and Surgery**, v. 6, n. 6, p. 453–467, 1985.

STANKOVIC, K. et al. Survival of adult spiral ganglion neurons requires erbB receptor signaling in the inner ear. **Journal of Neuroscience**, v. 24, n. 40, p. 8651–8661, 2004.

STEEL, K. P.; DAVIDSON, D. R.; JACKSON, I. J. TRP-2/DT, a new early melanoblast marker, shows that steel growth factor (c-kit ligand) is a survival factor. **Development (Cambridge, England)**, v. 115, n. 4, p. 1111–9, 1992.

STEVENSON, R. E. et al. Biallelic deletions of the Waardenburg II syndrome gene, SOX10, cause a recognizable arthrogryposis syndrome. **American Journal of Medical Genetics, Part A**, v. 176, n. 9, p. 1968–1971, 2018.

STOLT, C. C.; WEGNER, M. SoxE function in vertebrate nervous system development. **International Journal of Biochemistry and Cell Biology**, v. 42, n. 3, p. 437–440, 2010.

SUN, X. et al. Frequent somatic mutations of the transcription factor ATBF1 in human prostate cancer. **Nature Genetics**, v. 37, n. 4, p. 407–412, 2005.

SYRRIS, P.; CARTER, N. D.; PATTON, M. A. Novel nonsense mutation of the endothelin-B receptor gene in a family with Waardenburg-Hirschsprung disease. **American Journal of Medical Genetics**, v. 87, n. 1, p. 69–71, 1999.

TACHIBANA, MASAYOSHI; TAKEDA, KAZUHISA; NOBUKUNI, YOSHITAKA; URABE, KAZUNORI; LONG, JASON E; MEYERS, KIMBERLY A; AARONSON, STUART A; MIKI, T. Ectopic expression of MITF, a gene for Waardenburg syndrome type 2, converts fibroblast to cells with melanocyte characteristics. **Nat Genet.**, v. 14, n. 3, p. 353–6, 1996.

TACHIBANA, M.; KOBAYASHI, Y.; MATSUSHIMA, Y. Review – Pigment Gene Focus Mouse Models for Four Types of Waardenburg Syndrome. p. 448–454, 2003.

TAN, Y.; RAYCHAUDHURI, P.; COSTA, R. H. Chk2 Mediates Stabilization of the FoxM1 Transcription Factor To Stimulate Expression of DNA Repair Genes. **Molecular and Cellular Biology**, v. 27, n. 3, p. 1007–1016, 2007.

TANAKA, H. et al. Novel Actin-Like Proteins T-ACTIN 1 and T-ACTIN 2 Are Differentially Expressed in the Cytoplasm and Nucleus of Mouse Haploid Germ Cells. **Biology of Reproduction**, v. 69, n. 2, p. 475–482, 2003.

TANAKA, H. et al. Genetic Polymorphisms within The Intronless ACTL7A and ACTL7B Genes Encoding Spermatogenesis-Specific Actin-Like Proteins in Japanese Males. v. 13, n. 3, p. 245–249, 2019.

TANG, H. Y. et al. DNA sequence analysis and genotype-phenotype assessment in 71 patients with syndromic hearing loss or auditory neuropathy. **BMJ Open**, v. 5,

n. 5, p. 1–7, 2015.
TARNASKY, H. et al. A novel testis-specific gene, SPAG4, whose product interacts specifically with outer dense fiber protein ODF27, maps to human chromosome 20q11.2. **Cytogenetics and Cell Genetics**, v. 81, n. 1, p. 65–67, 1998.
TASSABEHJI, M. et al. The mutational spectrum in Waardenburg syndrome. **Hum Mol Genet**, v. 4, n. 11, p. 2131–2137, 1995.
TASSABEHJI, M.; NEWTON, V. E. E.; READ, A. P. P. Waardenburg syndrome type 2 caused by mutations in the human microphthalmia (MITF) gene. **Nature genetics**, v. 8, n. 3, p. 251–255, 1994.
TEKIN, M. et al. Waardenburg syndrome type 3 (Klein - Waardenburg syndrome) segregating with a heterozygous deletion in the paired box domain of PAX3: A simple variant or a true sydrome? **Clinical Genetics**, v. 60, n. 4, p. 301–304, 2001.
TIEBER, V. L. et al. Complete characterization and sequence of an HLA class II DRβ chain cDNA from the DR5 haplotype. **Journal of Biological Chemistry**, v. 261, n. 6, p. 2738–2742, 1986.
TOURAINE, R. L. et al. Neurological Phenotype in Waardenburg Syndrome Type 4 Correlates with Novel SOX10 Truncating Mutations and Expression in Developing Brain. **The American Journal of Human Genetics**, v. 66, n. 5, p. 1496–1503, 2000.
USHKARYOV, Y. et al. Neurexins: synaptic cell surface proteins related to the alpha-latrotoxin receptor and laminin. **Science**, v. 257, n. 5066, p. 50–56, 3 jul. 1992.
VAAGS, A. K. et al. Rare deletions at the neurexin 3 locus in autism spectrum disorder. **American Journal of Human Genetics**, v. 90, n. 1, p. 133–141, 2012.
VERHOEVEN, K. et al. Mutations in the human α-tectorin gene cause autosomal dominant non-syndromic hearing impairment. **Nature Genetics**, v. 19, n. 1, p. 60–62, maio 1998.
VERLOES, A. et al. Baraitser-Winter cerebrofrontofacial syndrome: Delineation of the spectrum in 42 cases. **European Journal of Human Genetics**, v. 23, n. 3, p. 292–301, 2015.
VIÑUELA, A. et al. Genetic and phenotypic heterogeneity in two novel cases of Waardenburg syndrome type IV. **American Journal of Medical Genetics Part A**, v. 149A, n. 10, p. 2296–2302, 2009.
VISSERS, L. E. L. M. et al. Mutations in a new member of the chromodomain gene family cause CHARGE syndrome. **Nature Genetics**, v. 36, n. 9, p. 955–957, 2004.
WAARDENBURG, P. J. A new syndrome combining developmental anomalies of the eyelids, eyebrows and nose root with pigmentary defects of the iris and head hair and with congenital deafness. **American journal of human genetics**, v. 3, n. 3, p. 195–253, 1951.
WANG, I.-C. et al. Forkhead Box M1 Regulates the Transcriptional Network of Genes Essential for Mitotic Progression and Genes Encoding the SCF (Skp2-Cks1) Ubiquitin Ligase. **Molecular and Cellular Biology**, v. 25, n. 24, p. 10875–10894, 2005.
WANG, K.; LI, M.; HAKONARSON, H. ANNOVAR: Functional annotation of genetic variants from high-throughput sequencing data. **Nucleic Acids Research**, v. 38, n. 16, p. 1–7, 2010.
WANG, L.; BESERRA, C.; GARBERS, D. L. A novel aminophospholipid transporter exclusively expressed in spermatozoa is required for membrane lipid asymmetry and normal fertilization. **Developmental Biology**, v. 267, n. 1, p. 203–215, 2004.

WANG, Q. et al. Structures of the four Ig-like domain LILRB2 and the four-domain LILRB1 and HLA-G1 complex. **Cellular and Molecular Immunology**, n. June, p. 1–10, 2019.
WANG, X. et al. A de novo deletion mutation in SOX10 in a Chinese family with Waardenburg syndrome type 4. **Scientific Reports**, v. 7, p. 1–8, 2017.
WANG, Y. C. et al. Protogenin prevents premature apoptosis of rostral cephalic neural crest cells by activating the α5βI1-integrin. **Cell Death and Disease**, v. 4, n. 6, 2013.
WATANABE, A. et al. Epistatic relationship between Waardenburg syndrome genes MITF and PAX3. **Nature Genetics**, v. 18, n. 3, p. 283–286, 1998.
WATANABE, K. et al. Expression of the Sox10 gene during mouse inner ear development. **Brain Res Mol Brain Res**, v. 84, n. 1–2, p. 141–145, 2000.
WEAVER, K. L. et al. NACK is an integral component of the notch transcriptional activation complex and is critical for development and tumorigenesis. **Cancer Research**, v. 74, n. 17, p. 4741–4751, 2014.
WEGNER, M. From head to toes: The multiple facets of Sox proteins. **Nucleic Acids Research**, v. 27, n. 6, p. 1409–1420, 1999.
WEGNER, M. Secrets to a healthy Sox life: Lessons for melanocytes. **Pigment Cell Research**, v. 18, n. 2, p. 74–85, 2005.
WELL, D. et al. Defective myosin VIIA gene responsible for Usher syndrome type IB. **Nature**, v. 374, n. 6517, p. 60–61, 1995.
WILDHARDT, G. et al. Spectrum of novel mutations found in waardenburg syndrome types 1 and 2: Implications for molecular genetic diagnostics. **BMJ Open**, v. 3, n. 3, 2013.
WOLLNIK, B. et al. Homozygous and heterozygous inheritance of PAX3 mutations causes different types of Waardenburg syndrome. **American journal of medical genetics. Part A**, v. 122A, n. 1, p. 42–5, 2003.
WRIGHT, C. F. et al. Genetic diagnosis of developmental disorders in the DDD study: A scalable analysis of genome-wide research data. **The Lancet**, v. 385, n. 9975, p. 1305–1314, 2015.
WRIGHT, C. F. et al. Making new genetic diagnoses with old data: iterative reanalysis and reporting from genome-wide data in 1,133 families with developmental disorders. **GENETICS in MEDICINE**, v. 00, n. July 2017, 2018.
XU, P. X. et al. Eya1-deficient mice lack ears and kidneys and show abnormal apoptosis of organ primordia. **Nature Genetics**, v. 23, n. 1, p. 113–117, 1999.
YAMADA, K.; TSUJI, T.; KUNIEDA, T. Phenotypic characterization of ggt1dwg/dwg mice, a mouse model for hereditary γ-glutamyl transferase deficiency. **Experimental Animals**, v. 62, n. 2, p. 151–157, 2013.
YANG, J. et al. PAC, an evolutionarily conserved membrane protein, is a proton-activated chloride channel. **Science**, v. 364, n. 6438, p. 395–399, 2019.
YANG, T. et al. Double heterozygous mutations of MITF and PAX3 result in Waardenburg syndrome with increased penetrance in pigmentary defects. **Clinical Genetics**, v. 83, n. 1, p. 78–82, 2013.
YAO, P.; FOX, P. L. Aminoacyl-tRNA synthetases in medicine and disease. **EMBO Molecular Medicine**, v. 5, n. 3, p. 332–343, 2013.
YARIZ, K. O. et al. Mutations in OTOGL, encoding the inner ear protein otogelin-like, cause moderate sensorineural hearing loss. **American Journal of Human Genetics**, v. 91, n. 5, p. 872–882, 2012.
YASUMOTO, K. et al. Microphthalmia-associated transcription factor as a regulator for melanocyte-specific transcription of the human tyrosinase gene. **Molecular and**

