

JULIANA SAMPAIO SILVA

**Estudos genético-moleculares em surdez
não sindrômica e sindrômica**

Dissertação apresentada à Faculdade de
Medicina da Universidade de São Paulo para
obtenção do título de Mestre em Ciências

Programa de Otorrinolaringologia
Orientadora: Profa. Dra. Jeanne Oiticica
Ramalho Ferraz
Coorientadora: Dra. Karina Lezirovitz
Mandelbaum

Versão Corrigida

(Resolução CoPGr 6018/11 de 01 de novembro de 2011. A versão original está disponível na
Biblioteca da FMUSP)

SÃO PAULO

2017

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Silva, Juliana Sampaio

Estudos genético-moleculares em surdez não síndrômica e síndrômica / Juliana Sampaio Silva. -- São Paulo, 2017.

Dissertação(mestrado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.
Programa de Otorrinolaringologia.

Orientadora: Jeanne Oiticica Ramalho Ferraz.

Coorientadora: Karina Lezirovitz Mandelbaum.

Descritores: 1.Surdez não-sindrômica 2.Ligação genética 3.Sequenciamento de nucleotídeos em larga escala 4.Varredura genômica 5.Bases de dados genéticas 6.Surdez genética 7.Padrões de herança genética

USP/FM/DBD-167/17

Nome: SILVA, Juliana Sampaio

Título: Estudos genético-moleculares em surdez não sindrômica e sindrômica

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo para obtenção do título
de Mestre em Ciências.

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

DEDICATÓRIA

Dedico

A minha família, em especial Zorilda, Marinês, José e Marivalda, e aos pacientes participantes do estudo. Com amor e carinho por toda atenção, auxílio e compreensão de todos.

AGRADECIMENTOS

À Profa. Dra. Jeanne Oiticica Ramalho Ferraz, Médica Assistente do Departamento de Otorrinolaringologia e minha orientadora, pelos ensinamentos, apoio, pelas discussões científicas, ideias, correções, orientação, oportunidade de tê-la como orientadora, que me proporcionou crescimento intelectual e científico.

À Dra. Karina Lezirovitz Mandelbaum, Pesquisadora Científica do Laboratório de Investigação Médica (LIM-32) e minha coorientadora, pelo apoio, ensinamentos, pelas discussões científicas, ideias, correções, orientação, oportunidade de tê-la como orientadora, pelo carinho de sempre, risadas, brincadeiras e principalmente por me proporcionar crescimento pessoal, intelectual e científico.

À Faculdade de Medicina da USP e Prof. Dr. Ricardo Ferreira Bento, Professor Titular da Disciplina de Otorrinolaringologia da FMUSP, por cederem o espaço físico para realização dos experimentos, bem como a oportunidade de obter grande conhecimento.

Ao Dr. Ronaldo Carvalho, chefe do Serviço de Otorrinolaringologia do Hospital Universitário da Universidade Federal de Sergipe, pela avaliação clínica dos membros da família 1 e auxílio na obtenção de dados da família.

Ao Dr. Carlos Kazuo Taguchi, fonoaudiólogo e Professor Adjunto da Universidade Federal de Sergipe, pela avaliação audiológica dos membros da família 1 e auxílio na obtenção de dados da família.

À Cláudia Regina de Marchi Lopes Hemza, Biologista do Laboratório de Investigação Médica (LIM-32) pelo auxílio e apoio na realização dos experimentos e pela amizade.

Aos pesquisadores do Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo (IB-USP) Profa. Dra. Regina Célia Mingroni Netto, Dr. Leandro Ucela Alves, MSc Renan Barbosa Lemes, Dra. Simone Gomes Ferreira pelo auxílio nos experimentos, análise estatística, discussões científicas, apoio técnico, ideias e amizade.

À Dra. Ester Sabino, Professora Associada do Departamento de Moléstias Infecciosas da Faculdade de Medicina da USP e Diretora do Instituto de Medicina Tropical da USP, pelo auxílio e suporte com o sequenciamento do exoma.

Ao Grupo DASA, principalmente a Patricia Yoshi Nishimura e Layla Testa Galindo, pelo auxílio com o sequenciamento do exoma dos pacientes e suporte técnico.

Ao Dr. Osório Abath Neto pela filtragem das variantes dos dados dos exomas, discussões científicas e propostas de ideias.

À Dra. Signe Schuster Grasel pelo auxílio com a análise dos exames audiológicos.

Às doutoras Maíra de Oliveira Sarpi e Eloisa Maria Mello Santiago Gebrim do Departamento de Radiologia de Cabeça e Pescoço do InRad-Instituto de Radiologia – Hospital das Clínicas, Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo pelo auxílio com as análises das tomografias computadorizadas do osso temporal.

À aluna de Iniciação Científica Gleiciele Alice Vieira Silva do Laboratório de Investigação Médica (LIM-32), vulgo Severina, pelo auxílio, apoio, risadas e amizade durante a pós-graduação.

À Estefany Uchoa da Silva de Oliveira pelo auxílio com as extrações de DNA e experimentos.

Aos alunos e amigos Larissa, Rafaela e Vinicius do Laboratório de Investigação Médica (LIM-32) pela amizade durante a pós-graduação.

Às secretárias Maria Marilede Alves, Maria Márcia Alves e Lucivânia Lima da Silva pela amizade e por toda atenção e ajuda durante a pós-graduação.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo apoio financeiro para a realização desta pesquisa e interesse na pesquisa por meio da concessão financeira que tornou possível sua realização.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de mestrado, que tornou possível a realização da pesquisa.

À minha família, em especial tios: José, Marinês e Marivalda e minha mãe, pelo carinho, apoio financeiro e por tudo que sempre fizeram.

“Se a vida lhe der uma dupla hélice, faça uma PCR e amplifique seus horizontes”.

Autoria própria

Universidade de São Paulo. Sistema Integrado de Bibliotecas. Diretrizes para apresentação de dissertações e teses da USP, Parte I (ABNT). Elaborado por Vânia Martins Bueno de Oliveira Funaro, Maria Cláudia Pestana, Maria Cristina Cavarette Dziabas, Eliana Maria Garcia, Maria Fátima dos Santos, Maria Marta Nascimento, Suely Campos Cardoso. 3a ed. Revisada, ampliada e modificada. São Paulo: SIBiUSP; 2016.

RESUMO

SAMPAIO-SILVA, J. *Estudos genético-moleculares em surdez não-sindrômica e síndrômica*. [Dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina; Universidade de São Paulo; 2017.

A surdez de etiologia genética pode contribuir com até 60% dos casos. Representa uma das doenças mais geneticamente heterogêneas e são observados todos os padrões de herança mendelianos e também herança mitocondrial. Os estudos de famílias com vários indivíduos afetados por perda auditiva permitiram o mapeamento de mais de 110 loci candidatos a conter genes responsáveis por surdez. Porém, muitos desses genes têm apenas poucas famílias associadas já descritas até o momento e parcela significativa deles ainda não foi identificada. A identificação e caracterização desses genes são uma ferramenta importante que traz diversos benefícios, como um aconselhamento genético mais preciso para as famílias, entendimento das correlações genótipo-fenótipo e das vias biológicas fundamentais à audição. O objetivo geral dessa dissertação foi identificar novos genes e novas mutações relacionadas à surdez não-sindrômica em famílias brasileiras. Estudamos três casos familiares de perda auditiva não-sindrômica pós-lingual. No primeiro caso familiar, cujo padrão de herança era autossômico dominante, foi realizado a varredura genômica por meio de *SNP-array* e a análise estatística desses dados foi realizada com o programa Alohomora. Os dados das análises paramétricas (*Lod Score*) e não-paramétricas (*Z-mean*) foram comparadas para obtenção das regiões cromossômicas candidatas. Nas regiões cromossômicas candidatas a análise de segregação dos haplótipos de microssatélites se mostrou compatível com ligação. Em seguida, foi realizado o sequenciamento do exoma da probanda, análise das variantes encontradas contidas dentro das regiões cromossômicas identificadas pela análise de ligação e análise da segregação. Com isso, foi possível identificar uma variante candidata que segrega com a surdez em gene previamente não associado à surdez, mas que interage com gene já associado. No caso familiar 2, foi possível definir a causa genética e seu padrão de herança autossômico recessivo ao identificar duas mutações patogênicas em heterozigose composta no gene *TMPRSS3*, já previamente descritas. Dessa forma, esses dados corroboram os da literatura que apontam a importância deste gene nos casos menos comuns de perda auditiva pós-lingual e herança autossômica recessiva. Já no caso 3, de herança autossômica dominante, foi realizado o sequenciamento do exoma da probanda e duas novas variantes em heterozigose foram encontradas. Ambas foram preditas como patogênicas pelas ferramentas de bioinformática: p.R42C (*GJB3*) e p.S906* (*MYO6*) Somente a probanda e sua mãe normouvinte apresentaram a variante no gene *GJB3*, que está localizada na mesma posição de aminoácido de uma mutação que causa a doença de pele *Erythrokeratoderma variabilis*. Nenhuma das duas apresentou essa doença de pele. Assim, a mutação no gene *GJB3* foi considerada uma variante de significado incerto. A segregação da mutação do tipo *nonsense* no gene *MYO6* com surdez na família foi confirmada. Essa mutação está no domínio *neck* da miosina VI, após o domínio motor. Estes dados fornecem suporte adicional às correlações genótipo-fenótipo que afirmam que quando o domínio motor da proteína está funcionando a perda auditiva é mais leve e com manifestação tardia. Concluindo a causa genética foi identificada em dois casos, fornecendo evidências adicionais às correlações genótipo-fenótipo previamente estabelecidas na literatura. Além disso, um novo potencial gene candidato a surdez foi revelado.

Descritores: Surdez Não-Sindrômica, Mapeamento Gênico, Sequenciamento de Nova Geração, Varredura Genômica, Perda Auditiva Hereditária, Herança Autossômica Dominante, Herança Autossômica Recessiva.

ABSTRACT

SAMPAIO-SILVA, J. *Molecular-Genetic Studies in Non-syndromic and Syndromic Deafness* [Dissertation]. São Paulo: “Faculdade de Medicina; Universidade de São Paulo; 2017”

Genetic etiology may represent up to 60% of deafness cases, it is one of the most genetically heterogeneous diseases and may exhibit all Mendelian inheritance patterns and mitochondrial inheritance as well. Studies of families with many individuals affected by hearing loss allowed the mapping of more than 110 locus, candidates for containing deafness genes. However, many of these genes have only a few families associated described so far and a significant portion of them has yet to be identified. Gene identification and characterization is an important tool that provides several benefits, such as a more accurate genetic counseling for families, better understanding of genotype-phenotype correlations as well as discovery of biological pathways crucial for hearing. The general objective of this dissertation was to identify novel genes and mutations related to non-syndromic deafness in Brazilian families. We investigated the cause of post-lingual nonsyndromic hearing loss in three familial cases. In the first family case, with autosomal dominant inheritance, a genomic scanning through SNP-array was performed and a statistical analysis of the data was done with the Alohomora program. The data of the parametric (Lod Score) and non-parametric (Z-mean) analyzes were compared to obtain the candidate chromosomal regions. In the candidate chromosomal regions, segregation analysis of the microsatellite haplotypes was shown to be compatible with linkage to the deafness in the family. Then, exome sequencing of the proband was completed, analysis of the variants, contained within the candidate chromosomal regions identified by linkage, was performed as well as the segregation analysis. A candidate variant that segregates with the deafness in this family was identified in a gene that was not previously associated with deafness, but that interacts with a known deafness gene. In familial case 2, definition of the genetic cause was accomplished and its autosomal recessive inheritance pattern confirmed through the detection of two pathogenic mutations in the *TMPRSS3* gene in compound heterozygosis, both previously described. Thus, we corroborate data from the literature that point out the importance of this gene in the less common cases of both post-lingual hearing loss and autosomal recessive inheritance. In case 3, with autosomal dominant inheritance, exome sequencing of the proband revealed two novel heterozygous variants that were predicted to be pathogenic by bioinformatics tools: p.R42C (*GJB3*) and p.S906 * (*MYO6*). The proband and her normal hearing mother presented the variant in the *GJB3* gene, that is located in the same amino acid position of variant that causes the skin disease *Eritrokeratoderma variabilis*. Neither subjects had this skin disease. Thus, the *GJB3* variant was considered to be of uncertain significance. Segregation with deafness of the novel nonsense *MYO6* mutation was confirmed in the family. This mutation is in the neck domain of myosin VI, after the motor domain. These findings give further support for the genotype-phenotype correlations that state that when the protein motor domain of Myosin-IV is functioning, hearing loss is milder and with later onset. In conclusion, genetic causes were shown in two causes, providing additional evidence to the genotype-phenotype correlations previously established in the literature. In addition, a novel potential deaf candidate gene has been revealed.

Descriptors: Non-syndromic Deafness, Gene Mapping, Next Generation Sequencing, Genomic Scanning, Hereditary Hearing Loss, Autosomal Dominant Inheritance, Autosomal Recessive Inheritance.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1:** Fluxograma de trabalho..... 23
- Figura 2:** (A) Audiometrias dos indivíduos do caso familiar 1. (B) Audiometria IV:6 PA mista de grau moderado na orelha esquerda e PA mista de grau leve na orelha direita..... 24
- Figura 3:** Heredograma do caso familiar 1 com os haplótipos obtidos a partir de marcadores do tipo microssatélites na região cromossômica 2q21.2-q22.3. O indivíduo destacado em cinza apresenta perda auditiva mista, de grau leve na orelha direita e PANS, de grau moderado na orelha esquerda..... 26
- Figura 4:** Eletroferogramas mostrando sequências selvagens e com a mutação c.1082A>G (p.N361S) no gene *MCM6*..... 26
- Figura 5:** Gráfico com os resultados de *Lod score* (picos vermelhos) e *Zmean* (picos azuis) do caso familiar 1 obtidos a partir do programa Alohomora com as regiões cromossômicas apontadas como candidatas, na varredura genômica com *SNPs*..... 27
- Figura 6:** Audiometria dos indivíduos do caso familiar 2..... 29
- Figura 7:** Heredograma do caso 2. Os sinais positivos e negativos indicam a presença e ausência das mutações, respectivamente. Destacado na cor preta a mutação p.A306T no exon 9 e na cor vermelha a mutação p.A426T no exon 12 do gene *TMPRSS3*. Destacada na cor cinza (II:5) apresenta PANS bilateral de grau leve em altas frequências..... 30
- Figura 8:** Eletroferogramas mostrando sequências selvagens e com as mutações c.916G>A (p.A306T) no exon 9 c.1276G>A (p.A426T) no exon 12 do gene *TMPRSS3*..... 30
- Figura 9:** Audiometrias dos indivíduos do caso familiar 3: (A) Idades dos indivíduos no momento do exame entre 19 anos e 37 anos; (B) Idades dos indivíduos no momento do exame entre 55 e 87 anos, os normouvientes são representados em linhas pontilhadas. (C) Indivíduo II:12 apresenta PA unilateral mista uma devido a perfuração timpânica..... 32
- Figura 10:** (A) Heredograma do caso familiar 3. Os sinais de positivo e negativo indicam a presença e ausência da alteração c.2717C>A (p.S906*) encontrada no gene *MYO6*, respectivamente. A mutação c.124C>T (p.R42C) abaixo dos símbolos da probanda e de sua mãe indicam que ambas são heterozigotas para ela. (B) Eletroferograma dos exons 2 e 26 dos genes *GJB3* e *MYO6*, respectivamente, com a mutação e sem a mutação..... 34

LISTA DE TABELAS

Tabela I. Localização dos genes responsáveis por surdez hereditária não-sindrômica autossômica dominante (modificado VAM CAMP; SMITH, 03/2017).....	6
Tabela II. Localização dos genes responsáveis por surdez hereditária não-sindrômica autossômica recessiva (modificado VAM CAMP; SMITH, 03/2017).....	7
Tabela III. Localização dos genes de surdez hereditária não-sindrômica ligada ao cromossomo X (modificado de VAM CAMP; SMITH, 03/2017).....	8
Tabela IV. Mutações mitocondriais associadas à surdez não-sindrômica, com os sinais clínicos ocasionalmente associados (modificado de VAM CAMP; SMITH, 03/2017).....	9
Tabela V com o nome e sequência 5' – 3' de cada primer utilizados nas análises.....	21
Tabela VI com as ciclagens utilizadas para cada gene.....	22
Tabela VII: Análise das variantes identificadas no sequenciamento do exoma da probanda dentro das regiões cromossômicas candidatas, com score de patogenicidade e MAF.....	27
Tabela VIII: Com genes identificados no sequenciamento do exoma da probanda, com score de patogenicidade e MAF.....	29
Tabela IX: Com genes identificados no sequenciamento do exoma da probanda, com score de patogenicidade e MAF.....	33
Tabela X: Resumo do quadro clínico e dos resultados alcançados com os casos familiares de PA estudados.....	35

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

PANS	Perda Auditiva Sensorioneural
PA	Perda Auditiva
CAPPesq	Comissão de Ética em Pesquisa do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
CEP	Comitê de Ética em Pesquisa
HCFMUSP	Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
USP	Universidade de São Paulo
IB-USP	Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo
SNP	<i>Single Nucleotide Polymorphisms</i> (Polimorfismo de Nucleotídeo Único)
WES	<i>Whole Exome Sequencing</i> (Sequenciamento Completo do Exoma)
NGS	<i>Next Generation Sequencing</i> (Sequenciamento de Nova Geração)
MAF	<i>Minor Allele Frequency</i> (Menor Frequência Alélica)
DNA	<i>Deoxyribonucleic Acid</i> (Ácido Desoxirribonucleico)
LDL	lipoproteínas de baixa densidade
ExAC	<i>Exome Aggregation Consortium</i>
1000G	<i>1000 Genomes Project</i>
ABraOM	Arquivo Brasileiro Online de Mutações
ENaC	<i>Epithelial Amiloride-Sensitive Sodium Channel</i> (Canal de Sódio Sensível a Amilorida)
mRNA	<i>Messenger Ribonucleic Acid</i> (Ácido Ribonucléico Mensageiro)
DNA	<i>Deoxyribonucleic Acid</i> (Ácido Desoxirribonucléico)
cM	Centimorgan
ACMG	<i>American College of Medical Genetics and Genomics</i>
AMP	<i>Association for Molecular Pathology</i>
AD	Autossômico dominante
AR	Autossômico recessivo
OMIM	<i>Online Mendelian Inheritance in Man</i>
MIM	<i>Mendelian Inheritance in Man</i>
Mb	Megabases
Pb	Pares de Base
EDTA	<i>Ethylenediamine tetraacetic acid</i>

LISTA DE SÍMBOLOS

μ	Microlitros
Δ	Delta

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
2. OBJETIVOS	3
2.1 OBJETIVO GERAL	3
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	3
3. REVISÃO DA LITERATURA	4
3.1 SURDEZ HEREDITÁRIA	4
3.1.1 Surdez de herança autossômica dominante.....	5
3.1.2 Surdez de herança autossômica recessiva.....	5
3.1.3 Surdez de herança não-sindrômica ligada ao X	8
3.1.4 Surdez não-sindrômica de herança mitocondrial	8
3.1.4 Surdez síndrômica.....	9
3.1.6 Triagem de mutações na população	10
3.1.7 Genes relacionados à surdez não-sindrômica e suas funções	13
3.2 ANÁLISE DE LIGAÇÃO E MAPEAMENTO	14
3.3 SEQUENCIAMENTO DE NOVA GERAÇÃO	14
4. MATERIAIS E MÉTODOS	16
4.1 COMISSÃO DE ÉTICA.....	16
4.2 CRITÉRIO DE SELEÇÃO.....	16
4.3 VARIÁVEIS CATEGÓRICAS NOMINAIS	16
4.4 EXTRAÇÃO DE DNA.....	17
4.5 QUANTIFICAÇÃO DO DNA	17
4.6 PESQUISA DE MUTAÇÕES MAIS FREQUENTES	17
4.7 MAPEAMENTO GÊNICO POR MEIO DE ANÁLISE DE LIGAÇÃO	18
4.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA DO ESTUDO DE LIGAÇÃO	18
4.9 SEQUENCIAMENTO DE NOVA GERAÇÃO DO EXOMA.....	19
4.10 BANCO DE DADOS E FERRAMENTAS DE BIOINFORMÁTICA.....	20
4.11 SEQUENCIAMENTO CONVENCIONAL SANGER.....	20
5. RESULTADOS	24
5.1 CASO FAMILIAL 1: FAMÍLIA DE GOIÂNIA-GO	24
5.2 CASO FAMILIAL 2: FAMÍLIA DE CURITIBA - PR	28
5.3 CASO FAMILIAL 3: FAMÍLIA DE BELO HORIZONTE – MG.....	31
6. DISCUSSÃO	35
6.1 CASO FAMILIAL 1.....	36
6.2 CASO FAMILIAL 2.....	38
6.3 CASO FAMILIAL 3.....	40
7. CONCLUSÃO	42
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	43
9. ANEXOS	52

1. INTRODUÇÃO

A perda auditiva (PA) é uma deficiência que afeta mais de 360 milhões de pessoas em todo o mundo e sua incidência afeta 1 a cada 500 recém-nascidos (SHEARER; SMITH, 2015). A incidência de afetados por esse tipo de deficiência aumenta para 2,7 por mil antes dos cinco anos de idade e para 3,5 por mil entre os adolescentes (FORTNUM *et al.*, 2001).

