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.

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

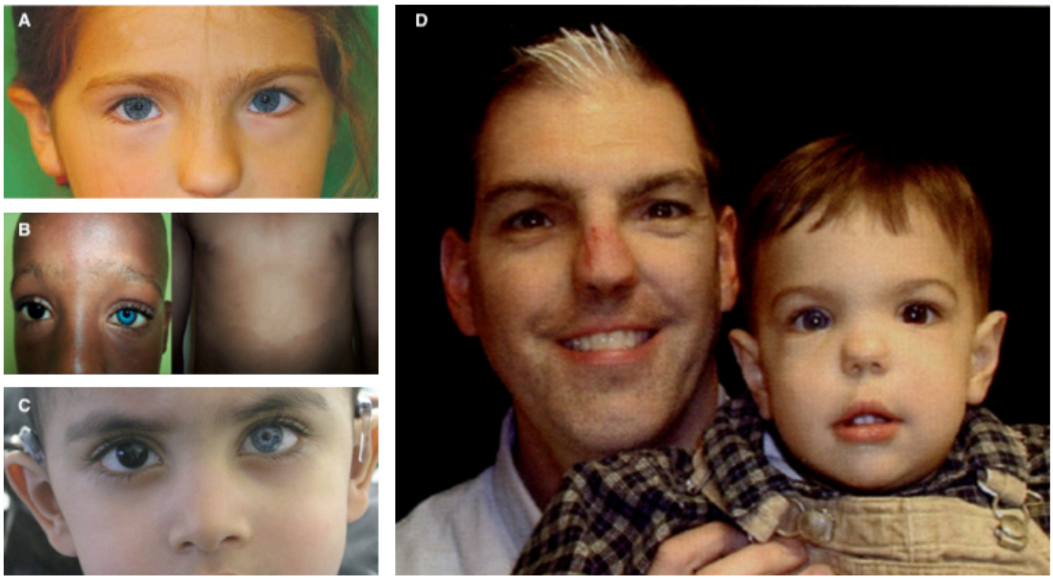
lists of the 14 patients with a second list, composed by all genes already associated with syndromic and non-syndromic hearing loss phenotype, showed variants in the *EYA1, CHD7, MYO7A, TBC1D24, COL4A5, TECTA, TNC, MYH9, COL11A2* and *DIAPH3* genes. Of these, the most potentially related to WS phenotypes 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)	

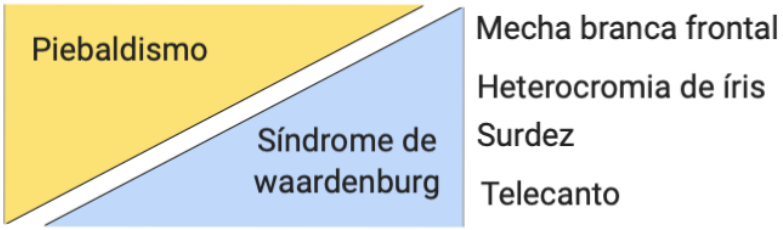
AD – autossômico dominante / AR – autossômico recessivo; SW – Síndrome de Waardenburg.

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.



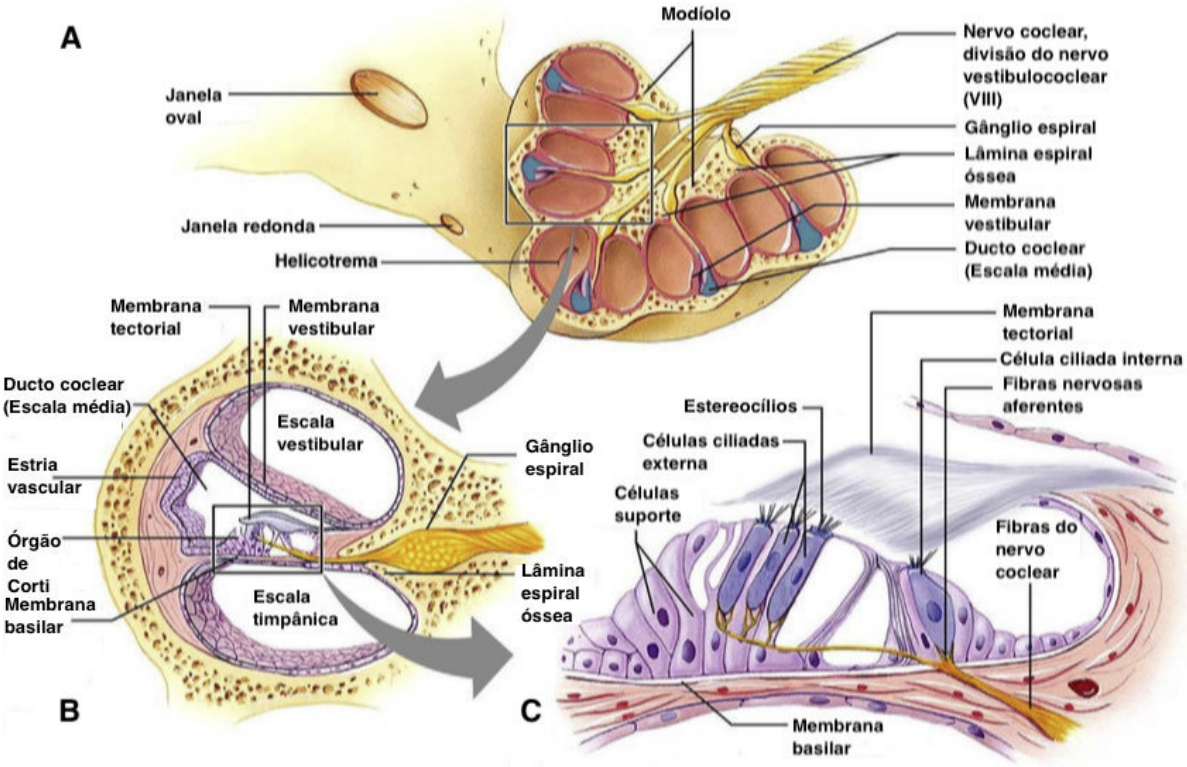
Adaptado de Dourmishev et al. (1999).