cellular biology, v. 14, n. 12, p. 8058–70, 1994.
YOKOYAMA, S.; TAKEDA, K.; SHIBAHARA, S. SOX10, in combination with Sp1, regulates the endothelin receptor type B gene in human melanocyte lineage cells. **FEBS Journal**, v. 273, n. 8, p. 1805–1820, 2006.
ZAMAN A, CAPPER R, B. W. Waardenburg syndrome: more common than you think! **Clin Otolaryngol**, v. 40, n. 1, p. 44–48, 2015.
ZAZO SECO, C. et al. Allelic mutations of KITLG, encoding KIT ligand, cause asymmetric and unilateral hearing loss and Waardenburg syndrome type 2. **American Journal of Human Genetics**, v. 97, n. 5, p. 647–660, 2015.
ZEHNDER, A. F. et al. Distribution of type IV collagen in the cochlea in Alport syndrome. **Archives of Otolaryngology - Head and Neck Surgery**, v. 131, n. 11, p. 1007–1013, 2005.
ZHANG, G. et al. P53 pathway is involved in cell competition during mouse embryogenesis. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 114, n. 3, p. 498–503, 2017.
ZHANG, L. et al. A Dominant Mutation in the Stereocilia-Expressing Gene TBC1D24 is a Probable Cause for Nonsyndromic Hearing Impairment. **Human Mutation**, v. 35, n. 7, p. 814–818, 2014.
ZHANG, L. et al. A lateral signalling pathway coordinates shape volatility during cell migration. **Nature Communications**, v. 7, n. May, p. 1–13, 2016.
ZHAO, Y. et al. Exome Sequencing and Linkage Analysis Identified Tenascin-C (TNC) as a Novel Causative Gene in Nonsyndromic Hearing Loss. **PLoS ONE**, v. 8, n. 7, 2013.
ZHU, L. et al. Spatiotemporal regulation of endothelin receptor-B by SOX10 in neural crest-derived enteric neuron precursors. **Nature Genetics**, v. 36, n. 7, p. 732–737, 2004.
ZHU, M. et al. Mutations in the γ-Actin Gene (ACTG1) Are Associated with Dominant Progressive Deafness (DFNA20/26). **American Journal of Human Genetics**, v. 73, n. 5, p. 1082–1091, 2003.
ZLOTOGORA, J. et al. Homozygosity for Waardenburg syndrome. **American journal of human genetics**, v. 56, n. 5, p. 1173–8, 1995.

VIII Anexos

Anexo A – Termos de consentimento livre e esclarecido

Universidade de São Paulo
Instituto de Biociências

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO
(maiores de 18 anos)

ESTUDO: Estudo molecular da heterogeneidade genética na surdez não-sindrômica e sindrômica

Você foi convidado(a) a participar do projeto de pesquisa acima citado. O documento abaixo contém todas as informações necessárias sobre a pesquisa que estamos fazendo. Sua colaboração neste estudo será de muita importância para nós.

Eu,
.....
(inserir o nome), residente e domiciliado na
....., portador da Cédula de identidade, RG
..... , e inscrito no CPF/MF..... nascido(a) em _____ / _____ /_____ , abaixo assinado(a), concordo de livre e espontânea vontade em participar do estudo "Estudo molecular da heterogeneidade genética na surdez não-sindrômica e sindrômica" , e esclareço que obtive todas as informações.
Estou ciente de que:
O estudo se faz necessário para que se possam descobrir as possíveis causas de algumas doenças hereditárias como a "***surdez sindrômica e a surdez não-sindrômica***" que é um defeito do sistema auditivo.

I) Será feita a coleta de 10 ml. de sangue.

II) Essa coleta será feita apenas para este estudo e em nada influenciará o meu tratamento; não vai me curar; não vai me causar nenhum problema, exceto o pequeno incômodo de dor no momento da coleta (introdução da agulha para retirada do sangue).

III) Tenho a liberdade de desistir ou de interromper a colaboração neste estudo no momento em que desejar, sem necessidade de qualquer explicação;

IV) A desistência não causará nenhum prejuízo à minha saúde ou bem estar físico. Não virá interferir no atendimento ou tratamento médico;

V) Os resultados obtidos durante este ensaio serão mantidos em sigilo, mas concordo que sejam divulgados em publicações científicas, desde que meus dados pessoais não sejam mencionados;

VI) Caso eu desejar, poderei tomar conhecimento dos resultados, ao final desta pesquisa:
( ) Desejo conhecer os resultados desta pesquisa.
( ) Não desejo conhecer os resultados desta pesquisa.

VII) Caso tenham sido tiradas fotografias,

( ) concordo que sejam incluídas em publicações científicas, se necessário

( ) concordo que sejam apresentadas em aulas para profissionais da saúde

( ) não concordo que sejam incluídas em nenhum tipo de publicação ou apresentação.

VIII) O material colhido será armazenado por um tempo considerado necessário para a identificação e caracterização do gene e de sua mutação e/ou mecanismo genético responsável pela doença observada na minha família.

São Paulo, de de 20_____

Participante: .....

Pesquisador Responsável pelo Projeto: _____

Regina Célia Mingroni Netto **- Bióloga**

Telefone para contato: (11) 3091-7478

Pesquisador e instituição responsáveis pelas amostras de DNA:

_____

Dra. Regina Célia Mingroni Netto

CRBio/SP 10.238-01

Depto de Genética e Biologia Evolutiva

Instituto de Biociências – USP

Universidade de São Paulo
Instituto de Biociências

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO
(menores de18 anos)

ESTUDO: Estudo molecular da heterogeneidade genética na surdez não-sindrômica e sindrômica

Seu (Sua) filho(a) está sendo convidado a participar do projeto de pesquisa acima citado. O documento abaixo contém todas as informações necessárias sobre a pesquisa que estamos fazendo. Sua colaboração neste estudo será de muita importância para nós.

Eu .....
RG ..... , abaixo assinado(a), concordo de livre e espontânea vontade que meu(minha) filho(a) ..... nascido(a) em _____ / _____ /_____ , participe do estudo "Estudo molecular da heterogeneidade genética na surdez não-sindrômica e sindrômica" e esclareço que obtive todas informações necessárias.
as informações.

Estou ciente de que:

O estudo se faz necessário para que se possam descobrir as possíveis causas de algumas doenças hereditárias como a "***surdez sindrômica e a surdez não-sindrômica***" que é um defeito do sistema auditivo.

I) Será feita a coleta de 10 ml. de sangue.

II) Essa coleta será feita apenas para este estudo e em nada influenciará no tratamento; não vai curar; não vai causar nenhum problema, exceto o pequeno incômodo de dor no momento da coleta (introdução da agulha para retirada do sangue).

III) Tenho a liberdade de desistir ou de interromper a colaboração neste estudo no momento em que desejar, sem necessidade de qualquer explicação;

IV) A desistência não causará nenhum prejuízo à saúde ou bem estar físico. Não virá interferir no atendimento ou tratamento médico;

V) Os resultados obtidos durante este ensaio serão mantidos em sigilo, mas concordo que sejam divulgados em publicações científicas, desde que meus os dados pessoais de meu filho não sejam mencionados;

VI) Caso eu desejar, poderei tomar conhecimento dos resultados, ao final desta pesquisa:

( ) Desejo conhecer os resultados desta pesquisa.

( ) Não desejo conhecer os resultados desta pesquisa.

VII) Caso tenham sido tiradas fotografias,

( ) concordo que sejam incluídas em publicações científicas, se necessário

( ) concordo que sejam apresentadas em aulas para profissionais da saúde

( ) não concordo que sejam incluídas em nenhum tipo de publicação ou apresentação.

VIII) O material colhido será armazenado por um tempo considerado necessário para a identificação e caracterização do gene e de sua mutação e/ou mecanismo genético responsável pela doença observada na minha família.

São Paulo, de de 20_____

Participante: .....

Pesquisador Responsável pelo Projeto: _____

Regina Célia Mingroni Netto **- Bióloga**

Telefone para contato: (11) 3091-7478

Pesquisador e instituição responsáveis pelas amostras de DNA:

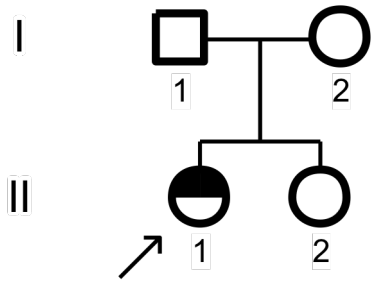
_____

Dra. Regina Célia Mingroni Netto
CRBio/SP 10.238-01
Depto de Genética e Biologia Evolutiva
Instituto de Biociências – USP

Anexo B – Descrição das cinco genealogias submetidas à análise de trios.

LGH2

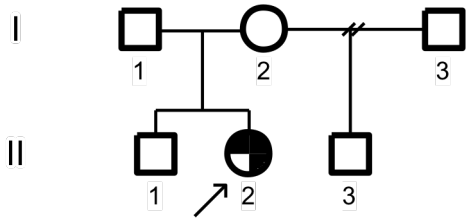
Família de Santo André, São Paulo, com caso isolado de SW2.



Propósita (II-1), 28 anos, sexo feminino, com surdez neurossensorial profunda bilateral, sinófre discreta, íris azuis hipoplásicas.

LGH4

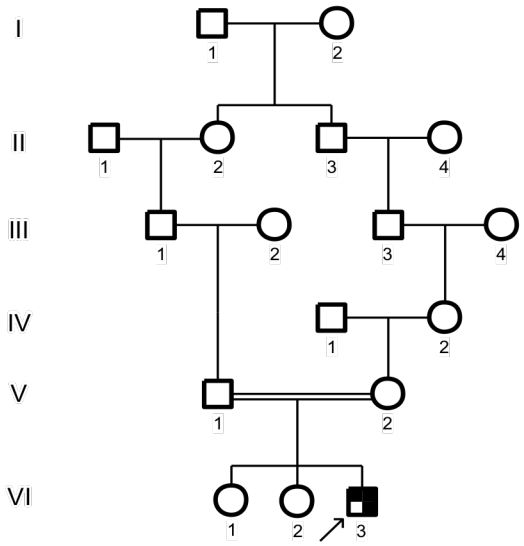
Família de São Paulo, com caso isolado de SW2



Propósita (II-2), 23 anos, sexo feminino, com canície precoce, surdez neurossensorial profunda bilateral, sinófre discreta, índice *W* = 1,81, heterocromia parcial à direita (íris D castanha com porção superior azulada e íris E azul) vitiligo pronunciado e manchas cutâneas hiperpigmentadas.