A PANS é o defeito sensorial mais comum que atinge a espécie humana e em muitos casos é decorrente de mutações em um único gene, com funções específicas na orelha interna (HILGERT; SMITH; VAN CAMP, 2009; VAN CAMP; SMITH, 03/2017). Estima-se que a PANS de etiologia genética represente aproximadamente 60% dos casos de perda auditiva em países desenvolvidos e estimada em 16% no Brasil durante a década de noventa (MORTON, 1991; BRAGA; OTTO; SPINELLI, 1999).

A orelha interna tem a função de converter ondas sonoras em sinais elétricos, capacidade essa que depende da ação combinada de milhares de proteínas (DIAZ-HORTA *et al.*, 2014). Dessa forma, espera-se que alterações na função de qualquer uma dessas proteínas possa levar a PANS. Essas proteínas podem participar, por exemplo, do processo de homeostase iônica, junções do tipo “gap”, regulação da expressão gênica, desenvolvimento, manutenção e motilidade dos estereocílios, manutenção de diferença de potencial elétrico, inibição de apoptose, sinalização de células ciliadas e/ou neurônios, entre outras funcionalidades, porém muitas dessas proteínas permanecem até o momento sem identificação (DIAZ-HORTA *et al.*, 2014).

A PANS genética é uma das doenças mais heterogênea que se tem conhecimento, apresentando todos os mecanismos de herança mendelianos e mitocondrial. Estima-se que 1% dos genes humanos são necessários à audição (FRIEDMAN; GRIFFITH, 2003). Dessa forma, fica evidente que não necessariamente todas as populações terão a mesma mutação quando apresentarem PANS genética (VONA *et al.*, 2015). Além disso, a surdez de etiologia genética é classificada como síndrômica (surdez associada a outros sinais clínicos) e não-síndrômica. Embora já tenham sido descritas mais de 400 síndromes que incluem surdez como um de seus sinais clínicos, 70% dos casos de surdez hereditária são não-síndrômicos (KEATS; BERLIN, 1999).

Até o momento mais de 110 loci foram mapeados por meio de análise de ligação em diversas famílias com muitos afetados por PANS, mas nem todos os seus genes foram identificados. Por exemplo, a PANS de herança autossômica dominante tem apenas 70% dos

lócus com genes já identificados (tabela I). Já de herança autossômica recessiva tem apenas 77% dos lócus com genes identificados (tabela II). Isso significa que é bem provável que exista pelo menos 49 novos genes de surdez aguardando para serem identificados (VONA *et al.*, 2015), ou seja, há muitos lócus mapeados sem genes identificados. A dificuldade na identificação dos genes se deve a diversos fatores, como a heterogeneidade genética e as mutações distintas em um mesmo gene, o que dificulta estabelecer a correlação das características clínicas com a(s) mutação(ões) que podem diferir entre si (SHEARER; SMITH, 2015; LEZIROVITZ *et al.*, 2008).

Na identificação de novos lócus e/ou genes, vem sendo empregada a análise de ligação em grandes famílias com muitos afetados. A análise de ligação consiste na utilização de marcadores moleculares polimórficos como *SNPs* (*Single Nucleotide Polymorphisms* ou polimorfismos de nucleotídeo único) e/ou microssatélites que permitem ao pesquisador comparar a segregação dos marcadores com a transmissão da doença entre os inúmeros indivíduos de uma mesma família, afetados e não afetados, e assim delimitar as regiões cromossômicas candidatas a conter o gene responsável pela deficiência auditiva (LEZIROVITZ *et al.*, 2009). Os *SNPs* compreendem a maior parte das variantes do DNA e constituem posições genômicas nas quais existem ao menos dois resíduos de nucleotídeos distintos (alelos), sendo que cada um é observado em uma porção significativa da população humana. Na análise de ligação se utiliza *SNPs* dispostos em *arrays*, que são matrizes de genotipagem contendo milhares de polimorfismos de nucleotídeo único, utilizados para detecção de doenças raras (LAFRAMBOISE, 2009).

O sequenciamento de nova geração (*NGS*) tem sido utilizado por muitos pesquisadores para identificação e caracterização de novos genes (QING *et al.*, 2014). A análise de ligação do genoma inteiro dentro de grandes famílias bem caracterizadas clinicamente proporciona uma estratégia poderosa para o mapeamento de intervalos críticos do cromossomo (VONA *et al.*, 2015). O sequenciamento de nova geração ou sequenciamento massivo em paralelo permite sequenciar milhares de fragmentos de DNA ao mesmo tempo gerando um conjunto de dados que pode chegar a 1.000.000.000 de pares de bases do DNA (NHS, 11/2015). Enquanto que o sequenciamento de Sanger sequencia um amplicon (fragmento de DNA) por vez, com até cerca de 1000 pares de base (VONA *et al.*, 2015). A utilização do *NGS* na área da pesquisa genética de genes que causam PANS ganhou maiores proporções nos últimos anos, viabilizando a identificação de novos lócus e genes em pequenas famílias. No entanto, essa técnica gera milhares de dados que precisam ser filtrados e analisados com o auxílio de profissionais qualificados de bioinformática. Apesar de

trabalhoso, o *NGS* revolucionou a área da genética molecular, mesmo que cada empresa desenvolva seu próprio protocolo e químicas utilizadas o objetivo final é o mesmo (LIU *et al.*, 2012). Entretanto, se associado ao mapeamento das regiões cromossômicas candidatas, por meio da análise de ligação, reduz-se sensivelmente o número de variantes geradas a serem analisadas pelo *NGS*. Dessa forma, a associação das duas técnicas tem se mostrado de grande eficiência na identificação dos genes responsáveis por PANS.

A identificação e caracterização de genes responsáveis por PANS constitui ferramenta importante que traz diversos benefícios. Permite um diagnóstico mais apurado do defeito genético que predispôs a PANS naquele indivíduo, um aconselhamento genético mais preciso para as famílias, além de maior conhecimento sobre os mecanismos moleculares, entendimento de novas vias biológicas, alvos terapêuticos em potencial e a possibilidade de desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas futuras (OITICICA *et al.*, 2010). Estudos de mapeamento, descoberta de novos genes e estudos funcionais só são possíveis em laboratórios que contam com coleções de amostras de sangue de famílias compostas por muitos indivíduos afetados e bem estudados clinicamente, que concordem em participar desse tipo de investigação.

Foram selecionadas três famílias com PANS que concordaram em participar do estudo. A nossa hipótese foi que ao mapear e identificar os genes responsáveis pela PANS, em famílias com história e genealogia compatíveis com a causa genética, por meio da associação da análise de ligação e com o sequenciamento de nova geração do exoma, foi possível caracterizar novas mutações ou variantes em genes ainda não relacionados à PANS na literatura científica, e contribuir ao conhecimento da fisiologia da audição.

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

O objetivo geral deste estudo foi mapear novos genes e identificar novas mutações relacionadas à surdez não-sindrômica em famílias brasileiras e correlacioná-las com o fenótipo.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Avaliar diferentes abordagens no mapeamento de novos genes e identificação de novas mutações em cada caso familiar de PA selecionado.

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1 SURDEZ HEREDITÁRIA

A perda auditiva ou surdez é caracterizada como um déficit ou comprometimento auditivo que restringe ou não as habilidades de comunicação verbal. Os termos perda auditiva, surdez ou deficiência auditiva são utilizados como sinônimos para os geneticistas. Um a cada quinhentos recém-nascidos tem perda auditiva sensorineural (PANS) bilateral permanente (≥ 40 dB) ao nascimento (HILGERT; SMITH; VAN CAMP, 2009). Já em países desenvolvidos a incidência é de uma a cada mil crianças nascidas com PA ou que irá desenvolver PA com grau severo ou profundo durante o período pré-lingual (PETIT *et al.*, 2001). Essa frequência pode ser até três vezes maior em países em desenvolvimento como o Brasil, a diferença de frequência é devida à contribuição de fatores ambientais que levam a perda auditiva, como rubéola materna, citomegalovírus, exposição a drogas ototóxicas ou ruídos e meningite os quais refletem o grau de desenvolvimento socioeconômico da população brasileira. Embora em nosso país, esses fatores ambientais tenham ainda importância como causa de perda auditiva, com a melhora das condições de saúde no Brasil, a frequência de surdez genética deve estar se aproximando dos números de países desenvolvidos. Em países desenvolvidos a frequência de surdez de etiologia genética chega a 60% (MORTON, 1991).

A PA pode ser classificada quanto a sua etiologia (genética ou decorrente de fatores ambientais), manifestação clínica (sindrômica ou não-sindrômica), idade de manifestação (pré-lingual ou pós-lingual), lateralidade (uni ou bilateral), origem do defeito (sensorineural, condutiva ou mista), evolução (progressiva ou estacionária), frequências atingidas (baixas, médias ou altas) e a gravidade da perda. A gravidade da perda é classificada conforme o valor da perda em decibéis: leve (21 a 40dB), moderada (41dB a 70dB), severa (71dB a 90dB) ou profunda (mais de 91dB) (DAVIS; SILVERMAN, 1970).

A perda auditiva de etiologia genética não-sindrômica está associada a diversos loci, os quais são chamados de DFN (do inglês *DeaFNess*) e numerados de acordo com a ordem de descoberta. Tais loci referem-se a uma região cromossômica candidata a conter um ou mais genes associados à PA e não necessariamente a um único gene. Os loci que provavelmente contêm genes de surdez autossômica dominante são designados como DFNA, os loci de surdez autossômica recessiva DFNB, e os loci que estão no cromossomo X são designados por DFNX, anteriormente DFN. Já foram mapeados dois loci modificadores, os quais são denominados com a sigla DFNM (VAN CAMP; SMITH, 03/2017). Além disso, já

foram descritas mutações em genes mitocondriais associadas à surdez.

3.1.1 Surdez de herança autossômica dominante

Em sua grande maioria, os genes relacionados à surdez de herança autossômica dominante (DFNA) apresentam como características clínicas PA pós-lingual (geralmente na segunda a terceira década de vida), progressiva e sensorineural (PETIT *et al.*, 2001; VAN LAER *et al.*, 1999). Dessa forma, o padrão de herança autossômico dominante contribui de forma significativa na proporção de casos de PA após a aquisição da linguagem (pós-lingual) (PETIT, 1996).

A PA autossômica dominante possui uma frequência que varia de 15% a 20% no número de casos de perda auditiva não-sindrômica (PETIT, 1996; CORDES; FRIEDMAN, 2000). Já foram mapeados cinquenta e um loci, dos quais foram identificados trinta e seis genes, listados na tabela I (VAN CAMP; SMITH, 03/2017). Não foi observado até o momento nenhum locus desses 51 que fosse mais prevalente.

3.1.2 Surdez de herança autossômica recessiva

A surdez de herança autossômica recessiva é responsável por cerca 80% dos casos de PA não-sindrômica (VAN CAMP; SMITH, 03/2017; VAN LAER *et al.*, 1999; ZANCHETTA *et al.*, 2000).

Geralmente PA de herança autossômica recessiva tende a ter maior gravidade do que a surdez autossômica dominante, pois costuma ter como característica clínicas perda de severa a profunda, pré-lingual, antes dos 12 meses de idade, sensorineural, estacionária, totalmente penetrante e atingindo todas as frequências (GUILFORD *et al.*, 1994; KEATS; BERLIN, 1999; CAMPBELL *et al.*, 1997).

Já foram mapeados 83 loci, dos quais já foram identificados 64 genes, listados na tabela II (VAN CAMP; SMITH, 03/2017).

Tabela I. Localização dos genes responsáveis por surdez hereditária não-sindrômica autossômica dominante (modificado VAM CAMP; SMITH, 03/2017).

Lócus	Localização cromossômica	Gene	Lócus	Localização cromossômica	Gene
?	16p12.2	<i>CRYM</i>	DFNA32	11p15	?
DFNA1	5q31	<i>DIAPH1</i>	DFNA33	13q34-qter	?
DFNA2A	1p34	<i>KCNQ4</i>	DFNA36	9q13-q21	<i>TMC1</i>
DFNA2B	1p35.1	<i>GJB3</i>	DFNA39	4q21.3	<i>DSPP</i>
DFNA3A	13q11-q12	<i>GJB2</i>	DFNA41	12q24-qter	<i>P2RX2</i>
DFNA3B	13q12	<i>GJB6</i>	DFNA42	5q31.1-q32	?
DFNA4	19q13	<i>MYH14</i>	DFNA43	2p12	?
DFNA4B	19q13.32	<i>CEACAM16</i>	DFNA44	3q28-29	<i>CCDC50</i>
DFNA5	7p15	<i>DFNA5</i>	DFNA47	9p21-22	?
DFNA6/14/38	4p16.3	<i>WFS1</i>	DFNA49	1q21-q23	?
DFNA7	1q21-q23	?	DFNA50	7q32.2	<i>MIRN96</i>
DFNA8/12	11q22-24	<i>TECTA</i>	DFNA51	9q21	<i>TJP2</i>
DFNA9	14q12-q13	<i>COCH</i>	DFNA52	4q28	?
DFNA10	6q22-q23	<i>EYA4</i>	DFNA53	14q11.2-q12	?
DFNA11	11q12.3-q21	<i>MYO7A</i>	DFNA54	5q31	?
DFNA13	6p21	<i>COL11A2</i>	DFNA56	9q31.3-q34.3	<i>TNC</i>
DFNA15	5q31	<i>POU4F3</i>	DFNA57	19p13.2	?
DFNA16	2q24	?	DFNA58	2p12-p21	?
DFNA17	22q	<i>MYH9</i>	DFNA59	11p14.2-q12.3	?
DFNA18	3q22	?	DFNA64	12q24.31-12q24.32	<i>SMAC/DIABLO</i>
DFNA20/26	17q25	<i>ACTG1</i>	DFNA65	16p13.3	<i>TBC1D24</i>
DFNA21	6p21	?	DFNA67	20q13.33	<i>OSBPL2</i>
DFNA22	6q13	<i>MYO6</i>	?	15q25.2	<i>HOMER2</i>
DFNA23	14q21-q22	<i>SIX1</i>	?	3q21.3	<i>MCM2</i>
DFNA24	4q	?	?	12q21.32	<i>KITLG</i>
DFNA25	12q21-24	<i>SLC17A8</i>	?	15q21.2	<i>DMXL2</i>
DFNA27	4q12	?			
DFNA28	8q22	<i>GRHL2</i>			
DFNA30	15q25-26	?			
DFNA31	6p21.3	?			

Tabela II. Localização dos genes responsáveis por surdez hereditária não-sindrômica autossômica recessiva (modificado VAM CAMP; SMITH, 03/2017).