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.

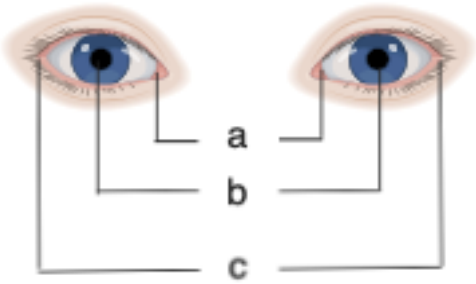


Imagem criada com BioRender.com

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.

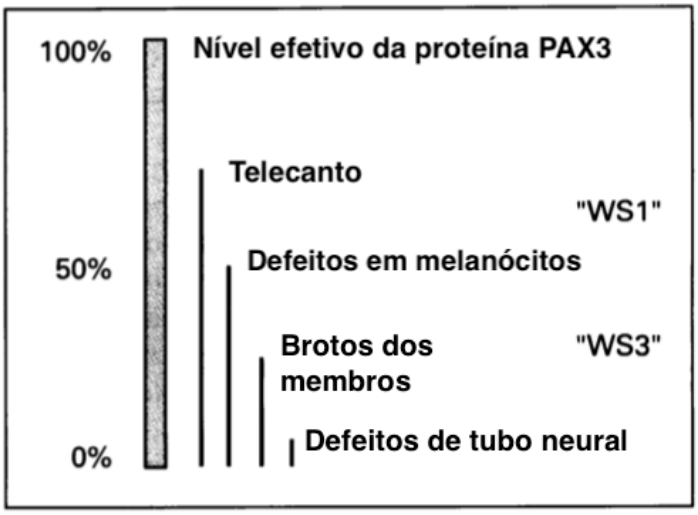
1.1.3 Síndrome de Waardenburg Tipo 3 (SW3)

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).

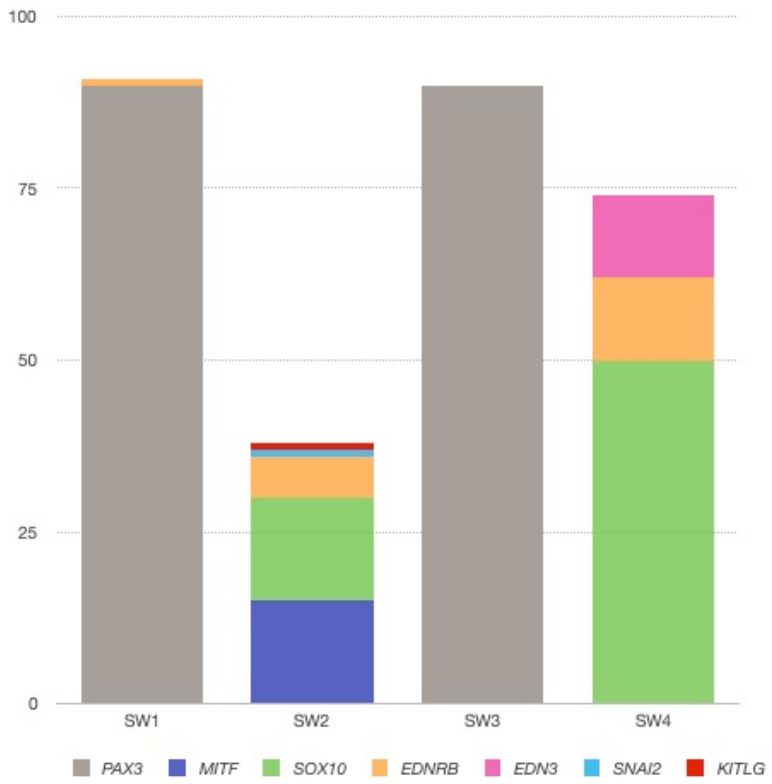
1.2 Diagnóstico molecular da SW

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*,

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.