LGH7

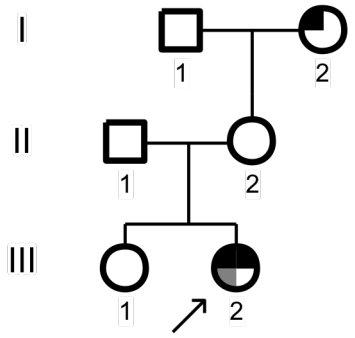
Família de São Paulo, com caso isolado de SW2.



Propósito (VI-3), 36 anos, sexo masculino, com canície frontal, surdez neurossensorial profunda bilateral, índice *W* = 1,31, íris azuis hipoplásicas com manchas marrons (heterocromia atípica).

LGH11

Família de Diadema, São Paulo, com caso "isolado?" de SW1.

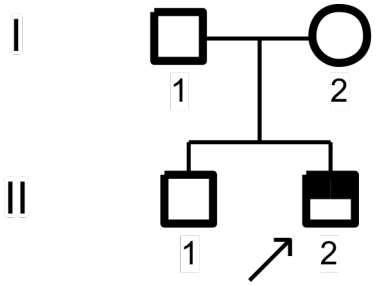


Propósita (III-2), 8 anos, sexo feminino, com surdez bilateral congênita, heterocromia parcial, íris azuis hipoplásicas, impressão de telecanto.

Sua avó (I-2) apresentou perda auditiva aos 32 anos e possui olhos azuis.

LGH14

Família de João Pessoa, Paraíba, com caso isolado de SW2.

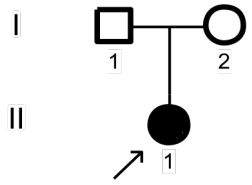


Propósito (II-2), 4 anos, sexo masculino, com perda auditiva, heterocromia total à esquerda, com íris azul hipoplásica.

Anexo C – Descrição de nove genealogias dos probandos sem variante detectada após sequenciamento do exoma.

LGH6

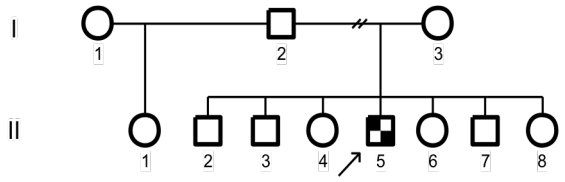
Família de São Paulo, com caso isolado de SW1.



Propósita (II-1), 40 anos, sexo feminino, com mecha branca frontal, canície precoce, surdez neurossensorial profunda unilateral à direita, sinófre, telecanto, índice $W = 2{,}51$, heterocromia parcial bilateral da íris (olhos predominantemente castanhos com manchas azuis) e hipoplasia das asas nasais.

LGH8

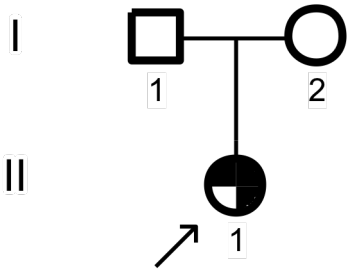
Família de Maringá, Paraná, com caso isolado de SW2.



Propósito (II-5), 53 anos, sexo masculino, com mecha branca frontal (aos 20 anos de idade) surdez moderada (30 a 40% de perda auditiva) mista (D) e condutiva (E), sinófre, índice $W = 1{,}82$.

LGH9

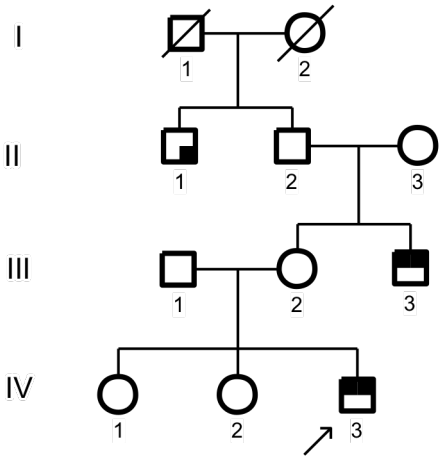
Família de São Paulo, com caso isolado de SW2.



Propósita (II-1), 17 anos, sexo feminino, com mecha branca frontal, surdez profunda bilateral, heterocromia parcial à direita, íris azul hipoplásica, mancha hipocrômica no dorso da mão direita.

LGH16

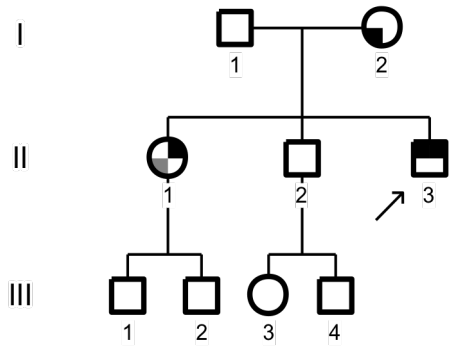
Família de Caçapava, São Paulo, com caso familial de SW2.



Propósito (IV-3), 37 anos, sexo masculino, com surdez neurossensorial profunda bilateral, sinófre, heterocromia parcial à esquerda (porção inferior azulada), índice $W = 1{,}91$.

LGH17

Família de São Paulo, com caso familial de SW2.

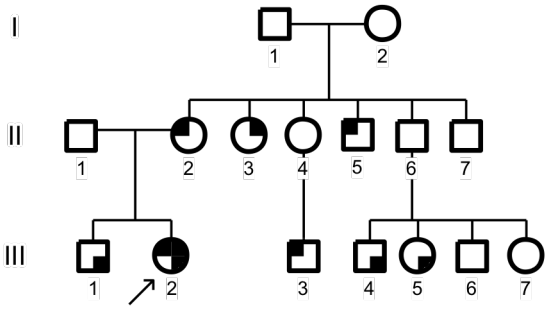


Propósito (II-3), 33 anos, sexo masculino, com surdez profunda à direita e parcial à esquerda, sinófre, heterocromia parcial à esquerda, índice W =1,71.

I-2: telecanto
II-1: impressão de telecanto (W=1,96) e heterocromia parcial bilateral

LGH19

Família de Maringá, Paraná, com caso familial de SW2.

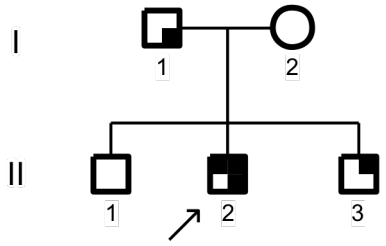


Propósita (III-2), 30 anos, sexo feminino, apresenta: Mecha branca frontal, canície precoce, surdez neurossensorial profunda bilateral, índice W = 1,79, manchas hipocrômicas no corpo.

II-2: perda auditiva (D)
II-3: heterocromia parcial (E)
II-5: surdez profunda bilateral
III-1: canície precoce, mancha hipopigmentada no abdomem
III-3: perda auditiva
III-4 e III-5: canície precoce

LGH20

Família de Marialva, Paraná, com caso familial de SW2.



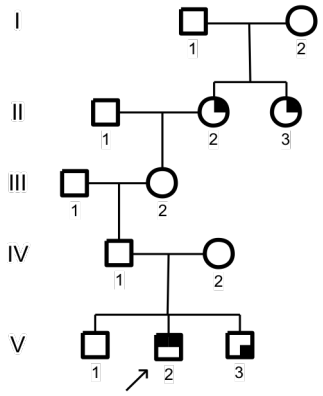
Propósito (II-2), 32 anos, sexo masculino, com canície precoce, mecha branca occipital, surdez neurossensorial profunda bilateral, sinófre, W = 1,84, íris azuis hipoplásicas atípicas.

I-1: canície precoce

II-3: heterocromia à (E)

LGH24

Família de Limeira, São Paulo, com caso familial de SW2.

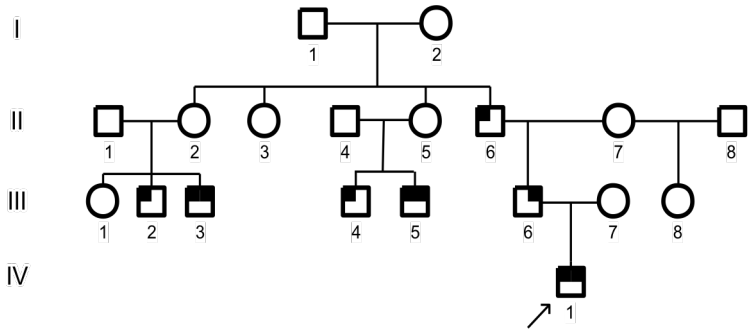


Propósito (V-2), 6 anos, sexo masculino, com surdez profunda bilateral, heterocromia total à esquerda, com íris azul hipoplásica.

II-2: heterocromia total à (D)
II-3: distúrbio de íris não especificado
V-3: mecha branca frontal congênita

LGH25

Família de São Paulo, com caso familial de SW2.



Propósito (IV-1), 4 anos, sexo masculino, com surdez profunda bilateral, íris azuis hipoplásicas.

III-6: íris azuis hipoplásicas, com heterocromia parcial à (D)
Os outros indivíduos da família apresentam perda auditiva e/ou distúrbio de pigmentação da íris não especificado, segundo a legenda dos símbolos.

Anexo D – Lista dos 113 genes correspondentes às 113 proteínas incluídas na rede construída a partir das proteínas dos genes conhecidos de SW.