Lócus	Localização cromossômica	Gene	Lócus	Localização cromossômica	Gene
DFNB1	13q12	<i>GJB2</i>	DFNB51	11p13-p12	?
DFNB2	11q13.5	<i>MYO7A</i>	DFNB53	6p21.3	<i>COL11A2</i>
DFNB3	17p11.2	<i>MYO15A</i>	DFNB55	4q12-q13.2	?
DFNB4	7q31	<i>SLC26A4</i>	DFNB59	2q31.1-q31.3	<i>PJVK</i>
DFNB5	14q12	?	DFNB60	5q23.2-q31.1	<i>SLC22A4</i>
DFNB6	3p14-p21	<i>TMIE</i>	DFNB61	7q22.1	<i>SLC26A5</i>
DFNB7/11	9q13-q21	<i>TMC1</i>	DFNB62	12p13.2-p11.23	?
DFNB8/10	21q22	<i>TMPRSS3</i>	DFNB63	11q13.2-q13.4	<i>LRTOMT/COM</i>
DFNB9	2p22-p23	<i>OTOF</i>	DFNB65	20q13.2-q13.32	?
DFNB12	10q21-q22	<i>CDH23</i>	DFNB66	6p21.2-22.3	<i>DCDC2</i>
DFNB13	7q34-36	?	DFNB66/67	6p21.31	<i>LHFPL5</i>
DFNB14	7q31	?	DFNB68	19p13.2	?
DFNB15/72/9	3q21-q25	<i>GIPC3</i>	DFNB71	8p22-21.3	?
5	19p13		DFNB70	2p16.1	<i>PNPT1</i>
DFNB16	15q21-q22	<i>STRC</i>	DFNB73	1p32.3	<i>BSND</i>
DFNB17	7q31	?	DFNB74	12q14.2-q15	<i>MSRB3</i>
DFNB18	11p14-15.1	<i>USH1C</i>	DFNB76	19q13.12	<i>SYNE4</i>
DFNB18B	11p15.1	<i>OTOG</i>	DFNB77	18q12-q21	<i>LOXHD1</i>
DFNB20	11q25-qter	?	DFNB79	9q34.3	<i>TPRN</i>
DFNB21	11q	<i>TECTA</i>	DFNB80	2p16.1-p21	?
DFNB22	16p12.2	<i>OTOA</i>	DFNB81	19p	?
DFNB23	10p11.2-q21	<i>PCDH15</i>	DFNB83	9p21-22	?
DFNB24	11q23	<i>RDX</i>	DFNB84	12q21.2	<i>PTPRQ</i>
DFNB25	4p13	<i>GRXCR1</i>			<i>OTOGL</i>
DFNB26	4q31	?	DFNB85	17p12-q11.2	?
DFNB27	2q23-q31	?	DFNB86	16p13.3	<i>TBC1D24</i>
DFNB28	22q13	<i>TRIOBP</i>	DFNB88	2p12-p11.2	<i>ELMOD3</i>
DFNB29	21q22	<i>CLDN14</i>	DFNB89	16q21-q23.2	<i>KARS</i>
DFNB30	10p11.1	<i>MYO3A</i>	DFNB90	7p22.1-p15.3	?
DFNB31	9q32-q34	<i>WHRN</i>	DFNB91	6p25	<i>SERPINB6</i>
DFNB32/82	1p13.3-22.1	<i>GPSM2</i>	DFNB93	11q12.3-11q13.2	<i>CABP2</i>
DFNB33	9q34.3	?	DFNB94	11q14.1	<i>NARS2</i>
DFNB35	14q24.1-24.3	<i>ESRRB</i>	DFNB96	1p36.31-p36.13	?
DFNB36	1p36.3	<i>ESPN</i>	DFNB97	7q31.2	<i>MET</i>
DFNB37	6q13	<i>MYO6</i>	DFNB98	21q22.3-qter	<i>TSPEAR</i>
DFNB38	6q26-q27	?	DFNB99	17q12	<i>TMEM132E</i>
DFNB39	7q21.1	<i>HGF</i>	DFNB101	5q32	<i>GRXCR2</i>
DFNB40	22q	?	DFNB102	12p12.3	<i>EPS8</i>
DFNB42	3q13.31-q22.3	<i>ILDRI</i>	DFNB103	6p21.1	<i>CLIC5</i>
DFNB44	7p14.1-q11.22	<i>ADCY1</i>	DFNB105	1p21.2-1p21.1	<i>CDC14A</i>
DFNB45	1q43-q44	?	?	6p22.3	<i>FAM65B</i>
DFNB46	18p11.32-p11.31	?	?	11p15.5	<i>EPS8L2</i>
DFNB47/83	2p25.1-p24.3	?	?	17q25.1	<i>WBP2</i>
DFNB48	15q23-q25.1	<i>CIB2</i>	?	1p31.3	<i>ROR1</i>
DFNB49	5q12.3-q14.1.	<i>MARVELD2</i> <i>BDP1</i>			

3.1.3 Surdez de herança não-sindrômica ligada ao X

A PA ligada ao cromossomo X tem seus lócus denominados como DFNX, anteriormente denominavam-se DFN (VAN LAER *et al.*, 2003; VAN CAMP; SMITH, 03/2017). É responsável por 2% a 3% dos casos de surdez hereditária (VAN LAER *et al.*, 2003).

Já foram mapeados seis lócus e identificados cinco genes associados a esse padrão de herança, listados na tabela III (VAN CAMP; SMITH, 03/2017).

O lócus do cromossomo X mais frequente associado à surdez é o DFNX2, onde se localiza o gene *POU3F4*, que codifica um fator de transcrição. A surdez associada ao DFNX2 ou DFN3 apresenta como características clínicas PA mista resultante da fixação do estribo (DE KOK *et al.*, 1995). No entanto, a surdez sensorineural profunda às vezes mascara o elemento condutor da surdez associada ao DFNX2. Outro achado clínico que pode ocorrer é o vazamento da perilinfa, por meio da estapedectomia (processo cirúrgico utilizado como tratamento para surdez devida a otosclerose), que tem como objetivo retirar o estribo quando este se encontra fixado. As mutações no gene *POU3F4* apresentam-se dispersas por todo ele, não havendo uma mutação mais comum, além de já terem sido descritas deleções fora do gene, mas que alteram sua expressão (SCHRIJVER, 2004).

Tabela III. Localização dos genes de surdez hereditária não-sindrômica ligada ao cromossomo X (modificado de VAN CAMP; SMITH, 03/2017).

Lócus	Localização cromossômica	Gene	Herança
DFNX1 (DFN2)	Xq22	PRPS1	recessiva
DFNX2 (DFN3)	Xq21.1	POU3F4	?
DFNX3 (DFN4)	Xp21.2	?	dominante
DFNX4 (DFN6)	Xp22	SMPX	dominante
DFNX5 (AUNX)	Xq26.1	<i>AIFM1</i>	recessiva
DFNX6	Xq22.3	<i>COL4A6</i>	?

3.1.4 Surdez não-sindrômica de herança mitocondrial

Acredita-se que as mutações no DNA mitocondrial sejam responsáveis por cerca de 1% dos casos de surdez não-sindrômica hereditária (ESTIVILL *et al.*, 1998). A lista com as mutações já descritas encontra-se na tabela IV.

A PA de herança mitocondrial geralmente apresenta idade de manifestação e gravidade muito variável (ESTIVILL *et al.*, 1998). Uma das primeiras mutações identificadas no DNA mitocondrial como responsável por surdez foi a substituição A1555G no gene *12S rRNA*, sendo uma das mais frequentes em várias populações (PREZANT *et al.*, 1993; ABREU-SILVA *et al.*, 2006; SILVA, 2008; PUPO *et al.*, 2008). Indivíduos portadores dessa mutação apresentam uma susceptibilidade maior à ototoxicidade pelos antibióticos aminoglicosídeos (ESTIVILL *et al.*, 1998).

Tabela IV. Mutações mitocondriais associadas à surdez não-sindrômica, com os sinais clínicos ocasionalmente associados (modificado de VAM CAMP; SMITH, 03/2017).

Gene	Mutação	Sinais clínicos ocasionais associados
MTRNR1	1555A-> G	Susceptibilidade aumentada à ototoxicidade dos aminoglicosídeos
MTRNR1	1494C-> T	Susceptibilidade aumentada à ototoxicidade dos aminoglicosídeos
MTRNR1	961 (mutações diferentes)	Susceptibilidade aumentada à ototoxicidade dos aminoglicosídeos
MTTS1	7445A-> G	QueratodermaPalmoplantar
MTTS1	7472insC	Disfunções neurológicas incluindo ataxia, disartria e mioclônus
MTTS1	7510T-> C	Nada relatado
MTTS1	7511T-> C	Nada relatado

3.1.5 Surdez sindrômica

A palavra síndrome é de origem grega e significa conjunto de sintomas e sinais que se apresentam numa doença e que a caracterizam (DICIONÁRIO MICHAELIS, 2009), ou seja, é utilizada para designar pacientes que apresentam vários sinais clínicos com provável origem comum. Denomina-se de surdez sindrômica o paciente que apresenta o distúrbio de audição associado há outras características clínicas. Atualmente já foram identificadas mais de 400 síndromes que apresentam surdez como um dos sinais (GORLIN *et al.*; 1995).

As síndromes mais frequentes que apresentam surdez são: síndrome de Waardenburg

grupo de anormalidades de pigmentação de cabelo, pele e olhos, perda auditiva congênita sensorineural e dismorfismos faciais como o telecanto em pacientes portadores tipo I - MIM #193500; síndrome de Alport caracterizada por insuficiência renal progressiva, perda auditiva sensorineural variável, anormalidades oculares variáveis - MIM #301050; síndrome de Pendred tem como características alterações no desenvolvimento da cóclea, perda auditiva sensorineural, aumento difuso da tireóide ou bócio - MIM #274600; síndrome Usher, síndrome tem como características PA congênita ou pós-lingual progressiva, sensorineural, retinose pigmentar, constante disfunção vestibular - MIM #276900 (OMIM, 2015).

3.1.6 Triagem de mutações na população

Embora a surdez genética não-sindrômica apresente mais de uma centena de genes responsáveis já identificados, há alguns genes e mutações que se apresentam com maiores frequências em diferentes populações, como a mutação c.35delG no gene *GJB2*, deleções del(*GJB6*-D13S1830) e del(*GJB6*-D13S1854) no gene *GJB6* e a mutação mitocondrial A1555G no gene *12S rRNA*. As alterações citadas acima têm contribuído com aumento da surdez de etiologia genética em países em desenvolvimento, como o Brasil, porém em nosso país ainda ocorrem influências de fatores ambientais (BATISSOCO *et al.*, 2009). Atualmente muitos centros de pesquisa e aconselhamento genético empregam a triagem dessas mutações na rotina dos laboratórios. A seguir descrevemos como foram identificadas essas mutações.

Genes *GJB2* e *GJB6*

Guilford *et al.* (1994) descreveram o mapeamento do primeiro locus associado à surdez autossômica recessiva, o qual foi denominado DFNB1, localizado na região cromossômica 13q12. Maw *et al.* (1995), verificaram a contribuição significativa do locus à perda auditiva sensorineural autossômica recessiva por meio de um estudo de ligação com microssatélites realizado com uma população caucasiana. Também observaram expressividade fenotípica variável dos pacientes cuja surdez estava associada ao DFNB1, tanto entre indivíduos da mesma família quanto de famílias diferentes. Em 79% das famílias do Mediterrâneo com surdez sensorineural autossômica recessiva estudadas por Gasparini *et al.* (1997) o locus DFNB1 desempenhou um papel importante.

No locus DFNB1 encontra-se o gene *GJB2* (*Gap Junction β 2*), identificado pela primeira vez associado a surdez por Kelsell *et al.* em 1997, por meio de estudo realizado em uma família com surdez sensorineural congênita profunda, onde também segregava uma doença denominada queratoderma palmo-plantar (PPK), ambos com herança autossômica

dominante. O gene *GJB2* possui dois exons, porém o exon 1 não é codificante, possuindo uma região promotora altamente conservada entre as espécies (KIANG *et al.*, 1997). Ele codifica a proteína conexina 26 (Cx26), pertencente à família das proteínas de junções comunicantes. Essas proteínas têm a função de transportar íons, metabólitos e mensageiros, além de alguns estudos em animais sugerirem que esta proteína (Cx26) participa na reciclagem de íons potássio de volta para a endolinfa no ducto coclear (GÜRTLER *et al.*, 2003). Em um estudo realizado por Denoyelle *et al.* (1999), com 140 crianças de 104 famílias afetadas por surdez sensorineural com vários graus de PA, mutações no gene da conexina 26 localizado no locus DFNB1 foram responsáveis pela surdez em metade das crianças pesquisadas com perda auditiva pré-lingual.

A mutação c.35delG é a mais frequente nos casos de surdez de etiologia genética, sendo responsável por até 75% de todas as mutações patogênicas na Cx26 (SUNDSTROM *et al.*, 1999; COHN *et al.*, 1999), principalmente em populações caucasianas, em especial nos Estados Unidos e Europa (COHN; KELLEY, 1999). O quadro clínico associado a essa mutação costuma ser PANS severa a profunda, mas já se observa considerável variabilidade clínica, mesmo entre indivíduos da mesma família homocigotos quanto a essa mutação (LEZIROVITZ *et al.*, 2006). Outras mutações recessivas detectadas neste gene foram a c.167del.T comum em judeus askhenazi, a c.235delC comum em asiáticos, a T427C (ou R143W) comum em africanos. No gene *GJB2* já foram encontradas mutações dominantes associadas à surdez, que caracterizam o locus DFNA3, por exemplo, as mutações c.C223T (ou p.R75W, cuja surdez está associada a doença de pele queratoderma palmoplantar), c.G132C (ou p.W44C), c.G131C (p.W44S), a c.G428A (p.R143Q) e c.G605T (p.C202F) (BROBBY *et al.*, 1998; LERER *et al.*, 2000; ABE *et al.*, 2000; LIU *et al.*, 2002).

Outro gene encontrado no locus DFNB1 também associado à surdez e vizinho ao *GJB2*, é o gene *GJB6*. Ele codifica a conexina 30. Os genes *GJB2* e *GJB6* estão distantes um do outro aproximadamente 35kb e apresentam 77% de similaridade entre as proteínas codificadas. As mutações mais comuns descritas no gene *GJB6* foram as deleções del(*GJB6*-D13S1830), del(*GJB6*-D13S1854), sendo a mais frequente na população espanhola de surdez pré-lingual, e a deleção *GJB6*-309kb (TANG *et al.*, 2008). Ambas as deleções têm suas frequências variando de acordo com os grupos étnicos estudados (DEL CASTILLO *et al.*, 2002; DEL CASTILLO *et al.*, 2005). Essas deleções podem ser encontradas em conjunto com mutações no gene *GJB2*, ou seja, um indivíduo afetado por perda auditiva pode apresentar uma herança disgênica. Para explicar essa interação entre os dois genes foram formuladas duas hipóteses. A primeira hipótese formulada para explicar a interação entre os dois genes

sugere que a presença de duas mutações não alélicas que levam a PA seria devida a interação dos produtos dos genes das conexinas levando a formação de conexons heteroméricos e/ou heterotípicos, sendo evidenciada no trabalho de Marziano *et al.* (2003). Eles identificaram a co-localização celular das duas proteínas dos genes *GJB2* e *GJB6*. Outra hipótese sugere que deleções no *GJB6* poderiam levar a eliminação de um elemento regulatório responsável pela ativação da expressão do gene *GJB2* na orelha interna (COMMON *et al.*, 2005; DEL CASTILLO *et al.*, 2005). Atualmente essa segunda hipótese é mais aceita pelos pesquisadores. Além de ter sido evidenciada no trabalho de Common *et al.*, 2005, por meio da análise de expressão da conexina 26 e 30 em indivíduos com genótipo normal e indivíduos portadores das mutações *del(GJB6-D13S130)* e *c.35delG*.

Mutação mitocondrial A1555G

Em um estudo com 70 famílias, Estivill *et al.* (1998) observaram que em 36 delas a perda auditiva era congênita e em 34 delas era progressiva. Dezenove dentre as 70 possuíam perda auditiva sensorineural bilateral compatível com herança mitocondrial evidenciada por meio da análise da segregação da surdez nas famílias. Em doze das 19 famílias, havia indivíduos que se tornaram surdos após tratamento com aminoglicosídeos. Porém a relação entre aminoglicosídeos e surdez foi completa apenas em três famílias, pois nas outras famílias os indivíduos já haviam manifestado a PA antes do tratamento com estes antibióticos. A mutação A1555G foi encontrada em homoplasmia, ou seja, DNA mitocondrial idêntico em todas as mitocôndrias, em todos os indivíduos analisados das dezenove famílias. Porém foi encontrada em uma família uma segunda mutação nova previamente não descrita que consistia na substituição de uma citosina por uma timina na posição 1537 do gene *12S rRNA*, e todos os indivíduos a apresentavam em homoplasmia, além da mutação A1555G, indicando que a combinação das duas mutações causou a PA. Segundo os autores existe uma grande variação entre os haplótipos que possuem a mutação A1555G no DNA mitocondrial, o que sugere que esta mutação na população espanhola é decorrente de pelo menos cinco eventos mutacionais independentes, ou seja, não há associação entre transmissão materna de surdez sensorineural e determinados haplogrupos da população espanhola. Por conclusão, Estivill *et al.* (1998) sugerem que esta mutação (A1555G) é uma causa importante de surdez hereditária progressiva com penetrância dependente da idade, podendo ser influenciada com tratamento com aminoglicosídeos. Por isso, recomendaram sua inclusão na rotina de centros diagnósticos de surdez da Europa, dada a sua frequência na população europeia. E que se evitasse tratamento com aminoglicosídeos para indivíduos portadores da mutação A1555G, a fim de

atuar na prevenção da surdez.

Em um estudo realizado por Abreu-Silva *et al.* (2006) com 203 pacientes atendidos no Serviço de Aconselhamento Genético do Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo (IB-USP) cerca de 2% dos casos eram decorrentes da mutação mitocondrial A1555G. A maioria dos pacientes eram portadores de surdez pré-lingual. Segundo os autores essa característica também é encontrada em alguns estudos europeus, cuja frequência da mutação A1555G variou entre 0 e 2,4%. Outro ponto importante encontrado pelos autores, foi uma paciente de 7 anos, filha de pais consanguíneos (primos de primeiro grau) e afetados por surdez. A probanda era portadora de perda auditiva profunda, pré-lingual, retardo mental e epilepsia. Seu quadro clínico foi mais grave quando comparado com os demais membros afetados e analisados de sua família. A causa da gravidade pode ser devida a homoziguidade de genes deletérios. Além disso, os autores identificaram três substituições raras no DNA mitocondrial (T1291C, G7444A e A7569G). Indicando sua importância na triagem de serviços de aconselhamento genético no Brasil.

3.1.7 Genes relacionados à surdez não-sindrômica e suas funções

Os genes que já foram identificados como responsáveis pela surdez autossômica dominante e autossômica recessiva codificam proteínas com funções diversas relacionadas com citocinese e polimerização de actina (*HDIA1*), junções do tipo “gap” (*GJB2*, *GJB3*, *GJB6*), matriz extracelular (*COCH*, *TECTA*, *COL11A2*, *STRC*), fatores de transcrição (*POU4F3*, *EYA4*, *TFCP2L3*, *ESRRB*), colágenos (*COL11A2*), miosinas não convencionais (*MYO7A*, *MYH9* e *MYO6*), proteínas transmembrânicas (*TMCI*, *WFS1*), homeostase iônica (*KCNQ4*, *GJB3*, *GJB2*, *GJB6*, *WFS1*, *SLC26A4*, *SLC17A8*, *MARVELD2*, *CLDN14*, *SCL26A5*, *CRYM*), formação e manutenção do citoesqueleto dos estereocílios (*DIAPH1*, *ACTG1*, *CCDC50*, *RDX*, *TRIOBP*, *WHRN*, *ESPN*), proteína de adesão dos estereocílios (*CEACAM16*, *CDH23*, *PCDH15*, *LHFPL5*), regulação da expressão gênica (*MIRN96*), proteína motora dos estereocílios (*MYO7A*, *MYO6*, *MYH9*, *MYO15A*, *MYO3A*), manutenção de diferença de potencial elétrico (*TJP2*), inibição de apoptose (*DIABLO*, *HGF*, *SERPINB6*), exocitose nas vesículas sinápticas das células ciliadas internas (*OTOF*), sinalização de células ciliadas e/ou neurônios (*PJVK*, *GPSM1*, *CIB2*, *CABP2*), proliferação e diferenciação celular (*PTPRQ*) e função desconhecida (*MYH14*, *DFNA5*, *TMCI*, *MYO1A*, *TMPRSS3*, *TMIE*, *TPRN*, *LRTOMT*, *MSRB3*, *ILDRI*, *LOXHD1*).