Gene	Código *Ensembl* da proteína	Gene	Código *Ensembl* da proteína	Gene	Código *Ensembl* da proteína
RPS4X	ENSP00000362744.4	*RAD18*	ENSP00000264926.2	*RPL10L*	ENSP00000298283.3
IARS	ENSP00000364794.3	*CASP10*	ENSP00000286186.6	*CFLAR*	ENSP00000312455.2
RPL24	ENSP00000377640.3	*GRK2*	ENSP00000312262.5	*EDN1*	ENSP00000368683.5
RPSA	ENSP00000346067.4	*RPL21*	ENSP00000346027.4	*UBB*	ENSP00000304697.3
EPRS	ENSP00000355890.3	*SOX10*	ENSP00000380093.2	*MAP3K5*	ENSP00000351908.4
RPS11	ENSP00000270625.1	*PML*	ENSP00000268058.3	*CDC20*	ENSP00000361540.1
MARS	ENSP00000262027.5	*RPS27A*	ENSP00000272317.6	*RPS3A*	ENSP00000346050.3
RPL14	ENSP00000379506.2	*RPL4*	ENSP00000311430.6	*CASP8*	ENSP00000351273.4
CHD4	ENSP00000349508.3	*RPL23*	ENSP00000420311.2	*RPL19*	ENSP00000225430.4
TGFBR2	ENSP00000351905.4	*MAPK1*	ENSP00000215832.6	*EEF1E1*	ENSP00000369038.5
UBC	ENSP00000441543.1	*KEL*	ENSP00000347409.2	*XK*	ENSP00000367879.3
SIAH2	ENSP00000322457.3	*RPL23A*	ENSP00000389103.2	*EDNRB*	ENSP00000366416.4
QARS	ENSP00000307567.6	*RPS23*	ENSP00000296674.8	*RPS16*	ENSP00000251453.2
FASLG	ENSP00000356694.2	*RPL22*	ENSP00000346088.3	*LARS*	ENSP00000377954.2
RPLP0	ENSP00000449328.1	*EP300*	ENSP00000263253.7	*KITLG*	ENSP00000228280
RPL37A	ENSP00000418082.1	*RANBP2*	ENSP00000283195.6	*RPL17*	ENSP00000397798
PIAS3	ENSP00000376765.2	*MAPK14*	ENSP00000229795.3	*RPL35A*	ENSP00000419117
USP13	ENSP00000263966.3	*RPS25*	ENSP00000435096.1		
GNA11	ENSP00000078429.3	*RPL18A*	ENSP00000222247.4		
AIMP1	ENSP00000378191.4	*RPL11*	ENSP00000363676.4		
SKP2	ENSP00000274255.6	*DAXX*	ENSP00000363668.5		
RPL7A	ENSP00000361076.3	*HDAC1*	ENSP00000362649.3		
UBA2	ENSP00000246548.3	*RPS19*	ENSP00000470972.1		
USP7	ENSP00000343535.4	*HDAC2*	ENSP00000430432.1		
KARS	ENSP00000325448.5	*RANGAP1*	ENSP00000401470.2		
SMAD3	ENSP00000332973.4	*FADD*	ENSP00000301838.4		
AIMP2	ENSP00000223029.3	*KIT*	ENSP00000288135.5		
TNFRSF10A	ENSP00000221132.3	*EDNRA*	ENSP00000315011.5		
RPL35	ENSP00000259469.4	*SMAD4*	ENSP00000341551.3		
PAX3	ENSP00000375921.2	*RPS15A*	ENSP00000318646.4		
RPL15	ENSP00000309334.4	*TP53*	ENSP00000269305.4		
MDM2	ENSP00000258149.6	*UBE2I*	ENSP00000348056.4		
RPS24	ENSP00000414321.1	*RPL9*	ENSP00000400467.2		
RPL32	ENSP00000416429.2	*EDN3*	ENSP00000337128.2		
SNAI2	ENSP00000380034.2	*RPS12*	ENSP00000230050.3		
SUMO1	ENSP00000376077.2	*TFE3*	ENSP00000314129.7		
RPS26	ENSP00000348849.5	*RPL27A*	ENSP00000346015.5		
RPS8	ENSP00000379888.3	*FAAP20*	ENSP00000383710.4		
TFEB	ENSP00000351742.2	*RPL10A*	ENSP00000363018.3		
UBE2S	ENSP00000264552.8	*RPL18*	ENSP00000447001.1		
RPS13	ENSP00000435777.1	*HSPB1*	ENSP00000248553.6		
MITF	ENSP00000295600.7	*KDM1A*	ENSP00000383042.4		
FAS	ENSP00000347979.3	*RARS*	ENSP00000231572.3		
MDM4	ENSP00000356150.3	*RPS5*	ENSP00000472985.1		
PTEN	ENSP00000361021.3	*EPOR*	ENSP00000222139.5		
UBA52	ENSP00000388107.1	*DARS*	ENSP00000264161.4		
TNFRSF10B	ENSP00000276431.4	*RPS10*	ENSP00000481646.1		
E2F3	ENSP00000262904.4	*TGFB1*	ENSP00000221930.4		

Anexo E – Lista dos 172 genes já conhecidos relacionados à perda auditiva sindrômica e não sindrômica.

Genes			
ACTG1	*ESRRB*	*MT-RNR1*	*SMPX*
ADCY1	*EYA1*	*MT-TL1*	*SNAI2*
ADGRV1	*EYA4*	*MT-TS1*	*SOX10*
AIFM1	*FAM65B*	*MT-ATP6*	*SPNS2*
ALMS1	*FGF3*	*MYH14*	*STRC*
ATP2B2	*FGFR1*	*MYH9*	*SYNE4*
ATP6V1B1	*FGFR2*	*MYO15A*	*TBC1D24*
BDP1	*FOXI1*	*MYO3A*	*TBX1*
BSND	*GAB1*	*MYO6*	*TCOF1*
CABP2	*GATA3*	*MYO7A*	*TECTA*
CACNA1D	*GIPC3*	*NARS2*	*TECTB*
CCDC50	*GJB2*	*NDP*	*TIMM8A*
CD164	*GJB3*	*NLRP3*	*TJP2*
CDC14A	*GJB6*	*OPA1*	*TMC1*
CDH23	*GPSM2*	*OSBPL2*	*TMEM132E*
CEACAM16	*GRAP*	*OTOA*	*TMIE*
CHD7	*GRHL2*	*OTOF*	*TMPRSS3*
CIB2	*GRXCR1*	*OTOG*	*TNC*
CISD2	*GRXCR2*	*OTOGL*	*TPRN*
CLDN14	*GSDME*	*P2RX2*	*TRIOBP*
CLIC5	*HARS*	*PAX3*	*TSPEAR*
CLPP	*HARS2*	*PCDH15*	*TWNK*
CLRN1	*HDAC8*	*PDE1C*	*USH1C*
COCH	*HGF*	*PDZD7*	*USH1G*
COL11A1	*HOMER2*	*PEX1*	*USH2A*
COL11A2	*HSD17B4*	*PEX6*	*WBP2*
COL2A1	*IFNLR1*	*PJVK*	*WFS1*
COL4A3	*ILDR1*	*PNPT1*	*WHRN*
COL4A4	*KARS*	*POLR1C*	
COL4A5	*KCNE1*	*POLR1D*	
COL4A6	*KCNJ10*	*POU3F4*	
COL9A1	*KCNQ1*	*POU4F3*	
COL9A2	*KCNQ4*	*PPI5K2*	
CRYM	*KITLG*	*PRPS1*	
DCDC2	*LARS2*	*PTPRQ*	
DIABLO	*LHFPL5*	*RDX*	
DIAPH1	*LMX1A*	*REST*	
DIAPH3	*LOXHD1*	*ROR1*	
DMXL2	*LOXL3*	*S1PR2*	
DSPP	*LRTOMT*	*SEMA3E*	
EDN3	*MARVELD2*	*SERPINB6*	
EDNRB	*MCM2*	*SIX1*	
ELMOD3	*MET*	*SIX5*	
EPS8	*MIR96*	*SLC17A8*	
EPS8L2	*MIRN96*	*SLC22A4*	
ERAL1	*MITF*	*SLC26A4*	
ESPN	*MPZL2*	*SLC26A5*	
ESRP1	*MSRB3*	*SLITRK6*	

Anexo F – Descrição das variantes candidatas selecionadas em cada indivíduo.

LGH2														
Gene	Fenótipo OMIM	RefSeq	Variante - DNA	Variante - Proteína	dbSNP	1000 Genomas	*Exome Sequencing Project*	ExAC	ABraOM	ClinVar - classificação	Deafness Variation Database - classificação	SIFT	*PolyPhen-2*	*Mutation Taster*
Variantes filtradas não herdadas encontradas através da análise de trio														
TNN	ND	NM_022093	c.3799A>T	p.Ile1267Phe	-	0	0	NA	0	ND	ND	Deletéria	Possivelmente patogênica	*Disease causing*
HMCN1	Degeneração macular relacionada à idade, 1, AD	NM_031935	c.2351A>G	p.Lys784Arg	-	0	0	NA	0	ND	ND	Tolerável	Benigna	Polimorfismo
MTBP	ND	NM_022045	c.1339+2T>G	-	-	0	0	NA	0	ND	ND	ND	ND	*Disease causing*
OTOG	Surdez não sindrômica AR	NM_001277269	c.7011C>T	p.Thr2337=	rs562104032	0,000199	0	NA	0	ND	Efeito desconhecido	NA	NA	NA / *Disease causing*
GOLGA6L3	ND	NM_001310153	c.717G>T	p.Gln239His	rs372171595	0	0	NA	0	ND	ND	NA	NA	NA
ZNF233	ND	NM_181756	c.675T>C	p.His675=	-	0	0	NA	0	ND	ND	NA	NA	NA
Variantes em genes em comum com três ocorrências ou mais entre os 14 probandos														
ARHGAP23	ND	NM_001199417	c.1919G>A	p.Arg640His	-	0,00079872	0	0,0005	0	ND	ND	ND	Possivelmente patogênica	*Disease causing*
ERBB3	Síndrome de contratura congênita letal, AR; suscetibilidade a euritroleucemia familial, AD	NM_001982	c.2747G>A	p.Arg916Gln	rs548359026	0,00039936	0	0,0003 (ExAC AFR)	0	ND	ND	Tolerável	Benigna	*Disease causing*
IGSF3	Defeito de canal lacrimal, AR	NM_001542	c.1901G>T	p.Arg634Leu	rs190300523	0	0	NA	0	ND	ND	Deletéria	Provavelmente patogênica	*Disease causing*
NCOR2	ND	NM_006312	c.4196C>T	p.Thr1399Met	rs115154917	0,00019968	0	NA	0	ND	ND	Deletéria	Provavelmente patogênica	*Disease causing*
P4HA3	ND	NM_182904	c.755A>T	p.Glu252Val	-	0	0	NA	0	ND	ND	Deletéria	Possivelmente patogênica	*Disease causing*
TTC28	ND	NM_001145418	c.157C>A	p.Leu53Met	rs779104194	0	0	0,0002	0	ND	ND	Tolerável	Possivelmente patogênica	*Disease causing*
Variantes candidatas encontradas em comparação com lista de genes obtidos da rede de proteínas														
MAP3K5	ND	NM_005923	c.2099_2100 del	p.Leu700fs	-	0	0	NA	0	ND	ND	NA	NA	NA
Variantes candidatas encontradas em comparação com lista de genes já relacionados ao fenótipo de surdez														
GIPC3	Surdez AR não sindrômica	NM_133261	c.122C>A	p.Thr41Lys	rs727503062	0	0	NA	0	Provavelmente patogênica	Patogênica	Tolerável	Benigna	*Disease causing*
TMPRSS3	Surdez AR não sindrômica	NM_032405	c.572G>A	p.Arg191Lys	-	0	0	NA	0	ND	ND	Tolerável	Possivelmente patogênica	*Disease causing*