3.2 ANÁLISE DE LIGAÇÃO E MAPEAMENTO

A descoberta das bases genéticas das doenças monogênicas fornece conhecimentos importantes sobre os mecanismos moleculares de origem das doenças, vias biológicas e alvos terapêuticos em potencial. A análise de ligação em grandes famílias com muitos afetados por surdez foi a estratégia que permitiu o mapeamento dos mais de 110 loci associados à surdez (VAN CAMP; SMITH, 03/2017). A análise de ligação investiga a segregação de marcadores moleculares, ou seja, sequências conhecidas do DNA altamente polimórficas utilizadas para genotipar os indivíduos pesquisados, em genealogias, buscando aqueles marcadores moleculares cujo padrão de transmissão coincide com o padrão de transmissão da doença em estudo. Os marcadores mais utilizados são os *SNPs* (*Single Nucleotide Polymorphisms* ou Polimorfismo de Nucleotídeo Único) dispostos em *arrays* e os microssatélites, estes são sequências repetidas em tandem de 1-4pb marcadas com fluorescência. Atualmente na varredura genômica são analisados *SNPs* dispostos em *arrays* variando o número de *SNPs* analisados de 6000 a 1,2 milhão de marcadores diferentes genotipados. O *Lod scores* ou “logaritmo das chances” é o teste estatístico utilizado para definir se os resultados de um estudo ou análise de ligação são significativos para excluir ou comprovar ligação entre o marcador e a entidade clínica em estudo (LEZIROVITZ *et al.*, 2009). O teste de *Lod scores* permite ponderar as chances em favor de ligação, com qualquer fração de recombinação significativamente menor que 50%, em relação a segregação independente ou fração de recombinação igual a 50%. Por convenção *Lod scores* igual ou maiores que +3,00 são suficientes para a ligação ser comprovada, enquanto *Lod scores* abaixo de -2,00 permitem excluir ligação.

Quando um marcador se mostra significativamente ligado à doença, outros marcadores mais polimórficos como microssatélites são analisados para confirmar e refinar o mapeamento. Estabelecida a região provável a conter o gene, a busca pelos melhores genes candidatos nela contidos classicamente envolve a seleção daqueles mais interessantes por terem expressão no tecido em questão e apresentarem função relacionada à condição. No entanto, o sequenciamento tradicional de Sanger torna essa pesquisa gene a gene árdua e cara, explicando em parte porque há muitos loci de surdez mapeados sem genes identificados (VAN CAMP; SMITH, 03/2017).

3.3 SEQUENCIAMENTO DE NOVA GERAÇÃO

O sequenciamento de nova geração (*NGS*) consiste primeiramente na fragmentação do DNA, em seguida são adicionados adaptadores universais que se ligam ao mesmo. O DNA

alvo é disposto sobre uma placa de *array* que contém sondas previamente identificadas ou universais que se ligam somente aos fragmentos que serão sequenciados. Posteriormente o DNA que não hibridizou nas sondas do *array* será eliminado por meio da digestão com exonuclease ou por meio de lavagem e eluição. Isto permite que fiquem somente as sequências alvos, que são então amplificadas, gerando milhões ou bilhões de fragmentos, geralmente curtos. Estes fragmentos por sua vez são sequenciados e alinhados ao genoma de referência por meio de ferramentas computacionais. Assim, é possível realizar uma cobertura ampla, confiável de acordo com o valor de cobertura de cada gene, extensa da amostra (MOORTHIE; MATTOCKS; WRIGHT, 2011).

Recentemente, o avanço nas plataformas de *NGS*, aliado às tecnologias que permitem o direcionamento da análise por meio do enriquecimento ou pré-captura dos segmentos genômicos de interesse, tornou-se possível sequenciar todas as sequências codificadoras de proteína do genoma (exoma) de forma rápida e custo-efetiva. À medida que as tecnologias de sequenciamento de *NGS* foram desenvolvidas, surgiram as estratégias revolucionárias para a identificação de novos genes. Locus candidatos contendo centenas de genes para a triagem podem agora ter todos os seus genes sequenciados em paralelo tanto por meio da captura customizada das sequências-alvo e *NGS* de um único locus ou *NGS* do exoma, para diminuir a necessidade de desenhar painéis customizados. Além disso, pequenas famílias onde a significância teórica nos estudos de ligação não era alcançada, frequentemente eram excluídas das estratégias convencionais e conseqüentemente nunca eram analisadas. Muitos desses desafios, como triagem gene a gene em pequenas famílias não adequadas a análise de ligação, foram sobrepujados por meio do uso de métodos poderosos de *NGS* como o sequenciamento do exoma. (VONA *et al.*, 2015).

Estima-se que 85% das mutações causadores de doenças mendelianas e monogênicas sejam encontradas na região de código ou nos sítios canônicos de *splicing*, embora essa estimativa possa ser decorrente de um viés de averiguação (BOTSTEIN; RISCH; 2003; GILISSEN *et al.*; 2012). Como as regiões de código constituem aproximadamente apenas 1% de todo o genoma humano, cerca de 30 Mb (Megabases) espalhados por cerca de 180.000 exons, a análise dessas regiões é uma estratégia potencialmente eficiente para revelar mutações causadoras de doenças, principalmente considerando a grande dificuldade atual em se interpretar as conseqüências funcionais de variações em sequências não codificadoras (NG *et al.*, 2010). O uso dessas estratégias se provou bem-sucedido na identificação de 21 genes associados PANS não-sindrômica, entre 2010 e 2015 (VONA *et al.*, 2015).

Os estudos dos exomas por meio das tecnologias *NGS* estão mudando a genômica

médica e tornaram o sequenciamento de DNA e RNA de alto rendimento disponível e com custo acessível. Com *NGS*, o desafio de se identificar os genes das doenças se transferiu da etapa de identificação para a etapa de interpretação: milhões de variantes genômicas são identificadas por genoma, mas apenas poucas podem explicar a doença mendeliana. Dessa forma, o *NGS* gera uma grande quantidade de dados que requer vários dias de análise de bioinformática a fim de se chegar a variante patogênica causadora da doença (VONA *et al.*, 2015).

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 COMISSÃO DE ÉTICA

Este estudo foi aprovado sob o protocolo de pesquisa n° 02238412.0.1001.0068, pela CAPPesq (Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa) do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (HCFMUSP) em 13/10/2012, parecer n° 130.695. O adendo solicitando a inclusão da aluna de mestrado como executante do projeto foi aprovada em 19/02/2014, parecer n° 534.535.

4.2 CRITÉRIO DE SELEÇÃO

Um total de 313 indivíduos brasileiros não aparentados de todo o país que apresentaram PA foram encaminhados para a Unidade de Aconselhamento de Surdez Genética do Departamento de Otorrinolaringologia (Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo). Não excluímos da análise os pacientes com suspeitas de causas ambientais ou características sindrômicas. Aproximadamente 31% da nossa coorte (100/313) foram de casos familiares. Selecionamos três desses casos familiares com PA não-sindrômica para realizar o sequenciamento do exoma que apresentavam pelo menos três afetados e que concordaram em participar da pesquisa. Não foram incluídos nas análises os pacientes dos quais não obtivemos dados clínicos e/ou não responderam a anamnese.

4.3 VARIÁVEIS CATEGÓRICAS NOMINAIS

Classificamos as famílias de acordo com as características clínicas e genéticas como, manifestação clínica, lateralidade, origem do defeito, gravidade da perda e padrão de herança.

4.4 EXTRAÇÃO DE DNA

O DNA foi extraído a partir de linfócitos de sangue periférico. Foram coletadas amostras de cerca de 3 ml de sangue em *vacutainers* contendo EDTA (*Ethylenediamine tetraacetic acid*), de cada paciente participante da pesquisa. Foi utilizado um dos kits de purificação de DNA genômico descritos a seguir: *Wizard® Genomic DNA Purification Kit* (Promega Corporation, Madison, WI, USA), *Qiagen (Puregene® Blood Core Kit B, QUIAGEN Sciences, Maryland, USA)*, *Quick-gDNA Mini Prep (Zymo Research Corp., CA, USA)*, *NuleoSpin® Blood L (MACHEREY-NAGEL GmbH & Co. KG, Düren, Germany)* ou *AxyPrep Blood Genomic DNA Miniprep Kit (Axygen Biosciences, CA, USA)*. O protocolo de extração de DNA foi seguido conforme o estabelecido pelos fabricantes de cada kit comercial utilizado.

4.5 QUANTIFICAÇÃO DO DNA:

A concentração de DNA de cada amostra foi quantificada com o espectrofotômetro *Nanodrop ND-2000c (NanoDrop Technologies, Rockland, Delaware, USA)*. Posteriormente foi feita uma diluição de cada DNA em água *milli-Q* com a finalidade de obter amostras com concentrações entre 50 e 100ng/ μ L.

4.6 PESQUISA DE MUTAÇÕES MAIS FREQUENTES

A pesquisa de mutações frequentes e sabidamente causadoras de perda auditiva foi realizada conforme rotina do Laboratório de Investigações Médicas 32 (LIM 32) de Otorrinolaringologia. Foram pesquisadas as deleções que incluem parte do gene *GJB6*, *GJB6[Δ (GJB6-D13S1830)* e *Δ (GJB6-D13S1854)]*, a mutação mitocondrial m.A1555G no gene *12SrRNA* e mutações na região de código do gene *GJB2*.

Estudo das deleções no gene da *GJB6*: As deleções *Δ (GJB6-D13S1830)* e *Δ (GJB6-D13S1854)* no gene da *GJB6* foram testadas após PCR com primers específicos para essas deleções (Tabela V) e visualização em gel de agarose 2% (DEL CASTILLO *et al.*, 2005).

Estudo da mutação mitocondrial m.A1555G: A mutação mitocondrial A1555G no gene *12S rRNA (MT-RNR1)* foi estudada por meio da PCR com primers específicos (Tabela V), seguida de digestão do DNA com enzima de restrição *HaeIII* (ESTIVILL *et al.*, 1998). A análise foi realizada após separação dos fragmentos amplificados e digeridos em gel de poliacrilamida 6%, impregnação por nitrato de prata e documentação por meio da digitalização do gel.

Sequenciamento da região codificadora do gene *GJB2*: A região codificadora dos genes foi amplificada por meio da PCR utilizando pares de primers específicos (Tabela V). Depois de purificados com as enzimas *Exonuclease I* e *Shrimp Alkaline Phosphatase*, os produtos de PCR foram submetidos a reação de sequenciamento com os mesmos primers da reação de PCR e o *ABI BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit* (Applied Biosystems, Carlsbad, CA, EUA). Após precipitação das amostras da reação de sequenciamento pelo método de etanol/Acetato de Sódio/EDTA, elas foram analisadas em um dos aparelhos de sequenciamento que fazem parte da Rede Premium de equipamentos multiusuários da FMUSP ou no aparelho ABI 3730 DNA Analyzer (*Applied Biosystems*, Carlsbad, CA, EUA) do CEGH-IBUSP, em ambos os casos de forma terceirizada.

4.7 MAPEAMENTO GÊNICO POR MEIO DE ANÁLISE DE LIGAÇÃO

As análises de ligação da varredura genômica foram feitas com marcadores moleculares do tipo *SNPs* espalhados por todo o genoma, utilizando “chips” de 250.000 *SNPs* (*GeneChip® Human Mapping 250K Array Sty MTO*), leitor *Genechip 3000 Scanner* e *software* para interpretação.

Nas regiões que se mostraram candidatas após a varredura genômica com *SNPs* (*Lod scores* positivos – vide abaixo), escolhemos marcadores do tipo microssatélites para delimitá-las. Marcadores moleculares do tipo microssatélites foram utilizados para refinar as regiões cromossômicas candidatas. As condições da amplificação foram: desnaturação inicial a 94°C por 4 min, de 30 a 40 ciclos de amplificação com desnaturação a 94°C por 1 min, “*annealing*” por 2 min com temperaturas variáveis para cada par de *primers*, extensão a 72°C por 1 min e a extensão final a 72°C por 6 min. Para a amplificação dos microssatélites, o volume final de cada reação foi 10µl, contendo entre 50ng e 100ng de DNA genômico, entre 0,33µl de cada primer a 10µM, 1,5U de Taq polimerase e 0,27mM dCTP, 0,27mM dTTP, 0,27mM dGTP e 0,27mM dATP; 1,3 a 2,0mM MgCl₂, 20mM TRIS pH = 8,4; 50mM KCl. O primer *forward* correspondente a cada um dos lócus foi marcado com fluorescência. O padrão de peso molecular utilizado foi o *Size Standard GeneScan™ - 500 LIZ™* (*Applied Biosystems, Warrington, UK*). Para análise dos dados foi utilizado o programa *GeneMarker® The Biologist Friendly Software* (*SoftGenetics, LLC, State College, PA, USA*).

4.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA DO ESTUDO DE LIGAÇÃO

Os resultados da determinação dos genótipos dos marcadores moleculares, *SNPs* e microssatélites, foram analisados para obtenção de *Lod scores* (teste paramétrico) de

múltiplos pontos e *Z-mean* (teste não-paramétrico, ou seja, não há necessidade de especificar o padrão de transmissão da doença) com o programa Alohomora (RÜSCHENDORF; NÜRNBERG, 2005). Os *Lod scores* foram calculados admitindo o padrão de herança como autossômico dominante e de penetrância alta (90%), frequência gênica do alelo mutado de 0,0001, taxa de recombinação semelhante em ambos os sexos e a taxa de mutação do gene igual a zero. As frequências alélicas em cada marcador foram calculadas pelo programa Alohomora (RÜSCHENDORF; NÜRNBERG, 2005) com os genótipos de todos os indivíduos da própria família. Os *Lod scores* de múltiplos pontos e o *Z-mean* resultam da análise de segregação de vários marcadores de um mesmo segmento cromossômico, simultaneamente e em relação à doença. O paramétrico (*Lod score*) é comumente utilizado em grandes famílias com várias gerações de afetados. Já métodos não-paramétricos são utilizados em famílias pequenas nucleares.

4.9 SEQUENCIAMENTO DE NOVA GERAÇÃO DO EXOMA

As amostras dos casos 2 e 3 foram submetidas a sequenciamento do exoma pelos pesquisadores Patricia Yoshie Nishimura, Layla Testa Galindo e Luciano César Scarpelli nos laboratórios do Grupo Dasa. O preparo da biblioteca foi realizado com *Ion PI Library kit plus* e *Ion PI Ampliseq Exome RDY 1x8*. Para o preparo do *template* foi utilizado *Ion PI Hi-Q OT2 200 kit*, seguido de sequenciamento com *Ion PI Hi-Q Sequencing 200 kit* e *Ion PI Chip v3*. O equipamento utilizado no sequenciamento de nova geração foi o *Proton Semiconductor Sequencer – Ion Torrent, Life Technologies (Thermo Fisher, MA, EUA)*. Alinhamento e identificação de variantes utilizando protocolos de bioinformática, tendo como referência a versão hg19/GRCh37 do genoma humano.

Já a amostra do caso familiar 1, foi submetida ao sequenciamento do exoma pelos pesquisadores Dr. David Schlesinger e Dr. João Paulo Kitajima, na empresa *Mendelics – Análise Genômica*. O preparo da biblioteca utilizou o *kit* de captura de exons *SureSelect V4 (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA)* e o sequenciamento massivo em paralelo de exomas foi realizado por meio da plataforma *Illumina (Illumina INC., San Diego, CA, USA)*. A análise de Bioinformática foi realizada por meio de ferramentas como *BWA; GATK, R ExomeDepth, Annovar* e *SnPEff*. Todas as variantes foram avaliadas em ao menos quatro ferramentas de predição de efeito de mutação (*Polyphen 2, Sift, PROVEAN* e *MutationTaster*) para mutações do tipo missense e *NNSPLICE 0.9 version* e *NetGene 2 Server* para mutações de *splicing*.

A filtragem das variantes foi realizada da seguinte maneira: os primeiros arquivos com

extensão VCF (*Variant Call Format*) foram analisados em um sistema de gerenciamento de banco de dados (MySQL, <http://www.mysql.com/>), onde integramos as variantes dos indivíduos da coorte controle do banco de dados interno e do paciente. Em seguida, excluimos as variantes que já possuíam baixa patogenicidade esperada (variantes encontradas em regiões intrônicas que não afetam o *splincing*, intergênicas, variantes sinônimas, ou seja, trocas de base que geram o mesmo tipo de aminoácido sem geração de novos sítios de *splincing*). A etapa seguinte foi remover variantes com a menor frequência alélica (MAF) maior que 0,5% no banco de dados *Exome Aggregate Consortium* (ExAC), bem como variantes com um MAF superior a 0,5% em um banco de dados variantes locais, com o intuito de destacar as variantes específicas da população local e evitar erros sistemáticos em métodos de sequenciamento ou mapeamento. Por fim, filtramos as variantes encontradas nos genes implicados na perda auditiva hereditária, conforme listado em <http://hereditaryhearingloss.org/> (VAN CAMP; SMITH, 03/2017) e os classificamos de acordo com o padrão de herança de cada família.

4.10 BANCO DE DADOS E FERRAMENTAS DE BIOINFORMÁTICA

Os bancos de dados utilizados como referências e para filtragem do genoma humano foram: EXAC (*Exome Aggregate Consortium*), 1000G (The 1000 Genomes Project Consortium), *Deafness Variation Database* (<http://deafnessvariationdatabase.org/>) e ABraOM (*Brazilian genomic variants*, 03/2017, abraom.ib.usp.br/), *Ensembl* (hg19/GRCh37/p.13) do genoma da espécie humana (http://grch37.ensembl.org/Homo_sapiens/Info/Index).

As ferramentas de bioinformática utilizadas para verificar a patogenicidades das variantes encontradas foram: SIFT (http://sift.jcvi.org/www/SIFT_chr_coords_submit.html), Provean (http://provean.jcvi.org/genome_submit_2.php), MutationTaster (<http://www.mutationtaster.org/>), PolyPhen 2 (<http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/>), VeP - *Variant Effect Predictor* (<http://grch37.ensembl.org/Tools/VEP>).