LGH4														
Gene	Fenótipo OMIM	RefSeq	Variante - DNA	Variante - Proteína	dbSNP	1000 Genomas	*Exome Sequencing Project*	ExAC	ABraOM	ClinVar - classificação	Deafness Variation Database - classificação	SIFT	*PolyPhen-2*	*Mutation Taster*
Variantes filtradas não herdadas encontradas através da análise de trio														
LOR	Síndrome de Vohwinkel com ictiose, AD	NM_000427	c.586T>G	p.Cys196Gly	rs142603426	0	0	0	0	ND	ND	ND	Benigna	Polimorfismo
ATM	Ataxia-telangiectasia, AR; Susceptibilidade ao câncer de mama, AD	NM_000051	c.2491G>A	p.Asp831Asn	rs1060501595	0	0	NA	0	Significado incerto	ND	Deletéria	Benigna	Polimorfismo
ZNF846	ND	NM_001077624	c.428A>G	p.Glu143Gly	rs781170385	0	0	0,00828	0	ND	ND	Deletéria	Benigna	Polimorfismo
SIGLEC16	ND	NM_001348364	c.847G>A	p.Asp283Asn	-	0	0	NA	0	ND	ND	NA	NA	NA
SIGLEC16	ND	NM_001348364	c.870C>T	p.His290=	rs779586136	0	0	0,0002	0	ND	ND	NA	NA	NA
MBTPS2	Síndrome de Olmsted; Síndrome IFAP com ou sem síndrome de BRESHECK; Queratose folicular espinulosa decalvante; Osteogênese imperfeita, LXR	NM_0158884	c.307G>A	p.Ala103Thr	rs146730876	0,00053	0,0009	0,0006	0	ND	ND	Tolerável	Benigna	*Disease causing*
Variantes em genes em comum com três ocorrências ou mais entre os 14 probandos														
IGSF3	Defeito de canal lacrimal, AR	NM_001542	c.773C>T	p.Ser258Leu	-	0	0	NA	1	ND	ND	Deletéria	Possivelmente patogênica	*Disease causing*
CLEC11A	ND	NM_002975	c.457A>C	p.Thr153Pro	rs771589211	0	0	0,0002 (ExAC NFE)	0	ND	ND	Deletéria	Provavelmente patogênica	*Disease causing*
GSE1	ND	NM_014615	c.2455C>T	p.Arg819Trp	-	0	0	NA	0	ND	ND	Deletéria	Provavelmente patogênica	*Disease causing*
HLA-DRB5	ND	NM_002125	c.590G>C	p.Gly197Ala	rs189435670	0	0	NA	0	ND	ND	Deletéria	Possivelmente patogênica	*Disease causing*
HLA-DRB5	ND	NM_002125	c.635C>T	p.Pro212Leu	rs111541713	0	0	NA	0	ND	ND	Deletéria	Provavelmente patogênica	Polimorfismo
SPAG4	ND	NM_003116	c.380C>T	p.Pro127Leu	rs45438692	0,00079	0,0022	0,0009	2	ND	ND	Deletéria	Provavelmente patogênica	*Disease causing*
TMEM206	ND	NM_001198862	c.511C>T	p.Arg171Cys	rs148063790	0,00019	0,0015	0,0007	1	ND	ND	Deletéria	Possivelmente patogênica	*Disease causing*
ACTL7A	ND	NM_006687	c.640G>A	p.Gly214Ser	rs41278347	0,0025	0,0047	0,0048	4	ND	ND	Deletéria	Provavelmente patogênica	*Disease causing*
Variantes candidatas encontradas em comparação com lista de genes já relacionados ao fenótipo de surdez														
EYA1	Síndrome branquio-otorrenal, AD	NM_000503	c.884T>C	p.Leu295Ser	rs146687496	0,000199	0,0003	0,0001	2	ND	Significado incerto	Tolerável	Possivelmente patogênico	*Disease causing*
STRC	Surdez AR não sindrômica	NM_153700	c.3460C>T	p.Arg1154*	rs576724182	0,001996	0	0,001	0	ND	Significado incerto	ND	ND	*Disease causing*
TRIOBP	Surdez AR não sindrômica	NM_001039141	c.634G>A	p.Gly212Ser	rs201794404	0,000199	0,0008	0,0014	6	Significado incerto	Provavelmente benigna	Deletéria	Benigna	Polimorfismo

LGH6														
Gene	Fenótipo OMIM	RefSeq	Variante - DNA	Variante - Proteína	dbSNP	1000 Genomas	*Exome Sequencing Project*	ExAC	ABraOM	ClinVar - classificação	Deafness Variation Database - classificação	SIFT	*PolyPhen-2*	*Mutation Taster*
Variantes em genes em comum com três ocorrências ou mais entre os 14 probandos														
ATP8B3	ND	NM_138813	c.2171G>A	p.Arg724Gln	rs202073926	0,00019	0,0007	0,0009	3	Significado incerto	ND	Deletéria	Provavelmente patogênica	*Disease causing*
ZFHX3	Câncer de próstata somático	NM_006885	c.7751T>C	p.Leu2584Pro	-	0	0	NA	0	ND	ND	Deletéria	Provavelmente patogênica	*Disease causing*
ERBB3	Síndrome de contratura congênita letal, AR; suscetibilidade a euritroleucemia familial, AD	NM_001982	c.89C>T	p.Pro30Leu	rs56017157	0,0009	0,0015	0,0021	4	ND	ND	Tolerável	Benigna	*Disease causing*
TTC28	ND	NM_001145418	c.4172C>T	p.Pro1391Leu	rs763076899	0	0	NA	3	ND	ND	Deletéria	Benigna	*Disease causing*
CLEC11A	ND	NM_002975	c.819_820ins GCCCA	p.Gly273fs	rs559864710	0,0009	0,0016	0,0017	3	ND	ND	NA	NA	NA
GSE1	ND	NM_014615	c.104A>G	p.Asn35Ser	rs148537143	0	0,0002	0,0002	0	ND	ND	Tolerável	Provavelmente patogênica	*Disease causing*
HTT	Doença de Huntington AD; síndrome de Lopes-Maciel-Rodan, AR	NM_002111	c.6153-1G>A	NA	-	0	0	NA	0	ND	ND	NA	NA	*Disease causing*
NRXN3	ND	NM_001330195	c.2797G>T	p.Asp933Tyr	-	0	0	NA	0	ND	ND	Deletéria	Provavelmente patogênica	*Disease causing*
STOX2	ND	NM_020225	c.322G>T	p.Val108Phe	rs781469883	0	0	0,0003	0	ND	ND	Deletéria	Provavelmente patogênica	*Disease causing*
VPS13B	Síndrome de Cohen, AR	NM_152564	c.3386A>G	p.Lys1129Arg	rs61759485	0,0013	0,0039	0,0003	2	Interpretações conflitantes de patogenicidade	ND	Deletéria	Provavelmente patogênica	*Disease causing*
Variantes candidatas encontradas em comparação com lista de genes obtidos da rede de proteínas														
EP300	Câncer colorretal; síndrome de Menke-Hennekam 2; síndrome de Rubinstein-Taybi 2, AD	NM_001429	c.689T>C	p.Met230Thr	-	0	0	NA	0	ND	ND	Deletéria	Provavelmente patogênica	*Disease causing*
Variantes candidatas encontradas em comparação com lista de genes já relacionados ao fenótipo de surdez														
CHD7	Síndrome de CHARGE, AD	NM_017780	c.1958C>T	p.Pro653Leu	rs200536932	0,000199	0	0.0003	0	ND	ND	Tolerável	Provavelmente patogênica	*Disease causing*
DSPP	Surdez AD com dentinogênese; Displasia dentinária tipo 2, AD; Dentinogênese imperfeita, Shields tipo 2 e 3, AD	NM_014208	c.731G>A	p.Gly244Glu	-	0	0	NA	0	ND	ND	ND	Provavelmente patogênica	*Disease causing*
COL9A2	Síndrome de Stickler, AR; Displasia epifisária múltipla 2, AD	NM_001852	c.1982C>T	p.Pro661Leu	rs150687987	0,000599	0,0034	0.0024	1	Interpretações conflitantes de patogenicidade	Significado incerto	Deletéria	Provavelmente patogênica	*Disease causing*
MYO15A	Surdez AR não sindrômica	NM_016239	c.320T>C	p.Met107Thr	rs1002458470	0	0	NA	1	ND	ND	Deletéria	Provavelmente patogênica	*Disease causing*