4.11 SEQUENCIAMENTO CONVENCIONAL SANGER

O sequenciamento convencional de Sanger foi realizado para validação dos resultados do estudo exoma e análise da segregação das variantes nas famílias. A região codificadora dos genes foi amplificada por meio da PCR, utilizando pares de *primers* específicos (tabela V). Os *primers* foram desenhados utilizando o Primer3 (<http://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/>) e realizada a PCR *in silico*, ou seja, verificação da região a ser amplificada no banco de dados *UCSC Genome Browser* (KENT *et al.*, 2002) o link de acesso foi <https://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgPcr>. Depois de purificados com as enzimas Exonuclease I

e *FastAP Thermosensitive Alkaline Phosphatase*, os produtos de PCR foram submetidos à reação de sequenciamento utilizando os mesmos *primers* da reação de PCR, mas um em cada tubo, e o *ABI BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, Carlsbad, CA, EUA)*. Após precipitação das amostras da reação de sequenciamento com etanol, acetato de sódio e EDTA, estas foram analisadas em um dos aparelhos de sequenciamento que fazem parte da Rede Premium de equipamentos multiusuários da FMUSP ou no aparelho *ABI 3730 DNA Analyzer (Applied Biosystems, Carlsbad, CA, EUA)* do CEGH-IBUSP, em ambos os casos de forma terceirizada. A análise das mutações nas sequências dos pacientes foi realizada no programa Bioedit (HALL, 1999) por meio do alinhamento com as sequências de referência obtidas no banco de dados *Ensembl* (hg19/GRCh37/p.13) do genoma da espécie humana (http://grch37.ensembl.org/Homo_sapiens/Info/Index).

Todas as etapas realizadas em cada família podem ser observadas na figura 1.

Tabela V com o nome e sequência 5' – 3' de cada primer utilizados nas análises.

Gene	Descrição da seqüência	Seqüência dos primers 5'-3'
<i>OTOA_EX21</i>	OTOAex21F	gaccacattagtgaggactagg
	OTOAex21R	aggaggcctcttgatgtcag
<i>GJB3_EX2</i>	GJB3_EX2_F	aaccttgctgtgcctcagtt
	GJB3_EX2_R	CATATTGAAGCCATGCCAGA
<i>MYO6_EX</i>	MYO6ex26F	agccattttcagtttataattcag
	MYO6ex26R	ttgtcattaaccactgtcaatacc
<i>OR52I1_EX1</i>	OR52I1_EX1_F	ATGCTGGGTCCAGCTTACAA
	OR52I1_EX1_R	TCATGAACCCAGGTTGGAGT
<i>SVEP1_EX46</i>	SVEP1_EX46_F	agcagaacacatgcaggaaa
	SVEP1_EX46_R	tcattttgccaccacttctg
<i>CSNK2A3_EX1</i>	CSNK2A3_EX1_F	TGAAGCCATCAACATCACAAA
	CSNK2A3_EX1_R	CTCAGCCAAACCCAGTCTA
<i>UBAP2_EX15</i>	UBAP2_EX15_F	tcactcctcttcttccagtt
	UBAP2_EX15_R	ggagatgatggaaggctctgg
<i>TSNAXIP1_EX7</i>	TSNAXIP1_EX7_F	cagaaatgcccaatctcctt
	TSNAXIP1_EX7_R	tggttatggaatgagcagtc
<i>TUBB8_EX3</i>	TUBB8_EX3_F	CTGATGAACATGCCATCGAC
	TUBB8_EX3_R	cgactcgactcggaggatag
<i>MTLLT4_EX16</i>	MTLLT4_EX16_F	ccatatgtctatgtgatgaatcc
	MTLLT4_EX16_R	gaatcttgaacatagctcactgaa
<i>DOLK_EX1</i>	DOLK_EX1_F	CACCTCATGACCTGTGTGCT
	DOLK_EX1_R	ATCAGCCAGATGGGAAGAGA
<i>MCM6_EX8</i>	MCM6_EX8_F	tggttaggagaaaacattgga
	MCM6_EX8_R	ttcaatgtgagattggtattacagg

Tabela V (continuação)

Gene	Descrição da sequência	Sequência dos primers 5'-3'
<i>MT-RNR1</i>	MT-RNR1_F	GCTCAGCCTATATACCGCCATCTTCAGCAA
	MT-RNR1_R	TTCCAGTACACTTACCATGTTACGACTGG
<i>GJB6</i>	GJB6-1R	TTTAGGCATGATTGGGGTGATTT
	BKR-1	CACCATGCGTAGCCCTAACCATTTT
	DelBK1	TCATAGTGAAGAACTCGATGCTGTTT
	DelBK2	CAGCGGCTACCCTAGTTGTGGT
	Cx30Ex1A	CGTCTTTGGGGGTGTTGCTT
	Cx30Ex1B	CATGAAGAGGGCGTACAAGTTAGAA
<i>GJB2</i>	GJB2-Hs-F	ACCTGTTTTGGTGAGGTTGTGT
	GJB2-UTR-R	GCATCTGGAGTTTCACCTGAG
	GJB2-Hs-int-F	GAAGTTCATCAAGGGGGAGATA
	GJB2-HS-int-R	ACCTTCTGGGTTTTGATCTCCTC
<i>IFITM2</i>	IFITM2_ex1F	ACTGAGAACCATCCCGGTAA
	IFITM2_ex1R	TCACAGGGACACACAAGTCC
<i>CORO2A</i>	CORO2Aex3F	CAGGATCCCACAGGGAATAA
	CORO2Aex3R	CCACACAGTGACCTCACCTC
<i>FAM208B</i>	FAM208B-ex8F	TTGGTGATGTTTTATGAGGGAGT
	FAM208B-ex8R	TGTGCCATCTAGGCACAACCT
	FAM208B_Fex8-2	ATGAGGGAGTTTTATAACCAAGAAC
	FAM208B_Rex8-2	ATTTTCCCCTTGTCTGTTTGACA
<i>AKAP2</i>	AKAP2_ex2F	CTGGTGCAGTGGTTCGTGGT
	AKAP2_ex2R	CTTGGCCTCCTTTTTTCAGTG
<i>TMPRSS3</i>	TMPRSS3-EX2-F	gctttgtgtggactgtcgaa
	TMPRSS3-EX2-R	gaagaaaacaccggtctcca
	TMPRSS3-EX3-F	ctccaggccatctccaaata
	TMPRSS3-EX3-R	cttggtgacaaagccatgag
	TMPRSS3-EX4-F	ttcaacctgcaactgtggttc
	TMPRSS3-EX4-R	gcttatgtggtctcccaag
	TMPRSS3-EX5-F	gaccagcgagaagtctcagg
	TMPRSS3-EX5-R	ggatgatcgggcatccta
	TMPRSS3-EX6-F	aggaagcctttgatgggtt
	TMPRSS3-EX6-R	ctccctcaggtctcacacc
	TMPRSS3-EX7-F	gaattgttgacctcatctca
	TMPRSS3-EX7-R	ctccagcaggtagggtaca
	TMPRSS3-EX8-F	gagctgctgagctctgg
	TMPRSS3-EX8-R	tctctgtcttccctctggac
	TMPRSS3_EX9_F	ttcaggatacctgaggtcaatg
	TMPRSS3_EX9_R	caactgatgccaacaccaac
	TMPRSS3-EX10-F	gggagatagttggctcct
	TMPRSS3-EX10-R	atggaacctgactcctgac
	TMPRSS3-EX11-F	gacacacaccagagagcat
	TMPRSS3-EX11-R	ttcttccacgccctgtaa
TMPRSS3_EX12_F	ctggtgggtccctctgta	
TMPRSS3_EX12_R	tgtttcagcacaagcgtct	
TMPRSS3-EX13-F	gtcttcatcgtggagaacagc	
TMPRSS3-EX13-R	AGATGGAAGGGTGCCTCTTT	

Tabela VI com as ciclagens utilizadas para cada gene

Genes	Ciclagens			
	1° Estágio (1 Ciclo)	2° Estágio (10 Ciclos)	3° Estágio (30 Ciclos)	4° Estágio (1 Ciclo)
<i>MT-RNR1; IFITM2; CORO2A; FAM208B; AKAP2; OTOA; GJB3; MYO6; OR5211; CSNK2A3; UBAP2; TSNAXIP1; MLLT4; DOLK; MCM6; TMPRSS3 (Exons: 2,3,4,5,6,7,8,9,10,11,12 e 13), TECTA</i>	- 95°C por 5 minutos	- 95°C por 45 segundos - 67°C por 45 segundos - 72°C por 1 minuto	- 95°C por 45 segundos - 57°C por 45 segundos - 72°C por 1 minuto	- 72°C por 5 minutos - 10°C infinito
<i>TUBB8</i>	- 95°C por 5 minutos	- 95°C por 45 segundos - 69°C por 45 segundos - 72°C por 1 minuto	- 95°C por 45 segundos - 62°C por 45 segundos - 72°C por 1 minuto	- 72°C por 10 minutos - 10°C infinito

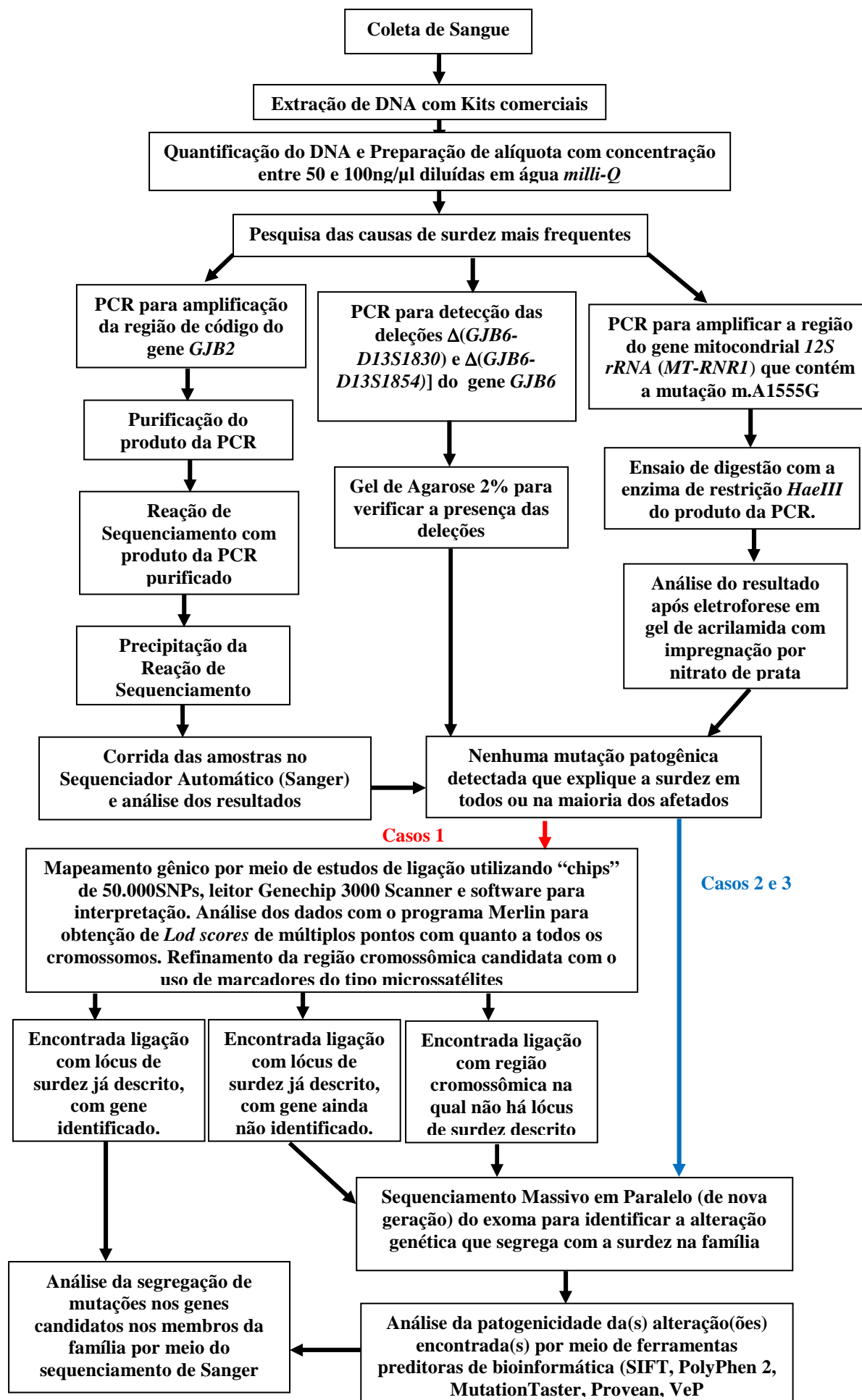


Figura 1: Fluxograma de trabalho.

5. RESULTADOS

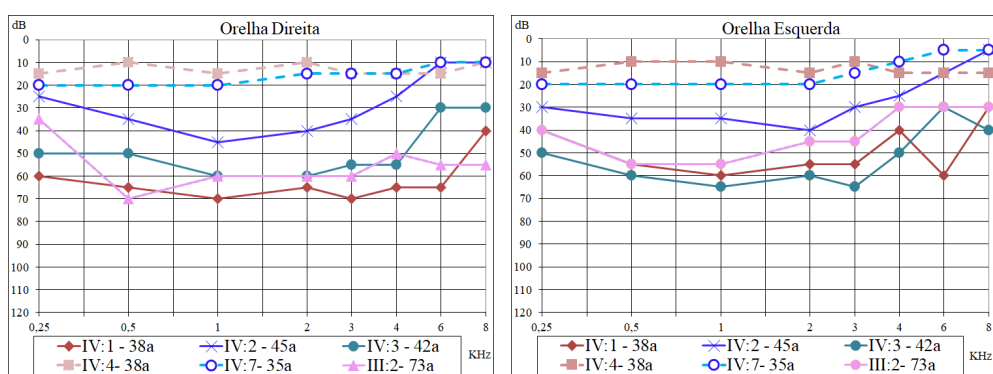
O estudo das causas mais frequentes de surdez, isto é, as mutações na região código do gene *GJB2*, as deleções $\Delta(\text{GJB6-D13S1830})$ e $\Delta(\text{GJB6-D13S1854})$ no gene *GJB6* e a mutação mitocondrial A1555G tiveram resultados negativos nas três famílias.

5.1 CASO FAMILIAL 1: FAMÍLIA DE GOIÂNIA-GO

5.1.1 Dados clínicos e genealógicos

Foram coletadas amostras de sangue para extração de DNA de quatro afetados por PANS bilateral, progressiva, de grau leve a moderado (Figura 2A) e padrão de herança autossômico dominante (Figura 3). Uma paciente (IV: 6, destacado em cinza na figura 3) apresentou PA mista de grau moderado na orelha esquerda e PA mista de grau leve na orelha direita (Figura 2B) e de três normouvientes (Figura 2A). A idade de manifestação variou de 5 a 30 anos.

(A)



(B)

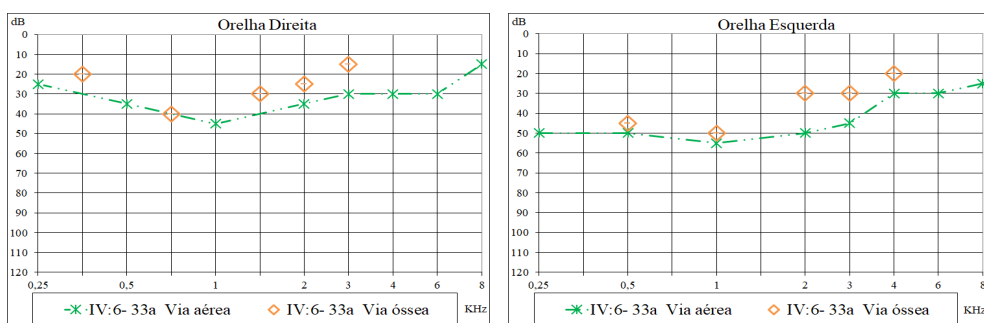


Figura 2: (A) Audiometrias dos indivíduos do caso familiar 1. (B) Audiometria IV:6 PA mista de grau moderado na orelha esquerda e PA mista de grau leve na orelha direita

5.1.2 Estudo Molecular

Após a exclusão das mutações frequentes citadas acima, realizamos a varredura genômica com *SNP-array* dos indivíduos afetados (III:2, IV:1, IV:2, IV:3 e IV:6) seguida do sequenciamento de nova geração do exoma da probanda (IV: 1). Foi realizada a análise de ligação com os resultados obtidos do *SNP-array* e calculados *Lod score* de múltiplos pontos numa análise paramétrica na qual definimos o padrão de herança e demais parâmetros (vide métodos, análise estatística do estudo de ligação) e *Z-mean* numa análise não-paramétrica na qual não definimos nenhum parâmetro. Ambas as análises foram feitas em todos os cromossomos (Figura 4) com o programa Alohomora (RÜSCHENDORF; NÜRNBERG, 2005). Comparamos as duas análises para definir as regiões cromossômicas candidatas a conter o gene responsável pela surdez na família.

As regiões cromossômicas que apresentaram valores de *Lod score* e *Z-mean* mais elevados por uma extensão mínima de 2cM foram escolhidas para serem analisadas com maior detalhe por meio de marcadores moleculares do tipo microssatélites: Cr: 2: 2q21.2-q22.3, Cr 6: 6q26-27, Cr 9: 9p24.2-p13.3, Cr 9: 9q21.32-q34.11, Cr 10: 10p15.1-p14, Cr 11: 11p15.5-p13, Cr 15: 15q11.2-13.3, Cr 16: 16q12.2-q23.3, Cr 22: 22q13.31-13.1 (Figura 2). A sigla cM, também chamado de unidade de mapa, é a distância entre dois marcadores, que equivale a 1% de recombinação, ou seja, é utilizada em mapeamento cromossômico feito pela análise da porcentagem de recombinantes entre dois marcadores em uma mesma região cromossômica. Em todas as regiões candidatas, a análise de segregação dos haplótipos de microssatélites, que são uma combinação de alelos em diferentes marcadores ao longo do seguimento cromossômico que são herdados como uma unidade do pai ou da mãe, se mostrou compatível com ligação.

Em seguida, realizamos o sequenciamento do exoma da probanda. Após a filtragem das variantes identificadas no exoma, evidenciamos duas variantes em genes já associados com surdez: c.5685delC (p.D1895fs) no gene *LOXHD1*, não descrita, e c.1851_1853delTCC (p.P618del) no gene *DIAPH1*, considerada benigna no banco de dados *Deafness Variation Database*. O gene *LOXHD1* causa surdez congênita com padrão de herança autossômico recessivo, diferente do observado na família em estudo. Por isso, não testamos a segregação desta variante na família.

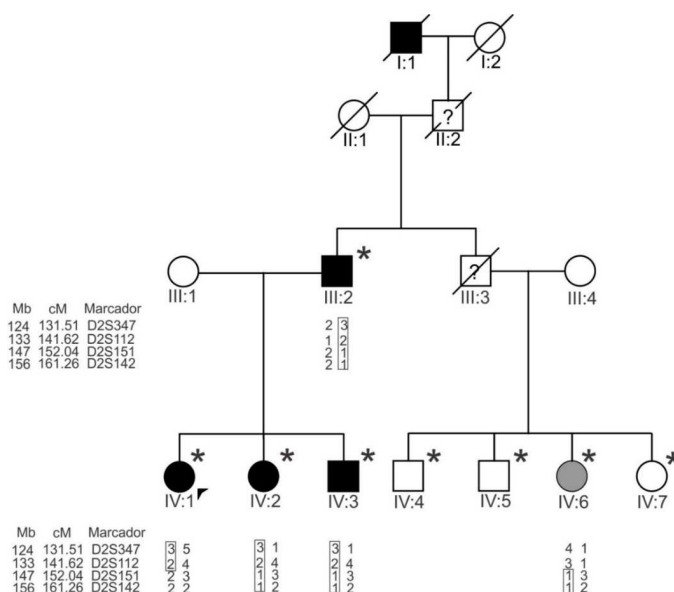


Figura 3: Heredograma do caso familiar 1 com os haplótipos de microssatélites em 2q21.2-q22.3.

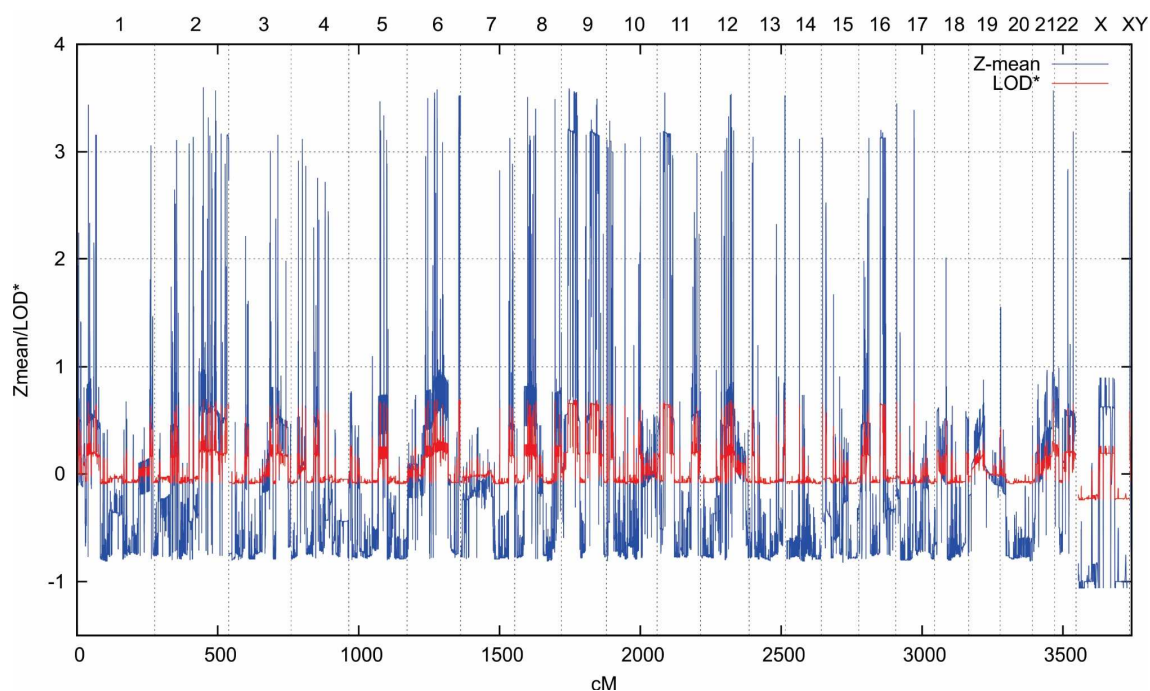


Figura 4: Gráfico com os resultados de *Lod score* (picos vermelhos) e *Zmean* (picos azuis) do caso familiar 1 obtidos a partir do programa Alohomora com as regiões cromossômicas apontadas como candidatas, na varredura genômica com *SNPs*.

No entanto, ao filtrarmos variantes contidas dentro das regiões cromossômicas candidatas por meio da análise de ligação, chegamos as seguintes variantes (tabela VI).

A análise de segregação dessas variantes foi realizada por meio do sequenciamento de Sanger em todos os indivíduos. Em 28 de junho de 2017 obtivemos mais informações clínicas da paciente IV:6 que de fato apresenta quadro clínico distinto dos demais afetados e, portanto, poderia ter perda auditiva por outra causa. Além disso, também confirmamos que os indivíduos IV:4, IV:5 e IV:7 são normouvientes. Dessa forma, a única variante que mostrou

segregar com surdez e não estava presente nos indivíduos normouvientes da família foi a variante c.1082A>G no exon 8 do gene *MCM6* (rs141448886, GRCh37, isoforma ENST00000264156.2) (Figura 5) que se encontra na banda cromossômica 2q21.3, dentro de uma das regiões cromossômicas mapeadas encontradas por meio do estudo de ligação (varredura genômica mais microssatélites). Os indivíduos IV:4, IV:5, IV6 e IV:7 não herdaram a variante, enquanto que os indivíduos III:2, IV:1, IV:2 e IV:3 são heterozigotos, ou seja, compatível com padrão de herança autossômico dominante, e os afetados com quadros clínicos semelhantes herdaram a alteração.

Tabela VII: Análise das variantes identificadas no sequenciamento do exoma da probanda dentro das regiões cromossômicas candidatas, com score de patogenicidade e MAF.

Banda	Gene	Mutação	Proteína	SIFT/Polyphen-2/MutationTaster/Provean	MAF (Menor frequência alélica) - Ensembl	ABraOM	dbSNP ID
11p15.5	<i>IFTM2</i>	c.245_246insG	p.S83Vfs*2	-----/-----/ causadora de doença (0.9999)/-----	-----	-----	-----
16q22.1	<i>SLC7A6OS</i>	c.4G>T	p.E2K	Deletéria (0.014)/Provavelmente deletéria (0.925)/ causadora de doença (1)/Neutra (-1.13)	< 0.01	-----	rs58760922
9q31.3	<i>SVEP1</i>	g.204416delinsTT	-----	-----/-----/ causadora de doença (1)/-----	-----	-----	-----
9q22.33	<i>CORO2A</i>	c.295G>A	p.A99T	Deletéria (0.000)/Provavelmente deletéria (1.000)/ causadora de doença (0.9999)/Deletéria (-3.87)	< 0.01	0,000821	rs141565492
10p15.1	<i>FAM208B</i>	c.314T>C	p.I105T	Deletéria (0.003)/Provavelmente deletéria (0.920)/ causadora de doença (0.81916)/Neutra (-1.96)	< 0.01	-----	rs371027335
11p15.4	<i>CSNK2A3</i>	c.239G>A	p.R80H	Deletéria (0.000)/-----/-----/-----	< 0.01	-----	rs75784263
9q31.3	<i>AKAP2</i>	c.1090G>A	p.G364S	Deletéria (0.000)/Provavelmente deletéria (0.780)/ causadora de doença (0.9999)/Neutra (-2.35)	< 0.01	-----	rs759481374
9p13.3	<i>UBAP2</i>	c.1703C>T	p.S568L	Deletéria (0.007)/Provavelmente patogénica (0.998)/ causadora de doença (0.999476561162578)/Deletéria (-2.58)	< 0.01	-----	rs10971808
16q22.1	<i>TSNAXIP1</i>	c.575A>G	p.D192G	Tolerável (0.094)/Provavelmente patogénica (0.859)/ causadora de doença (0.9977)/Deletéria (-5.25)	0,01	0,001642	rs74684664
10p15.3	<i>TUBB8</i>	c.233C>G	p.S78W	Deletéria (0.000)/ Provavelmente deletéria (1.000)/ causadora de doença (0.9999)/Deletéria (-5.06)	0,02	-----	rs140792516
9q34.11	<i>DOLK</i>	c.1079A>G	p.Y360C	Deletéria (0.015)/Provavelmente deletéria (0.990)/ causadora de doença (0.9999)/Deletéria (-6.34)	0,01	0,007389	rs138453255
2q21.3	<i>MCM6</i>	c.1082A>G	p.N361S	Tolerável (0.091)/Benigna (0.339)/ causadora de doença (0.9999)/Deletéria (-3.64)	0,02	0,008210	rs141448886
6q27	<i>MLLT4</i>	c.2129G>A	p.R710Q	Tolerável (0.096)/---/causadora de doença (0.9999)/ Neutra (-1.06)	0,01	0,004105	rs149079362

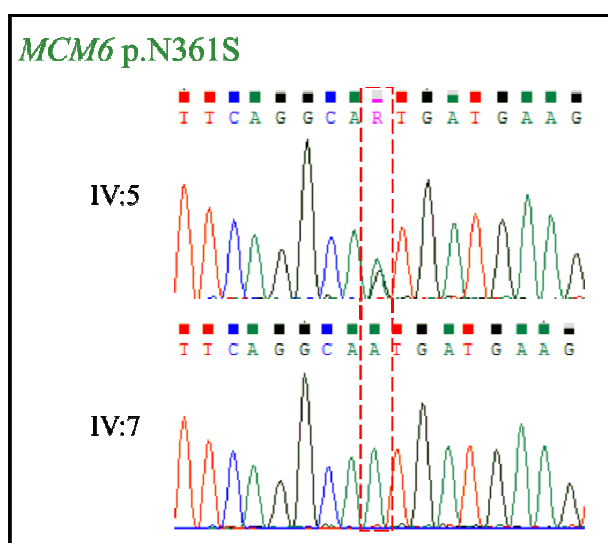


Figura 5: Eleetroferogramas mostrando sequências selvagens e com a mutação c.1082A>G (p.N361S) no gene *MCM6*.

Essa variante é prevista como patogênica por duas ferramentas de bioinformática (MutationTaster: 0.99999999791244 de chances de ser Provavelmente Causadora de Doença e Provean com score -3.64 considerada deletéria) e duas ferramentas consideraram-na tolerável e/ou benigna (SIFT score 0.091 e PolyPhen2 score 0.399). Os scores de conservação do nucleotídeo entre diferentes espécies são altos (PhyloP= 4.601, que varia de -14 a +6 e os resultados positivos indicam conservação, e PhastCons=1, que reflete a probabilidade de cada nucleotídeo pertencer a um elemento conservado baseado no alinhamento múltiplo de sequências genômicas de 46 espécies diferentes). Considerando todas as populações contidas no banco de dados Ensembl (<http://www.ensembl.org/index.html>) a frequência dessa variante é menor que 1%. Porém, em amostra da população da Finlândia essa frequência chega a 2%, que pode ser considerada um pouco alta para uma variante patogênica.

5.2 CASO FAMILIAL 2: FAMÍLIA DE CURITIBA - PR

5.2.1 Dados clínicos e genealógicos

A família 2 foi atendida no Ambulatório de Surdez Genética do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (HCFMUSP). Todos os afetados por PANS pós-lingual e progressiva desta família encontram-se uma única geração. Por isso, não era possível definir com certeza o padrão de herança, embora o mais provável fosse o autossômico recessivo (Figura 7). Participaram da pesquisa 12 pessoas, dos quais cinco realizaram audiometria tonal por via aérea (250–8000 Hz) e por via óssea (250–4000 Hz). A perda auditiva entre os indivíduos II:2 (62 anos), II:3 (58 anos), II:7 (45 anos) foi semelhante de moderada a profunda, pior em frequências agudas (Figura 6). A idade de manifestação variou de 20 a 30 anos. Apenas um dos afetados apresentou PANS bilateral de grau leve em altas frequências (II:7) e seu quadro clínico foi diferente quando comparado aos demais afetados da família. A probanda realizou tomografia computadorizada e ressonância magnética que descartaram a presença de malformações na orelha interna.

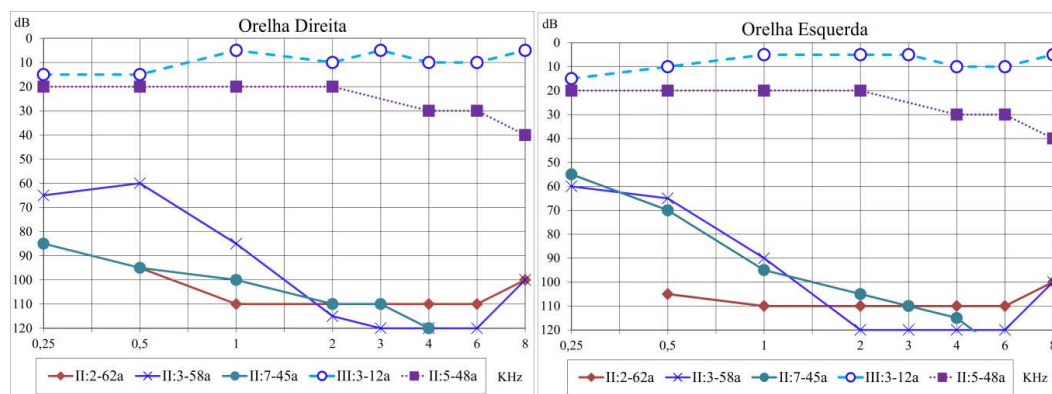


Figura 6: Audiometria dos indivíduos do caso familiar 2.

5.2.2 Estudo Molecular

Foram coletadas amostras de sangue para extração de DNA de três afetados e nove indivíduos normouvintes (Figura 6). Foi realizado o sequenciamento de nova geração do exoma com amostra de DNA da probanda (II:7).

O sequenciamento de nova geração do exoma revelou a presença de 37.834 variantes em 12.885 genes. Após os processos de filtragens listados nos métodos restaram 376 variantes, das quais quatro estavam presentes em dois genes já descritos como responsáveis por surdez (tabela VIII).

Tabela VIII: Com genes identificados no sequenciamento do exoma da probanda, com score de patogenicidade e MAF

Lócus	Gene	Mutação	Proteína	SIFT/Polyphen-2/MutationTaster/Provean	Patogenicidade de acordo com o Deafness Variation Database	MAF (Menor frequência alélica)	ABraOM	dbSNP ID
DFNB49	<i>BDP1</i>	c.1963G>A	p.V655M	Tolerável (0.765)/Benigna (0.002)/Polimorfismo (0.9999)/Neutra (0.68)	Provavelmente benigna	< 0.01	0.000821	rs201582692
DFNB49	<i>BDP1</i>	c.3191T>C	p.L1064S	Deletéria (0.000)/Provavelmente Deletéria (0.999)/Polimorfismo (0.9999)/ -1.32 (Neutra)	Variante não descrita anteriormente
DFNB8/10	<i>TMPRSS3</i>	c.916G>A	p.A306T	Deletéria (0.002)/Provavelmente Deletéria (1.000)/Causadora de doença (0.9999)/ -3.70 (Deletéria)	Patogênica	< 0.01	rs181949335
DFNB8/10	<i>TMPRSS3</i>	c.1276G>A	p.A426T	0.000 (Deletéria)/Provavelmente Deletéria (1.000)/Causadora de doença (0.9999)/ -3.49 (Deletéria)	Patogênica	< 0.01	0.004926	rs56264519

A primeira variante (c.1963G>A) no gene *BDP1* já havia sido previamente descartada como patogênica pela literatura (*Deafness Variation Database*). Já a segunda variante não foi descartada num primeiro momento, pois duas ferramentas preditoras de patogenicidade classificaram-na como neutro e/ou tolerável e outras duas como patogênicas e nunca foi descrita em nenhum banco de dados que fornecessem informações sobre sua frequência populacional.

As variantes do gene *TMPRSS3* já foram descritas na literatura como patogênicas (*Deafness Variation Database*). Para analisar a segregação dessas variantes [c.916G>A (p.A306T) no exon 9 e c.1276G>A (p.A426T) no exon 12] foi realizado o sequenciamento de Sanger com amostra de todos os indivíduos da família. Os resultados confirmaram a presença das alterações em heterozigose composta, isto é, as mutações estão em *trans* (cada alteração em um alelo diferente do mesmo gene) em todos os afetados (II:2, II:3 e II:7; figura 7). A alteração c.916G>A leva na proteína à troca de uma alanina por uma treonina na posição 306 e a mutação c.1276G>A leva à troca de uma alanina por uma treonina na posição 426 (exon 12). Sete normouvientes são portadores de uma das alterações (I:1, II:1, II:9, III:1, III:3, III:4 e III:5) e dois não herdaram nenhuma das mutações (II:5 e III:2) conforme observado na figura 7. Portanto, a segregação entre os indivíduos normouvientes também é compatível com a hipótese de que essas mutações são patogênicas e causam surdez em heterozigose composta.

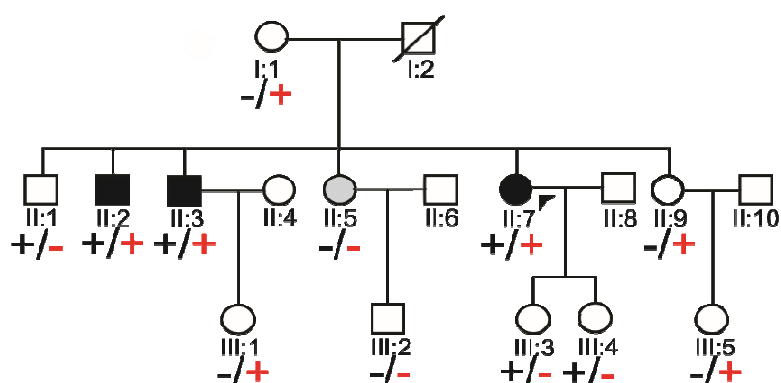


Figura 7: Heredograma do caso 2. Os sinais positivos e negativos indicam a presença e ausência das mutações, respectivamente. Destacado na cor preta a mutação p.A306T no exon 9 e na cor vermelha a mutação p.A426T no exon 12 do gene *TMPRSS3*. Destacada na cor cinza (II:5) apresenta PANS bilateral de grau leve em altas frequências.