LGH7														
Gene	Fenótipo OMIM	RefSeq	Variante - DNA	Variante - Proteína	dbSNP	1000 Genomas	*Exome Sequencing Project*	ExAC	ABraOM	ClinVar - classificação	Deafness Variation Database - classificação	SIFT	*PolyPhen-2*	*Mutation Taster*
Variantes filtradas não herdadas encontradas através da análise de trio														
SIMC1	ND	NM_198567	c.80C>T	p.Pro27Leu	rs75304783	0	0	NA	0	ND	ND	Tolerável	Benigna	*Disease causing*
GUSB	Mucopolissacaridose VII, AR	NM_000181	c.1251C>G	p.Phe417Leu	-	0	0	NA	0	ND	ND	Tolerável	Benigna	Polimorfismo
PRAG1	ND	NM_001080826	c.3583G>A	p.Ala1195Thr	-	0	0	NA	0	ND	ND	ND	Benigna	Polimorfismo
EP400	ND	NM_015409	c.4856-3C>T	NA	-	0	0	NA	0	ND	ND	NA	NA	NA
USPL1	ND	NM_005800	c.1272A>T	p.Glu424Asp	rs770423148	0	0	NA	0	ND	ND	Deletéria	Benigna	*Disease causing*
NPIPB6	ND	NM_001282524	c.856G>A	p.Glu286Lys	rs747566858	0	0	0,00002	0	ND	ND	Deletéria	Provavelmente patogênica	Polimorfismo
THOC1	ND	NM_005131	c.1420G>A	p.Ala474Thr	-	0	0	NA	0	ND	ND	Tolerável	Possivelmente patogênica	*Disease causing*
GABRA3	ND	NM_000808	c.1019G>T	p.Trp340Leu	-	0	0	NA	0	ND	ND	Tolerável	Benigna	*Disease causing*
ZFY	ND	NM_003411	c.153T>C	p.Thr51=	-	0	0	NA	0	ND	ND	NA	NA	NA
Variantes em genes em comum com três ocorrências ou mais entre os 14 probandos														
AGAP4	ND	NM_001291379	c.1195C>T	p.Arg399Cys	rs200463969	0	0	0	7	ND	ND	Deletéria	Provavelmente patogênica	*Disease causing*
ARHGAP23	ND	NM_001199417	c.1918C>A	p.Arg640Ser	-	0	0	NA	0	ND	ND	ND	Possivelmente patogênica	Polimorfismo
ERBB3	Síndrome de contratura congênita letal, AR; suscetibilidade a euritroleucemia familial, AD	NM_001982	c.89C>T	p.Pro30Leu	rs56017157	0,0009	0,0015	0,0021	4	ND	ND	Tolerável	Possivelmente patogênica	*Disease causing*
IGSF3	Defeito de canal lacrimal, AR	NM_001542	c.1385G>T	p.Gly462Val	-	0	0	NA	0	ND	ND	Deletéria	Possivelmente patogênica	*Disease causing*
NRXN3	ND	NM_004796	c.924G>C	p.Arg308Ser	-	0,0007	0,0005	0,0007	0	ND	ND	Deletéria	Benigna	*Disease causing*
GGT1	Glutationinuria, AR	NM_001288833	c.1387G>A	p.Gly463Ser	-	0	0	NA	0	ND	ND	Tolerável	Possivelmente patogênica	Polimorfismo
Variantes candidatas encontradas em comparação com lista de genes obtidos da rede de proteínas														
IARS	Retardo de crescimento, desenvolvimento intelectual comprometido, hipotonia e hepatopatia, AR	NM_013417	c.3727G>A	p.Val1243Met	-	0	0,0008	0,0010	1	ND	ND	Tolerável	Benigna	*Disease causing*
Variantes candidatas encontradas em comparação com lista de genes já relacionados ao fenótipo de surdez														
ADGRV1	Síndrome de Usher tipo 2C, AR; Convulsões febris, AD	NM_032119	c.8401G>T	p.Gly2801*	rs760510612	0	0	NA	0	ND	Benigna	ND	ND	*Disease causing*
CDH23	Surdez AR não sindrômica; Síndrome de Usher tipo 1D, DR, AR; Adenoma pituitário, AD	NM_022124	c.6421A>G	p.Arg2141Gly	rs376414352	0	0,000079	0,0002	1	Significado incerto	Significado incerto	ND	Benigna	*Disease causing*
SLC22A4	Suscetibilidade a artrite reumatoide, Surdez AR não sindrômica	NM_003059	c.830T>C	p.Ile277Thr	-	0	0	NA	0	ND	ND	Deletéria	Possivelmente patogênica	*Disease causing*

LGH8														
Gene	Fenótipo OMIM	RefSeq	Variante - DNA	Variante - Proteína	dbSNP	1000 Genomas	*Exome Sequencing Project*	ExAC	ABraOM	ClinVar - classificação	Deafness Variation Database - classificação	SIFT	*PolyPhen-2*	*Mutation Taster*
Variantes em genes em comum com três ocorrências ou mais entre os 14 probandos														
AGAP4	ND	NM_001291379	c.1666G>A	p.Ala556Thr	-	0	0	NA	0	ND	ND	Deletéria	Provavelmente patogênica	*Disease causing*
AGAP4	ND	NM_001291379	c.1220G>A	p.Arg407His	rs201179318	0	0	0	0	ND	ND	Deletéria	Provavelmente patogênica	*Disease causing*
HTT	Doença de Huntington AD; síndrome de Lopes-Maciel-Rodan, AR	NM_002111	c.6563A>C	p.His2188Pro	-	0	0	NA	0	ND	ND	Deletéria	Benigna	*Disease causing*
HLA-DRB5	ND	NM_002125	c.635C>T	p.Pro212Leu	rs111541713	0	0	NA	0	ND	ND	Deletéria	Provavelmente patogênica	Polimorfismo
KIR2DL3	ND	NM_015868	c.485G>C	p.Arg162Thr	rs201504521	0	0	NA	0	ND	ND	Deletéria	Possivelmente patogênica	Polimorfismo
ACTL7A	ND	NM_006687	c.640G>A	p.Gly214Ser	rs41278347	0,0025	0,0047	0,0048	4	ND	ND	Deletéria	Provavelmente patogênica	*Disease causing*
PRTG	ND	NM_173814	c.3383G>A	p.Arg1128Gln	rs528633624	0,0001	0	0,00004	0	ND	ND	Deletéria	Possivelmente patogênica	*Disease causing*
Variantes candidatas encontradas em comparação com lista de genes já relacionados ao fenótipo de surdez														
MYO15A	Surdez AR não sindrômica	NM_016239	c.1634C>T	p.Ala545Val	rs199740747	0,000399	0,0006	0,0013	1	Significado incerto	Significado incerto	Deletéria	Possivelmente patogênica	Polimorfismo

LGH9														
Gene	Fenótipo OMIM	RefSeq	Variante - DNA	Variante - Proteína	dbSNP	1000 Genomas	*Exome Sequencing Project*	ExAC	ABraOM	ClinVar - classificação	Deafness Variation Database - classificação	SIFT	*PolyPhen-2*	*Mutation Taster*
Variantes em genes em comum com três ocorrências ou mais entre os 14 probandos														
ATP8B3	ND	NM_138813	c.1991C>T	p.Thr664Met	rs757373346	0	0	0,0001	2	ND	ND	Tolerável	Provavelmente patogênica	Polimorfismo
TMEM247	ND	NM_001145051	c.386G>A	p.Arg129Gln	rs79819367	0	0	NA	9	ND	ND	Deletéria	Provavelmente patogênica	NA
KMT2C	Síndrome de Kleefstra 2, AD	NM_170606	c.10763C>T	p.Ser3588Leu	rs148585727	0,0005	0,0027	0,0025	1	ND	ND	Deletéria	Provavelmente patogênica	*Disease causing*
LILRB2	ND	NM_001278404	c.469C>A	p.Gln157Lys	rs201709101	0	0	NA	0	ND	ND	Deletéria	Provavelmente patogênica	Polimorfismo
PRTG	ND	NM_173814	c.3272C>T	p.Ser1091Phe	rs79244725	0,00039	0,0011	0,0012	0	ND	ND	Deletéria	Benigna	*Disease causing*
Variantes candidatas encontradas em comparação com lista de genes já relacionados ao fenótipo de surdez														
LOXHD1	Surdez AR não sindrômica	NM_001145472	c.128G>A	p.Gly43Asp	rs727503142	0	0	NA	0	Significado incerto	Significado incerto	Tolerável	Benigna	*Disease causing*

LGH11														
Gene	Fenótipo OMIM	RefSeq	Variante - DNA	Variante - Proteína	dbSNP	1000 Genomas	*Exome Sequencing Project*	ExAC	ABraOM	ClinVar - classificação	Deafness Variation Database - classificação	SIFT	*PolyPhen-2*	*Mutation Taster*
Variantes filtradas não herdadas encontradas através da análise de trio														
CFAP74	ND	NM_001304360	c.41T>C	p.Leu14Ser	-	0	0	NA	0	ND	ND	Deletéria	Possivelmente patogênica	Polimorfismo
PTPRU	ND	NM_133177	c.2824C>T	p.Arg942Trp	rs564512646	0,0002	0	0,03352	0	ND	ND	Tolerável	Provavelmente patogênica	*Disease causing*
HERC1	Macrocefalia, fácies dismórfica e atraso psicomotor, AR	NM_003922	c.13651C>T	p.Pro4551Ser	-	0	0	NA	0	ND	ND	Deletéria	Provavelmente patogênica	*Disease causing*
DENND4A	ND	NM_001320835	c.4669G>A	p.Glu1557Lys	-	0	0	NA	0	ND	ND	Deletéria	Benigna	*Disease causing*
CEP89	ND	NM_032816	c.471C>T	p.Tyr157=	rs766868554	0	0	0,0012	2	ND	ND	NA	NA	NA
Variantes em genes em comum com três ocorrências ou mais entre os 14 probandos														
HLA-DRB5	ND	NM_002125	c.92A>G	p.Asp31Gly	rs139583918	0	0	0,0003	0	ND	ND	Deletéria	Provavelmente patogênica	Polimorfismo
SPAG4	ND	NM_003116	c.1142C>T	p.Ser381Leu	rs138726688	0,00019	0,0002	0,0002	2	ND	ND	Tolerável	Benigna	*Disease causing*
Variantes candidatas encontradas em comparação com lista de genes já relacionados ao fenótipo de surdez														
MYO7A	Surdez AD e AR não sindrômica; Síndrome de Usher 1B, AR	NM_001127180	c.2886G>C	p.Gln962His	rs200641606	0,000399	0,0006	0,0007	1	Significado incerto	ND	Tolerável	Possivelmente patogênica	*Disease causing*
COL9A2	Síndrome de Stickler, AR; Displasia epifisária múltipla 2, AD	NM_001852	c.562C>A	p.Leu188Met	rs139455364	0,001996	0,002	0,0005	1	ND	Benigna	Tolerável	Provavelmente patogênica	*Disease causing*