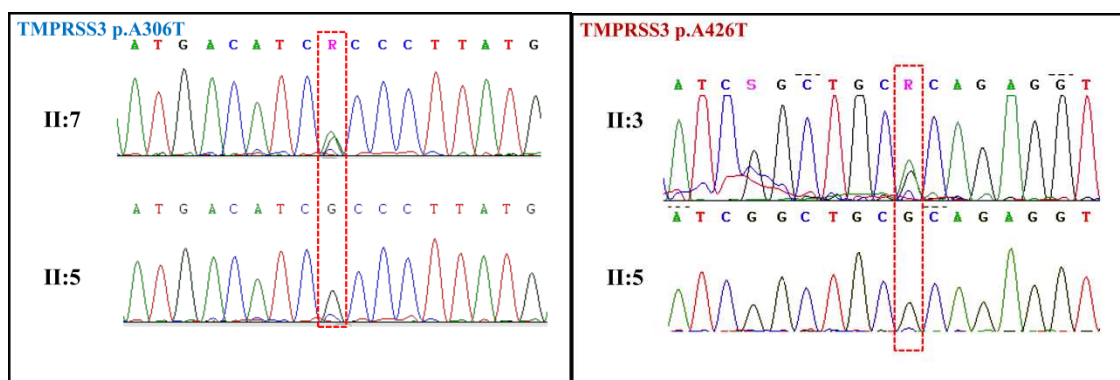


Figura 8: Eletróferogramas mostrando sequências selvagens e com as mutações c.916G>A (p.A306T) no exon 9 e c.1276G>A (p.A426T) no exon 12 do gene *TMPRSS3*.

5.3 CASO FAMILIAL 3: FAMÍLIA DE BELO HORIZONTE – MG

5.3.1 Dados clínicos e genealógicos

Esta família possui quatro gerações com 13 afetados (Figura 10a) de ambos os sexos, homens e mulheres transmissores, indicando que o padrão de herança é o autossômico dominante. A probanda realizou tomografia computadorizada do osso temporal que descartou a presença de malformações na orelha interna. Participaram do estudo 17 membros da família, dos quais 14 realizaram audiometria tonal por via aérea (250–8000 Hz) e por via óssea (250–4000 Hz). Das 14 audiometrias, 12 eram de afetados, incluindo um indivíduo afetado por PA unilateral mista devida a perfuração timpânica, o que caracteriza um fenótipo clínico distinto (II:11) e dois normouvintes. A perda auditiva era sensorioneural e bilateral, exceto no indivíduo II:1. Dividimos as audiometrias em duas figuras baseadas na idade no momento do exame, 19 a 37 anos (Figura 9a) e 55 a 87 anos (Figura 9b). A idade de manifestação variou de 12 anos (IV:4) a 60 anos (II:7). Nos 12 indivíduos afetados com fenótipo semelhante, no início da manifestação a PA afetava principalmente altas frequências, com a configuração da audiometria descendente. A PA da probanda foi documentada como progressiva (vide audiogramas III:1 19 anos e III:1 32 anos) e se mostrou assimétrica, sendo profunda em altas frequências na orelha direita aos 32 anos. As demais audiometrias de três membros da família obtidas na quarta década de vida mostraram uma perda auditiva leve, enquanto as outras sete audiometrias de três membros da família entre 55 e 65 anos apresentaram perda auditiva moderada. Portanto o fenótipo da probanda foi mais severo em comparação com seus primos da mesma idade e parece haver progressão da perda nos demais afetados também. Levantamento da história clínica revelaram que a probanda teve febre reumática aos 18 anos, cerca de um ano antes de perceber a perda auditiva. Os outros indivíduos afetados da família não relataram nenhuma doença antes do início da perda auditiva. A perda auditiva mais grave de todas pode ser observada no indivíduo afetado mais velho com 87 anos, que apresentava perda severa de baixa a médias frequências e profunda em altas frequências.

A paciente II:11 sofreu uma perfuração timpânica durante a infância, em decorrência de uma infecção das amígdalas. Uma tonsilectomia foi realizada aos 12 anos e aos 16 uma timpanoplastia. Desde então ela apresentou infecções de orelha recorrentes que resultaram em perda auditiva mista unilateral (Figura 9c). Portanto, a perda auditiva nesta paciente foi considerada como fenocópia, ou seja, com causa distinta.

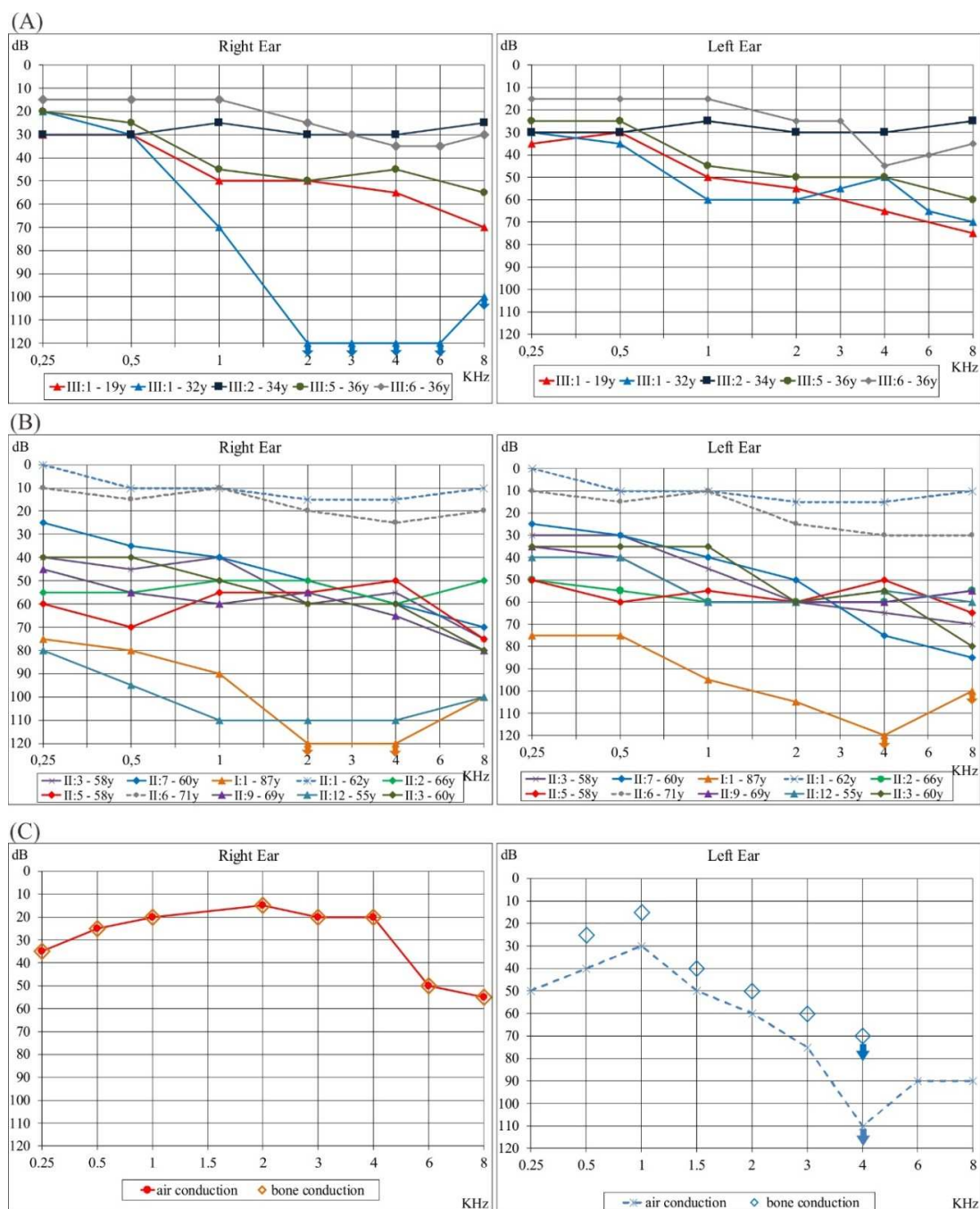


Figura 9: Audiometrias dos indivíduos do caso familiar 3: (A) Idades dos indivíduos no momento do exame entre 19 anos e 37 anos; (B) Idades dos indivíduos no momento do exame entre 55 e 87 anos, os normouvientes são representados em linhas pontilhadas. (C) Indivíduo II:11 apresenta PA unilateral mista uma devido a perfuração timpânica.

5.3.1 Estudo molecular

Foram coletadas amostras de sangue para extração de DNA de 17 pacientes (Figura 10a). Realizamos o sequenciamento de nova geração do exoma da probanda (III:1). Identificamos quatro variantes em três genes diferentes que já foram associados à surdez: a variante *nonsense* em heterozigose c.2717C>A (p.S906*, NM_004999) no exon 26 do gene *MYO6* (DFNA22/DFNB37); a variante *missense* em heterozigose c.124C>T (p.R42C,

NM_024009) no exon 2 do gene *GJB3* (DFNA2B) (Figura 10b); e duas variantes no gene *OTOA* (DFNB22), uma *nonsense* [c.2401G>T, p.E801*, rs200988634, NM_144672] e uma *missense* [c.2395A>C, p.T799P, rs464696, NM_144672], ambas no exon 21. Outras três variantes em genes já descritos associados à surdez foram identificadas (*OTOF*: c.4463A>T, *CDH23*: c.676A>C, *SYNE4*: c.799C>T). Porém o padrão de herança descrito para ambos os genes é o autossômico recessivo, ou seja, não compatível com o apresentado pela família e não identificamos uma segunda mutação em nenhum dos genes.

Com relação ao gene *OTOA*, a variante p.T799P foi considerada polimorfismo, neutra e/ou tolerável pelas ferramentas preditoras de patogenicidade (Tabela IX) e benigna pelo *Deafness Variation Database*, já a alteração p.E801* foi considerada como causadora de doença pelo MutationTaster uma vez que é uma mutação *nonsense*, mas foi considerada benigna pelo *Deafness Variation Database*. Além disso, ambas mutações no gene *OTOA* foram encontradas no banco de dados ABraOM da população brasileira com uma frequência de cerca de 2-3%, bem como no banco de dados do ExAC [p.T799P – 0.17% e p.E801* - 0.12%]. Outro fator importante foi a análise de segregação que descartou o gene *OTOA* como o gene causador, uma vez que as mutações no gene *OTOA* causam surdez autossômica recessiva e a probanda, seu pai, sua mãe, sua avó paterna e um indivíduo de controle com audição normal têm ambas as variantes, indicando que a variante está em *cis*.

Ambas as mutações encontradas nos genes *GJB3* e *MYO6* não foram relatadas até o momento nos bancos de dados *Deafness Variation Database*, ExAC, 1000G ou ABraOM.

Tabela IX: Com genes identificados no sequenciamento do exoma da probanda, com score de patogenicidade e MAF

Gene	Mutação	Proteína	SIFT/ Polyphen-2/ Mutation Taster/ Provean	Patogenicidade de acordo com o <i>Deafness Variation Database</i>	MAF (Menor frequência alélica)	ABraOM	dbSNP ID
<i>OTOA</i>	c.2401G>T	p.E801*	-----/ -----/ causadora de doença (1)/ -----	-----	< 0.01	0.027094	rs200988634
<i>OTOA</i>	c.2395A>C	p.T799P	Tolerante (1.000)/ Benigna (0.000)/ polimorfismo (0.9947)/ Neutra (2.17)	Neutra	0.01	0.025452	rs464696
<i>GJB3</i>	c.124C>T	p.R42C	Deletéria (0.009)/ Provavelmente deletéria (0.999)/causadora de doença (0.0479)/ Deletéria (-5.01)	-----	Variante não descrita anteriormente	-----	Variante não descrita anteriormente
<i>MYO6</i>	c.2717C>A	p.S906*	-----/ -----/ causadora de doença (1)/ -----	-----	Variante não descrita anteriormente	-----	Variante não descrita anteriormente

A mutação no gene *MYO6* (p.S906*) foi predita como patogênica por todas as ferramentas de bioinformática (MutationTaster, VEP) assim como a mutação no gene *GJB3* p.R42C (MutationTaster, Sift, PolyPhen2, Provean). A variante encontrada no gene *MYO6*

altera um nucleotídeo altamente conservado em espécies de vertebrados, indicado por ambos os *scores* PhyloP=5.718, que varia de -14 a +6 e os resultados positivos indicam conservação, e PhastCons=1, que reflete a probabilidade de cada nucleotídeo pertencer a um elemento conservado baseado no alinhamento múltiplo de seqüências genômicas de 46 espécies diferentes. O PhyloP só analisa aquele nucleotídeo mutado, o PhastCons leva em conta as posições flaqueadoras também. Já a variante no gene *GJB3* altera um nucleotídeo que também é conservado, mas com *scores* de conservação mais fracos (PhyloP=0.692 e PhastCons=0.977). A mutação p.R42C também é predita como deletéria e/ou causadora de doença pelas ferramentas preditoras da estrutura da proteína: SNPs3D *score* de -0.2; PhD-SNP *score* 8; aumenta a hidrofobicidade da proteína de 0.047778 para 0.073704, calculado por SOSUI.

Nós confirmamos que a mutação no gene *MYO6* (p.S906*) segrega com a surdez na família (os afetados herdaram e os normouvintes não herdaram), como pode ser observado na figura 9. Enquanto que a mutação no gene *GJB3* foi confirmada em heterozigose na probanda (figura 9) e na sua mãe normouvinte, mas não foi detectada em nenhum outro membro afetado ou normouvinte da família.

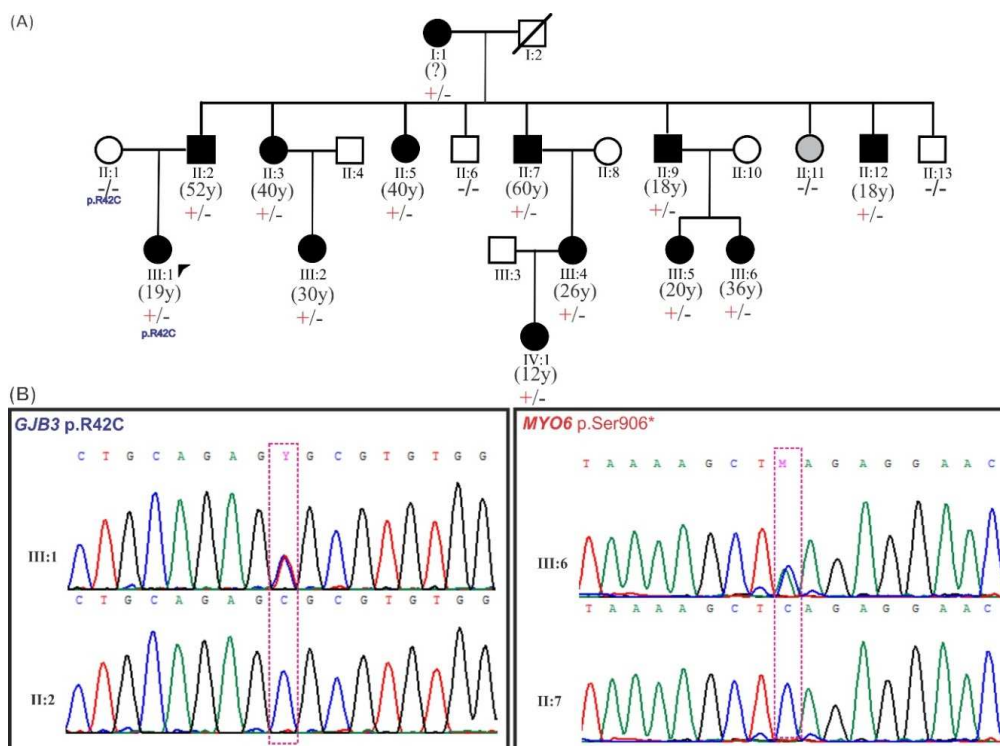


Figura 10: (A) Heredograma do caso familiar 3. Os sinais de positivo e negativo indicam a presença e ausência da alteração c.2717C>A (p.S906*) encontrada no gene *MYO6*, respectivamente. A mutação c.124C>T (p.R42C) abaixo dos símbolos da probanda e de sua mãe indicam que ambas são heterozigotas para ela. (B) Eletroferograma dos exons 2 e 26 dos genes *GJB3* e *MYO6*, respectivamente, com a mutação e sem a mutação.

5.4 RESUMO DOS CASOS FAMILIAIS ESTUDADOS

Tabela X: Resumo do quadro clínico e dos resultados alcançados com os casos familiares de PA estudados.

Casos Familiais	Nº total de indivíduos	Normou vintes	Nº de indivíduos afetados	Idade de manifestação	Tipo de surdez	Grau	Padrão de Herança	Gene
1) Goiânia -GO	8	3	1	?	PA mista	OE: moderado, OD: leve	?	?
			4	De 5 a 30 anos	PANS, pós-lingual, progressiva	Leve a moderado	AD	<i>MCM6?</i>
2) Curitiba -PR	12	8	1	?	PANS bilateral leve em altas frequências	Leve	?	?
			3	De 20 a 30 anos	PANS pós-lingual e progressiva	Profundo	AR	<i>TMPRSS3</i>
3) Belo Horizonte -MG	17	3	1	?	PA unilateral mista: perfuração timpânica	OE: moderado a profundo	?	?
			13	De 10 a 60 anos	PANS pós-lingual	Leve a profundo	AD	<i>MYO6</i>

Legenda: AD: Autossômico dominante. AR: Autossômico recessivo. OD: Orelha Direita. OE: Orelha Esquerda

6. DISCUSSÃO

Em dois casos familiares identificamos a causa genética da surdez: no caso 2, duas mutações já conhecidas em um gene previamente associado à surdez; no caso 3 uma nova mutação em um gene previamente associado à surdez. O caso 1 em que não detectamos mutações em genes já conhecidos ilustra que ainda há genes de PA a serem descobertos. Portanto o estudo desses casos familiares sem dúvida é promissor para revelar novos genes e vias biológicas importantes para a audição, mas a trajetória até a comprovação de que o gene de fato causa surdez, quando mutado, costuma ser longa e cheia de obstáculos e armadilhas. Além disso, há uma limitação do NGS do exoma, pois ele irá cobrir as regiões de código ou sítios de *splicing* situadas nas regiões exon-intron, portanto não detectará alterações que estejam fora dos exons, por exemplo, em regiões regulatórias. Um exemplo disso foi um estudo realizado por Melo *et al.*, 2015 com indivíduos portadores da síndrome de SPOAN. Os pesquisadores não encontraram nenhuma variante nas regiões codificadoras por meio do sequenciamento completo do genoma, mas observaram uma deleção de 216pb (Pares de Base) na região não codificadora em homozigose no gene *KLC2*. Essa deleção gerou a superexpressão do gene e sobrepôs em 9pb a 5' – não traduzida do maior transcrito do gene *KLC2*, o que significa que esta mutação está localizada na região promotora e pode ter causado a infrarregulação (*downregulation*) do gene, em vez do ganho de função. Eles

também observaram que embora a região possua características de um promotor, os fatores complexos de transcrição que se ligam a região podem inibir a transcrição, o que explicaria a suprarregulação (*upregulation*) do gene. Além disso, os autores observaram que a deleção do gene *KLC2* sobrepõe um RNA longo não-codificador, antissenso e que não sofre processamento de *splicing*. A sobreposição nesta região reguladora e não-codificante pode alterar o nível de expressão dos genes *downstream*, o que explicaria o ganho de função do gene. Os autores surpreenderam-se com os resultados encontrados e descreveram uma variante recessiva nunca antes relatada em uma região não-codificante. Embora o mecanismo de regulação observado no estudo ainda não esteja bem descrito, os autores ressaltam a importância das regiões não-codificantes quanto às patologias humana.