LGH14														
Gene	Fenótipo OMIM	RefSeq	Variante - DNA	Variante - Proteína	dbSNP	1000 Genomas	*Exome Sequencing Project*	ExAC	ABraOM	ClinVar - classificação	Deafness Variation Database - classificação	SIFT	*PolyPhen-2*	*Mutation Taster*
Variantes filtradas não herdadas encontradas através da análise de trio														
FSIP2	ND	NM_173651	c.5515A>G	p.Ile1839Val	rs201710369	0	0	0,0002	0	ND	ND	Tolerável	ND	Polimorfismo
DHRS7	ND	NM_016029	c.664G>T	p.Ala222Ser	-	0	0	NA	0	ND	ND	Tolerável	Benigna	Polimorfismo
TAOK2	ND	NM_004783	c.2552C>A	p.Thr851Lys	-	0	0	NA	0	ND	ND	Deletéria	Possivelmente patogênica	*Disease causing*
Variantes em genes em comum com três ocorrências ou mais entre os 14 probandos														
AGAP4	ND	NM_001291379	c.1195C>T	p.Arg399Cys	rs200463969	0	0	0	7	ND	ND	Deletéria	Provavelmente patogênica	*Disease causing*
ZFHX3	Câncer de próstata somático	NM_006885	c.6376G>A	p.Ala2126Thr	rs147679383	0,00019	0,0007	0,0005	0	ND	ND	Tolerável	Benigna	*Disease causing*
P4HA3	ND	NM_182904	c.934C>G	p.Pro312Ala	rs201421233	0	0	0,0002	0	ND	ND	Tolerável	Benigna	*Disease causing*
TTC28	ND	NM_001145418	c.4054C>T	p.Arg1352Cys	rs201500299	0	0,0011	0,0001 (ExAC NFE)	5	ND	ND	Deletéria	Possivelmente patogênica	*Disease causing*
KIR2DL3	ND	NM_015868	c.58T>G	p.Trp20Gly	rs376053624	0	0	NA	0	ND	ND	Deletéria	Benigna	Polimorfismo
FOXM1	ND	NM_202002	c.2132C>T	p.Pro711Leu	rs28919870	0,0004	0,0081	0,0063	9	ND	ND	Deletéria	Possivelmente patogênica	*Disease causing*
USP17L20	ND	NM_001256861	c.437C>A	p.Ser146*	rs774495734	0	0	NA	0	ND	ND	NA	NA	*Disease causing*
Variantes candidatas encontradas em comparação com lista de genes já relacionados ao fenótipo de surdez														
LRTOMT	Surdez AR não sindrômica	NM_001145308	c.780T>G	p.Cys260Trp	rs886048633	0	0	NA	0	Significado incerto	ND	Deletéria	Possivelmente patogênica	*Disease causing*
OTOGL	Surdez AR não sindrômica	NM_173591	c.1913G>A	p.Trp638*	rs377708973	0	0,000083	0,0001 (ExAC NFE)	0	Patogênica	Significado incerto	ND	ND	*Disease causing*
OTOGL	Surdez AR não sindrômica	NM_173591	c.5675T>C	p.Ile1892Thr	rs775475186	0	0	0,0001 (ExAC NFE)	0	Significado incerto	Provavelmente benigna	Deletéria	ND	Polimorfismo

LGH16														
Gene	Fenótipo OMIM	RefSeq	Variante - DNA	Variante - Proteína	dbSNP	1000 Genomas	*Exome Sequencing Project*	ExAC	ABraOM	ClinVar - classificação	Deafness Variation Database - classificação	SIFT	*PolyPhen-2*	*Mutation Taster*
Variantes em genes em comum com três ocorrências ou mais entre os 14 probandos														
AGAP4	ND	NM_001291379	c.833G>T	p.Ser278Ile	rs200665580	0	0	0,0071	0	ND	ND	Tolerável	Provavelmente patogênica	*Disease causing*
ZFHX3	Câncer de próstata somático	NM_006885	c.10817C>A	p.Ser3606Tyr	rs145062714	0,00019	0,0003	0,0006	1	ND	ND	Deletéria	Benigna	*Disease causing*
VPS13B	Síndrome de Cohen, AR	NM_152564	c.1768G>A	p.Ala590Thr	rs140601319	0,0017	0,0011	0,0010	2	Significado incerto	ND	Tolerável	Possivelmente patogênica	*Disease causing*
POTEM	ND	NM_001145442	c.379G>A	p.Ala127Thr	rs201157355	0	0	0	0	ND	ND	Deletéria	Provavelmente patogênica	Polimorfismo
TMEM247	ND	NM_001145051	c.386G>A	p.Arg129Gln	rs79819367	0	0	NA	9	ND	ND	Deletéria	Provavelmente patogênica	NA
KMT2C	Síndrome de Kleefstra 2, AD	NM_170606	c.7460G>A	p.Gly2487Asp	rs199850926	0,00019	0	0,000025	1	ND	ND	Deletéria	Benigna	Polimorfismo
LILRB2	ND	NM_001278404	c.603C>G	p.Ile201Met	rs41308754	0,0004	0	0,0065	12	ND	ND	Tolerável	Possivelmente patogênica	Polimorfismo
LILRB2	ND	NM_001278404	c.592G>A	p.Asp198Asn	rs41308752	0	0	0,0047	9	ND	ND	Tolerável	Possivelmente patogênica	Polimorfismo
NCOA6	ND	NM_001318240	c.5146A>G	p.Asn1716Asp	rs779731696	0	0	0,0003 (ExAC AMR) / 0,0001 (ExAC NFE)	0	ND	ND	Deletéria	Benigna	Polimorfismo
ACTL7A	ND	NM_006687	c.336T>G	p.Asn112Lys	rs148963985	0,0003	0,0003	0,0007 (ExAC AFR) / 0,0002 (ExAC AMR)	0	ND	ND	Deletéria	Benigna	*Disease causing*
GGT1	Glutationinuria, AR	NM_001288833	c.1504C>T	p.Pro1504Ser	rs377488360	0	0	NA	0	ND	ND	Tolerável	Possivelmente patogênica	*Disease causing*
PRTG	ND	NM_173814	c.3317G>A	p.Gly1106Asp	rs971877865	0	0	NA	0	ND	ND	Deletéria	Benigna	Polimorfismo
Variantes candidatas encontradas em comparação com lista de genes já relacionados ao fenótipo de surdez														
HARS ou *HARS1*	Doença de Charcot-Marie-Tooth, tipo 2W, AD; Síndrome de Usher tipo 3B, AR	NM_002109	c.1177G>A	p.Val393Met	rs192923161	0,0002	0	0,0002 (ExAC EAS)	0	ND	ND	Tolerável	Benigna	*Disease causing*

LGH17														
Gene	Fenótipo OMIM	RefSeq	Variante - DNA	Variante - Proteína	dbSNP	1000 Genomas	*Exome Sequencing Project*	ExAC	ABraOM	ClinVar - classificação	Deafness Variation Database - classificação	SIFT	*PolyPhen-2*	*Mutation Taster*
Variantes em genes em comum com três ocorrências ou mais entre os 14 probandos														
AGAP4	ND	NM_001291379	c.1195C>T	p.Arg399Cys	rs200463969	0	0	0	7	ND	ND	Deletéria	Provavelmente patogênica	*Disease causing*
ATP8B3	ND	NM_138813	c.218G>A	p.Arg73Gln	rs369921115	0	0,000081	0,0001 (ExAC AFR e ExAC NFE)	0	ND	ND	Deletéria	Benigna	Polimorfismo
ZFHX3	Câncer de próstata somático	NM_006885	c.1381G>C	p.Glu461Gln	rs145062714	0	0	NA	0	ND	ND	Tolerável	Benigna	*Disease causing*
ARHGAP23	ND	NM_001199417	c.2513C>T	p.Pro838Leu	-	0	0	NA	0	ND	ND	ND	Benigna	*Disease causing*
CLEC11A	ND	NM_002975	c.620dupG	p.Arg207fs	rs562569155	0,0013	0,003	0,0059	6	ND	ND	NA	NA	NA
HTT	Doença de Huntington AD; síndrome de Lopes-Maciel-Rodan, AR	NM_002111	c.6563A>C	p.His2188Pro	-	0	0	NA	0	ND	ND	Deletéria	Benigna	*Disease causing*
BMP2K	ND	NM_198892	c.2071G>A	p.Glu691Lys	rs182929460	0,001	0,003	0,0048	2	ND	ND	Deletéria	Benigna	Polimorfismo
KIR2DL3	ND	NM_015868	c.71G>A	p.Gly24Glu	-	0	0	NA	0	ND	ND	Deletéria	Provavelmente patogênica	Polimorfismo
TMEM206	ND	NM_001198862	c.814delC	p.Leu272fs	rs532279691	0,00059	0,0042	0,0007	6	ND	ND	NA	NA	NA
Variantes candidatas encontradas em comparação com lista de genes já relacionados ao fenótipo de surdez														
FGFR1	Lipomatose encéfalo crânio cutânea; Síndrome de Hartsfield, AD; Hipogonadismo hipogonadotrófico 2 com ou sem anosmia, AD; Síndrome de Jackson-Weiss, AD; Displasia osteoglofônica, AD; Síndrome de Pfeiffer, AD; Trigonocefalia 1, AD	NM_001174067	c.2557C>T	p.Arg853Cys	rs17182463	0	0,0003	0,0002	1	Significado incerto	Provavelmente patogênica	Deletéria	Possivelmente patogênica	*Disease causing*
TBC1D24	Surdez AD e AR não sindrômica; Síndrome de DOORS, AR; Epilepsia rolândica, distonia paroxística induzida pelo exercício e distonia do escrivão, AR; Encefalopatia epiléptica infantil, AR; Epilepsia mioclônica infantil, AR	NM_001199107	c.344G>A	p.Arg115His	rs201174513	0,000199	0,000078	0,0001	0	Significado incerto	Significado incerto	Tolerável	Benigna	*Disease causing*
LOXHD1	Surdez AR não sindrômica	NM_001145472	c.1742A>G	p.Lys581Arg	-	0	0	NA	0	ND	ND	Tolerável	Provavelmente patogênica	*Disease causing*

LGH19														
Gene	Fenótipo OMIM	RefSeq	Variante - DNA	Variante - Proteína	dbSNP	1000 Genomas	*Exome Sequencing Project*	ExAC	ABraOM	ClinVar - classificação	Deafness Variation Database - classificação	SIFT	*PolyPhen-2*	*Mutation Taster*
Variantes em genes em comum com três ocorrências ou mais entre os 14 probandos														
NCOR2	ND	NM_006312	c.4010C>T	p.Pro1337Leu	rs961135055	0	0	NA	0	ND	ND	Deletéria	Possivelmente patogênica	Polimorfismo
NRXN3	ND	NM_001272020	c.1117G>A	p.Asp373Asn	-	0	0	NA	0	ND	ND	Deletéria	Benigna	*Disease causing*
FOXM1	ND	NM_202002	c.2132C>T	p.Pro711Leu	rs28919870	0,0004	0,0081	0,0063	9	ND	ND	Deletéria	Possivelmente patogênica	*Disease causing*
POTEM	ND	NM_001145442	c.379G>A	p.Ala127Thr	rs201157355	0	0	0	0	ND	ND	Deletéria	Provavelmente patogênica	Polimorfismo
TMEM247	ND	NM_001145051	c.386G>A	p.Arg129Gln	rs79819367	0	0	NA	9	ND	ND	Deletéria	Provavelmente patogênica	NA
Variantes candidatas encontradas em comparação com lista de genes já relacionados ao fenótipo de surdez														
ATP2B2	Surdez AR não sindrômica	NM_001001331	c.1555G>A	p.Val519Ile	rs144118750	0,000399	0,0028	0,0018	1	ND	Provavelmente benigna	Tolerável	Benigna	*Disease causing*
COL4A5	Síndrome de Alport 1, LXD	NM_000495	c.2981G>A	p.Gly994Glu	-	0	0	NA	0	ND	ND	Deletéria	Provavelmente patogênica	*Disease causing*
SLC26A5	Surdez AR não sindrômica	NM_198999	c.2168A>G	p.Glu723Gly	rs144115730	0	0,0003	0,000090	0	ND	ND	Tolerável	Benigna	*Disease causing*
TECTA	Surdez AD e AR não sindrômica	NM_005422	c.5836T>C	p.Tyr1946His	rs144343770	0,000599	0,0005	0,0004	0	Interpretações conflitantes de patogenicidade	Benigna	Deletéria	Provavelmente patogênica	*Disease causing*
TNC	Surdez AD não sindrômica	NM_002160	c.6211G>A	p.Glu2071Lys	rs140573419	0	0,0002	0,0003	0	ND	ND	Deletéria	Provavelmente patogênica	*Disease causing*

LGH20														
Gene	Fenótipo OMIM	RefSeq	Variante - DNA	Variante - Proteína	dbSNP	1000 Genomas	*Exome Sequencing Project*	ExAC	ABraOM	ClinVar - classificação	Deafness Variation Database - classificação	SIFT	*PolyPhen-2*	*Mutation Taster*
Variantes em genes em comum com três ocorrências ou mais entre os 14 probandos														
AGAP4	ND	NM_001291379	c.1195C>T	p.Arg399Cys	rs200463969	0	0	0	7	ND	ND	Deletéria	Provavelmente patogênica	*Disease causing*
ATP8B3	ND	NM_138813	c.3056G>A	p.Gly1019Asp	rs202137046	0,0011	0,0036	0,0051	4	ND	ND	Deletéria	Possivelmente patogênica	*Disease causing*
NCOR2	ND	NM_006312	c.5839C>T	p.Arg1947Trp	rs369817436	0	0,0004	0,0006	0	ND	ND	Deletéria	Provavelmente patogênica	Polimorfismo
BMP2K	ND	NM_198892	c.2071G>A	p.Glu691Lys	rs182929460	0,001	0,003	0,0048	2	ND	ND	Deletéria	Benigna	Polimorfismo
KMT2C	Síndrome de Kleefstra 2, AD	NM_170606	c.5587C>G	p.Pro1863Ala	rs142070663	0,0005	0,002	0,00019	4	ND	ND	Deletéria	Benigna	Polimorfismo
LILRB2	ND	NM_001278404	c.603C>G	p.Ile201Met	rs41308754	0,0004	0	0,0065	12	ND	ND	Tolerável	Possivelmente patogênica	Polimorfismo
LILRB2	ND	NM_001278404	c.592G>A	p.Asp198Asn	rs41308752	0	0	0,0047	9	ND	ND	Tolerável	Possivelmente patogênica	Polimorfismo
NCOA6	ND	NM_001318240	c.556C>T	p.Pro186Ser	rs146148388	0,00099	0,0017	0,0015	2	ND	ND	Tolerável	Benigna	*Disease causing*
USP17L20	ND	NM_001256861	c.1073G>C	p.Ser358Thr	-	0	0	NA	0	ND	ND	Deletéria	Benigna	Polimorfismo
Variantes candidatas encontradas em comparação com lista de genes já relacionados ao fenótipo de surdez														
MYH9	Surdez AD não sindrômica; Macrotrombocitopenia e inclusões granulocíticas com/sem nefrite ou perda auditiva neurossensorial, AD	NM_002473	c.906C>G	p.Phe302Leu	rs375657864	0	0,000077	0,00823	0	ND	Significado incerto	Deletéria	Provavelmente patogênica	*Disease causing*
SLC26A4	Surdez AR não sindrômica, com aqueduto vestibular alargado, AR; Síndrome de Pendred, AR	NM_000441	c.1246A>C	p.Thr416Pro	rs28939086	0	0,0002	0,0002	0	Patogênica	Patogênica	Deletéria	Provavelmente patogênica	*Disease causing*

LGH24														
Gene	Fenótipo OMIM	RefSeq	Variante - DNA	Variante - Proteína	dbSNP	1000 Genomas	*Exome Sequencing Project*	ExAC	ABraOM	ClinVar - classificação	Deafness Variation Database - classificação	SIFT	*PolyPhen-2*	*Mutation Taster*
Variantes em genes em comum com três ocorrências ou mais entre os 14 probandos														
STOX2	ND	NM_020225	c.322G>T	p.Val108Phe	rs781469883	0	0	0,0003	0	ND	ND	Deletéria	Provavelmente patogênica	*Disease causing*
SPAG4	ND	NM_003116	c.22G>T	p.Gly8Cys	rs1038244251	0	0	NA	0	ND	ND	Deletéria	Benigna	*Disease causing*
BMP2K	ND	NM_198892	c.3169A>T	p.Asn1057Tyr	rs116710382	0,0037	0,0054	0,0052	4	ND	ND	Deletéria	Benigna	Polimorfismo
FOXM1	ND	NM_202002	c.1235G>A	p.Arg412His	rs147362692	0	0,0002	0,0002	9	ND	ND	Deletéria	Possivelmente patogênica	*Disease causing*
NCOA6	ND	NM_001318240	c.3512C>T	p.Ser1171Leu	rs61730987	0,001	0,0021	0,0006	3	ND	ND	Deletéria	Benigna	*Disease causing*
USP17L20	ND	NM_001256861	c.1408A>T	p.Lys470*	-	0	0	NA	0	ND	ND	NA	NA	NA
Variantes candidatas encontradas em comparação com lista de genes obtidos da rede de proteínas														
MDM4	ND	NM_002393	c.1162C>G	p.Pro388Ala	rs61754765	0,000599	0,0005	0,0006	6	ND	ND	Tolerável	Provavelmente patogênica	*Disease causing*
Variantes candidatas encontradas em comparação com lista de genes já relacionados ao fenótipo de surdez														
COL11A2	Surdez AD e AR não sindrômica; Fibrocondrogenese 2, AD e AR; Displasia espondilo epifisária, AD e AR	NM_080679	c.1861A>T	p.Ile621Phe	rs188490457	0,000599	0	0,0002	5	Interpretações conflitantes de patogenicidade	Significado incerto	Deletéria	Provavelmente patogênica	*Disease causing*
COL4A3	Síndrome de Alport 2, AR; Síndrome de Alport 3, AD; Hematúria familial benigna, AD	NM_000091	c.4778G>T	p.Gly1593Val	rs373407763	0	0,000084	0,0002 (ExAC AFR); 0,0011 (ExAC OTH)	0	ND	Significado incerto	Deletéria	Provavelmente patogênica	*Disease causing*
DIAPH3	Neuropatia auditiva, AD	NM_001042517	c.1480+1G>T	NA	-	0	0	NA	0	ND	ND	ND	ND	*Disease causing*
PDZD7	Surdez AR não sindrômica; Síndrome de Usher tipo 2C, AR; Doença de retina na síndrome de Usher 2A, AR	NM_024895	c.971G>A	p.Ser324Asn	rs200592310	0,000199	0,0013	0,0035	3	Significado incerto	Significado incerto	Deletéria	Possivelmente patogênica	*Disease causing*

LGH25															
Gene	Fenótipo OMIM	RefSeq	Variante - DNA	Variante - Proteína	dbSNP	1000 Genomas	*Exome Sequencing Project*	ExAC	ABraOM	ClinVar - classificação	Deafness Variation Database - classificação	SIFT	*PolyPhen-2*	*Mutation Taster*
Variantes em genes em comum com três ocorrências ou mais entre os 14 probandos														
P4HA3	ND	NM_182904	c.1133C>T	p.Ser378Leu	rs145677965	0,0011	0,0015	0,0004	2	ND	ND	Deletéria	Possivelmente patogênica	*Disease causing*
GSE1	ND	NM_014615	c.3064G>C	p.Glu1022Cys	rs201908318	0	0	0,0083	0	ND	ND	Tolerável	Provavelmente patogênica	*Disease causing*
STOX2	ND	NM_020225	c.322G>T	p.Val108Phe	rs781469883	0	0	0,0003	0	ND	ND	Deletéria	Provavelmente patogênica	*Disease causing*
VPS13B	Síndrome de Cohen, AR	NM_152564	c.11071G>A	p.Ala369Thr	rs142476821	0,0015	0,0038	0,0041	4	Interpretações conflitantes de patogenicidade	ND	Deletéria	Provavelmente patogênica	*Disease causing*
TMEM206	ND	NM_001198862	c.814delC	p.Leu272fs	rs532279691	0,00059	0,0042	0,0007	6	ND	ND	NA	NA	NA
POTEM	ND	NM_001145442	c.379G>A	p.Ala127Thr	rs201157355	0	0	0	0	ND	ND	Deletéria	Provavelmente patogênica	Polimorfismo
GGT1	Glutationinuria, AR	NM_001288833	c.319C>T	p.Arg107Cys	rs142987478	0	0	0,0001 (ExAC EAS) / 0,0002 (ExAC SAS)	0	ND	ND	Deletéria	Provavelmente patogênica	*Disease causing*
GGT1	Glutationinuria, AR	NM_001288833	c.1387G>A	p.Gly463Ser	-	0	0	NA	0	ND	ND	Tolerável	Possivelmente patogênica	*Disease causing*
Variantes candidatas encontradas em comparação com lista de genes já relacionados ao fenótipo de surdez														
LRTOMT	Surdez AR não sindrômica	NM_001145307	c.37G>A	p.Glu13Lys	rs146942815	0,001597	0,0044	0,0048	6	ND	Benigna	Tolerável	Benigna	*Disease causing*
SLC26A4	Surdez AR não sindrômica, com aqueduto vestibular alargado, AR; Síndrome de Pendred	NM_000441	c.85G>C	p.Glu29Gln	rs111033205	0	0	0,0001 (ExAC NFE)	0	Patogênica / Provavelmente patogênica	Patogênica	Tolerável	Benigna	*Disease causing*