Observamos heterogeneidade etiológica da PA nas três famílias, pois em cada uma, um indivíduo apresentou quadro clínico distinto de causa diferente (fenocópias) em relação aos seus parentes em primeiro grau. Essa heterogeneidade sem dúvida é um dos obstáculos. A alta prevalência da perda auditiva na idade adulta constitui também um dos fatores que geram essas fenocópias. Além disso, também torna mais complexa a classificação das variantes como polimórficas ou raras, patogênicas ou benignas.

6.1 CASO FAMILIAL 1

Identificamos uma variante (c.1082A>G) no gene *MCM6* que segrega com a surdez na família. As ferramentas de predição de patogenicidade são contraditórias, mas como o próprio nome diz são previsões e, portanto, podem estar equivocadas. A frequência dessa variante na população da Finlândia chega a 2%, considerada um pouco alta para uma variante patogênica, embora represente um desafio definir o limiar para considerar uma variante muito comum para ser considerada patogênica (KOBAYASHI *et al.*, 2017). No entanto, com algumas exceções, como mutações fundadoras, a raridade de uma variante é pré-requisito para patogenicidade (KOBAYASHI *et al.*, 2017). Pela recomendação do consenso conjunto da ACMG (*American College of Medical Genetics and Genomics*) e da AMP (*Association for Molecular Pathology*) para interpretação das variantes de sequência é estabelecido que uma frequência alélica maior do que a esperada para a doença deve ser considerada forte evidência para classificá-la como benigna (KOBAYASHI *et al.*, 2017). Baseado nas observações feitas no estudo de Kobayashi *et al.* (2017), as frequências alélicas globais do ExAC (0,04% para esta alteração) é maior do que a esperada para a maioria das doenças com padrão de herança mendeliano. Porém, se considerarmos que a prevalência de surdez na idade adulta (20-69 anos) de 14% em estudo realizado nos Estados Unidos entre 2011 a 2012 (HOFFMAN *et al.*,

2016), que metade desses casos se deve a etiologia genética e há entre 100 e 200 genes envolvidos nela, chegamos a uma frequência de 0,035% a 0,07% de cada gene na etiologia genética da surdez de manifestação na idade adulta. Portanto, a frequência da variante no ExAC, não seria alta o suficiente para admitirmos que ela é benigna. Além disso, os bancos populacionais modernos (por exemplo, ExAC) incluem indivíduos recrutados para estudos de doenças específicas, portanto, a probabilidade é alta de que variantes causadoras de doenças estejam presentes nesses bancos. Essa probabilidade é ainda maior para doenças de baixa penetrância, padrão de herança autossômico recessivo ou de manifestação tardia, como é o caso da PA nas famílias por nós estudadas (KOBAYASHI *et al.*, 2017). Portanto, só pela frequência na população não descartaríamos essa variante como causa de surdez com manifestação tardia.

O gene *MCM6* codifica a proteína Componente 6 do complexo de manutenção do Minicromossomo. Esta proteína faz parte de um complexo denominado MCM formado por proteínas com função de helicases (enzima que promove a abertura da fita de DNA para que ocorra a replicação). São importantes tanto para a replicação quanto para as forquilhas de replicação (YOU; MASAI, 2005) e promove a hidrólise de ATP (YOU *et al.*, 1999). As proteínas pertencentes ao grupo MCM são conservadas das células de leveduras à mamíferos, ou seja, as sequências proteicas apresentam grandes similaridades entre as diferentes espécies (YOU *et al.*, 1999). Os genes MCMs foram originalmente identificados em leveduras deficientes na manutenção dos minicromossomos e desde então tem se demonstrado os papéis que desempenham na progressão do ciclo celular e muitos são genes controladores da divisão celular. Acredita-se que os genes *MCMs* 2 a 7 são fatores de “licenciamento de DNA” que se ligam ao DNA após a mitose e permitem a replicação do mesmo antes de serem removidos durante a fase S. Harvey *et al.* (1996) identificou o gene *MCM6* humano. Esse gene é expresso em uma grande variedade de tecidos humanos adultos e fetais, inclusive na orelha. Também foi descrito como expresso na orelha interna de camundongos e *zebrafish* (Unigene). Mutações somáticas nesse gene já foram associadas a diversos tipos de câncer como câncer endometrial (CHANG *et al.* 2017) e câncer oral (CHEN *et al.*, 2017).

Mutação em outro gene MCM, o *MCM2*, já foi descrita como associada à perda auditiva autossômica dominante que segregava em uma família Chinesa (GAO *et al.*, 2015). Os produtos de *MCM6* e *MCM2* interagem entre si de acordo com a ferramenta STRING CONSORTIUM 2017 (<http://version10.string-db.org>) que descreve as redes de interação e é citada no site GeneCards (<http://www.genecards.org>). A mutação encontrada por Gao *et al.* (2015) não estava descrita nos bancos de dados de variantes na população normal, não foi

detectada em 76 pacientes esporádicos de perda auditiva e nem em 145 controles normais. Eles confirmaram a expressão da proteína MCM2 na cóclea de ratos e guinea pigs por meio de *western blotting* e imunofluorescência, inclusive no citoplasma das células ciliadas terminalmente diferenciadas. Os autores realizaram experimentos para expressão transiente, em linhagem celular HEK293 do cDNA do *MCM2* contendo a mesma variante da família e encontraram que estas células mostraram ligeiro aumento da apoptose sem que isso viesse acompanhado de alterações na proliferação ou ciclo celular. Esses dados fornecem evidências de que essa mutação no gene *MCM2* é de fato patogênica.

Portanto, esses dados fornecem evidências adicionais de que o *MCM6* pode estar associado à perda auditiva autossômica dominante, já que o *MCM2* foi descrito como associado a PA em uma família chinesa e os produtos desses genes interagem entre si. Sem dúvida, a análise de ligação e o sequenciamento do exoma são apenas os primeiros passos fundamentais na descoberta de um novo gene importante a audição. No entanto, estudos funcionais são necessários para avaliar o papel do gene *MCM6* na perda auditiva.

6.2 CASO FAMILIAL 2

O sequenciamento do exoma revelou duas mutações em heterozigose composta no gene *TMPRSS3*, uma no exon 9 (c.916G>A/p.A306T) e outra no exon 12 (c.1276G>A/p.A426T). Ambas as alterações levam a troca de uma alanina por uma treonina e já foram descritas como patogênicas.

O gene *TMPRSS3* codifica uma proteína denominada Serina Protease Transmembrana II, cuja estrutura é composta por um domínio transmembrana N-terminal, um domínio de receptor A de lipoproteínas de baixa densidade (LDL), que se liga cálcio e LDL; um domínio rico em cisteína envolvido nas interações proteína-proteína e um domínio de serina protease C-terminal da família S1, do clã SA de peptidases do tipo serina (OMIM, #605511). Na orelha de murinos o gene *TMPRSS3* é expresso no gânglio espiral, nas células de suporte do órgão de Corti e na estria vascular (GUIPPONI *et al.*, 2002). A possível função do gene está associada com absorção de sódio, presente na orelha interna, realizada por canal de sódio sensível a amilorida (ENaC), cuja regulação é feita por proteases do tipo serina que ativam canais ligados à membrana, como é o caso da proteína codificada pelo gene *TMPRSS3* (OMIM, #605511). Guipponi *et al.* (2002) propuseram em seu estudo que as sinalizações na orelha interna podem ser controladas por clivagem proteolítica, incluindo a ativação autocatalítica de *TMPRSS3*, e que a ENaC pode ser um substrato de *TMPRSS3* na orelha interna.

A primeira descrição da mutação c.916G>A (p.A306T) foi realizada por Elbracht *et al.* (2007) ao estudar uma família de origem alemã composta por quatro indivíduos afetados por PA pós-lingual, com padrão de herança autossômico recessivo, e seis normouvintes. O início da PA foi relatado como ao redor dos seis anos para todos os afetados e progressão da surdez por cerca de 20 anos. Como o gene *TMPRSS3* já havia sido previamente descrito como responsável por surdez pós-lingual autossômica recessiva, eles decidiram realizar análise de três marcadores do tipo microssatélite altamente polimórficos próximos a esse gene para a construção dos haplótipos e os resultados foram consistentes com ligação da surdez a região cromossômica onde o *TMPRSS3* estava localizado. Por meio de sequenciamento direto duas mutações em heterozigose composta foram identificadas: uma mutação no exon 8 (c.646C>T) e outra no exon 9 (c.916G>A). Ambas as mutações do tipo *missense* alteram aminoácidos altamente conservados evolutivamente. A alteração c.916G>A não foi encontrada em 200 cromossomos controles de origem alemã. Os autores sugeriram que o gene *TMPRSS3* seria o melhor candidato em casos autossômicos recessivos pós-linguais, principalmente em casos em que não há consanguinidade. De fato, é o que observamos no caso familiar 2, cujos pais dos afetados não eram consanguíneos e a PA foi pós-lingual de herança autossômica recessiva. Além dessa família alemã, esta mutação foi identificada associada a PA em famílias da Holanda, China e Coreia (LEE *et al.*, 2013; CHUNG *et al.*, 2014; WEEGERINK *et al.*, 2011; GAO *et al.*, 2017). A análise de haplótipos nas famílias Coreanas indica efeito fundador da mutação (CHUNG *et al.*, 2014). Segundo Gao *et al.* (2017) esta mutação reside num domínio catalítico serina protease altamente conservado e provavelmente perturba a função proteolítica da *TMPRSS3*, o que pode ser a explicação o mecanismo molecular etiológico da surdez neste caso.

A outra mutação identificada no exon 12 (p.A426T) foi descrita como possivelmente patogênica por alguns estudos. No estudo realizado por Lee *et al.* (2003), os pesquisadores determinaram que esta mutação do tipo *missense* estava afetando a atividade proteolítica da *TMPRSS3* utilizando um ensaio de protease baseado em leveduras, com o qual puderam monitorar a proteólise a partir do crescimento das leveduras. Eles fizeram um substrato para a clivagem com protease que só ocorreu com co-expressão da proteína *TMPRSS3* selvagem sem a mutação. Esta mutação no potencial sítio de ativação da clivagem diminuiu consideravelmente a atividade proteolítica, e as mutações no resíduo da tríade catalítica da serina (sítio ativo das serino proteases formado por três aminoácidos, nesse caso serina, histidina e aspartato), aboliram completamente a atividade proteolítica. Os dados obtidos indicam que a patogênese desta mutação está fortemente correlacionada com o defeito na

atividade proteolítica da Tmprss3. Adicionalmente eles examinaram duas alterações descritas anteriormente como polimorfismos p.D173N e p.A426T por Wattenhofer *et al.* (2002) em virtude da frequência nas populações australiana (0,8%) e espanhola (0,5%), respectivamente. Porém, não havia tampouco evidências suficientes para classificá-las como não patogênicas. Os resultados do estudo de Lee *et al.* (2003) mostraram que a mutação p.D173N possui atividade proteolítica normal, enquanto a mutação p.A426T apresentava diminuição significativa dessa atividade. Isso sugeria que a mutação p.D173N é polimorfismo não patogênico, enquanto a mutação p.A426T pode ser patogênica em certas circunstâncias. De fato, em um estudo realizado por Weegerink *et al.* (2011) em oito famílias holandesas, a mutação p.A426T foi considerada patogênica, pois estava em heterozigose composta, em indivíduos afetados, com outras mutações já comprovadamente patogênicas. Após análises de ligação e das sequências os autores identificaram quatro variantes *missense* (p.A306T, p.A138E, p.V199M e p.A426T) e duas *frameshift* (p.T70fs e p.C107fs*) nas oito famílias. Eles compararam o efeito clínico das mutações entre as famílias e sugeriram que a mutação p.A426T quando comparada com a mutação p.A306T tem um efeito deletério menor. No entanto, os autores sugerem que a heterozigose composta de uma mutação leve associada a uma mutação grave pode levar a perda auditiva pós-lingual, compatível com o período de ocorrência da deficiência observada em nossa família.

6.3 CASO FAMILIAL 3

O sequenciamento do exoma da probanda revelou duas mutações potencialmente patogênicas em dois genes de surdez diferentes, *MYO6* e o *GJB3*. A mutação, do tipo sem sentido (*nonsense*), no gene *MYO6* segrega com a surdez da família. Portanto essa mutação patogênica explica o quadro clínico de surdez encontrado na família. Enquanto a mutação do tipo sentido trocado (*missense*) no gene *GJB3* foi encontrada apenas na probanda afetada e na sua mãe normouvinte. Ambas as variantes estão em regiões conservadas conforme as ferramentas PhyloP e PhastCons, apesar da variante no gene *MYO6* possuir valores muito mais altos. Mutações nos genes *GJB3* e *MYO6* já foram descritas segregando em famílias com surdez com padrão de herança tanto autossômico dominante quanto autossômico recessivo. Mutações no gene *MYO6* também foram associadas com cardiomiopatia hipertrófica hereditária (MOHIDDIN *et al.*, 2004; HEGAN *et al.*, 2015) enquanto que as mutações no gene *GJB3* possuem associação com uma doença de pele conhecida como *Erythrokeratoderma variabilis* (RICHARD *et al.*, 1998). Outro relato da probanda foi febre reumática aos 18 anos, aproximadamente um ano antes de perceber a PA. Até o momento não

houve relato de associação entre febre reumática e perda auditiva (SCHUBERT *et al.*, 2001).

O gene *MYO6* possui 35 exons (NM_004999) com 40 mutações patogênicas descritas até o momento; ele codifica a proteína miosina VI com 1285 amino ácidos. Constitui uma proteína essencial para o desenvolvimento estrutural, integridade e funcionamento apropriado das células ciliadas internas, movimento e transporte de cargas em direção à extremidade negativa dos filamentos de actina (WELLS *et al.*, 1999; SWEENEY; HOUDUSSE, 2007). A Miosina VI localiza-se na placa cuticular das células ciliadas e é importante para fornecer proteção ao restringir forças mecânicas (AVRAHAM *et al.*, 1995; HASSON *et al.*, 1997; SELF *et al.*, 1999). A proteína consiste em um domínio motor e um sítio de ligação a actina, seguido pelos domínios cauda globular e domínio pescoço, que interage com outras proteínas (SWEENEY; HOUDUSSE, 2007). Uma hipótese que explica a correlação de genótipo/fenótipo quanto a mutações dominantes *versus* recessivas no gene *MYO6* foi proposta por Topsakal *et al.* (2009). Se o domínio motor da proteína não é afetado e funcionar normalmente, a PA é mais leve e a idade de manifestação será tardia. De fato, a mutação no gene *MYO6* aqui descrita afeta apenas o domínio *neck*, mantendo o domínio motor intacto. Nossa família se assemelha com as famílias DAN e BEL2 analisadas por Topsakal *et al.* (2009) e com as famílias descritas por Yang *et al.* (2013), onde as mutações que levam a códons de parada prematuros após o domínio motor causam PA autossômico dominante com manifestação tardia. Além disso, é previsto que a mutação por nós descrita (MutationTaster) deve acarretar a degradação por NMD do mRNA do alelo mutado, parcialmente ou total, resultando em menos proteínas nos indivíduos afetados e perda auditiva.

O gene *GJB3* codifica a proteína conexina 31 (Cx31), também conhecida como proteína beta-3 de junção do tipo *gap*. Junções do tipo *gap* são grupos de canais intercelulares que permitem a difusão direta de íons e moléculas pequenas entre células adjacentes. Os canais de junção do tipo *gap* permitem a passagem de íons, de moléculas de sinalização celular e de pequenas moléculas com tamanho aproximado de 1.5 kDa (BENNETT *et al.*, 1991; HARRIS, 2001). A expressão do gene *GJB3* foi observada na parede lateral e limbo espiral da cóclea de camundongos (XIA *et al.*, 2000) Embora a mutação p.R42C encontrada na família 3 não tenha sido descrita, há uma mutação diferente descrita no mesmo aminoácido (p.R42P) que está associada com *Erythrokeratoderma variabilis*, uma doença de pele com herança autossômica dominante sem surdez (WILGOSS *et al.*, 1999; RICHARD *et al.*, 2000). A probanda e sua mãe normouvinte apresentam a mutação p.R42C, mas nenhuma delas possui esse problema de pele. O fato de a mãe normouvinte carregar esta variante indica que ela não é a causa principal da PA segregando na família, mas pode estar contribuindo para o

fenótipo como um gene modificador (RICHARDS *et al.*, 2015). De fato, a probanda apresentou uma perda auditiva mais grave em uma idade mais jovem (32 anos) quando comparada aos outros indivíduos afetados da família. Há muitos exemplos de genes modificadores na literatura com ação em outras doenças (por exemplo: pancreatite, câncer de mama, doença de Gaucher, retinose pigmentar, hemocromatose hereditária, cardiomiopatia hipertrófica, degeneração lobar frontotemporal e polineuropatia amiloidótica familiar, doença de Alzheimer familiar de início tardio, entre outros), conforme a revisão realizada por Cooper *et al.* (2013). Portanto, como não há evidências suficientes para considerar essa variante como patogênica nem como benigna, de acordo com os Padrões e Diretrizes apresentados no trabalho de Richards *et al.* (2015) classificamos como variante de significado incerto.

7. CONCLUSÃO

Conseguimos identificar a causa da perda auditiva em dois dos três casos familiares (2 e 3) estudados. No caso 2, as mutações já haviam sido descritas, no caso 3 descrevemos uma mutação nova e, em ambos, pudemos contribuir para o melhor entendimento das relações genético-fenótipo. No caso familiar 1, um novo gene candidato a surdez foi identificado, porém estudos funcionais são necessários para confirmação e correlação genótipo-fenótipo.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABE, S.; USAMI, S.; SHINKAWA, H.; KELLEY, P. M.; KIMBERLING, W. J. Prevalent connexin 26 gene *GJB2* mutations in Japanese. **Journal of medical genetics**, London, v. 37, n. 1, p. 41-43, 2000.
- ABREU-SILVA, R. S.; LEZIROVITZ, K.; BRAGA, M. C. C.; SPINELLI, M.; PIRANA, S.; DELLA-ROSA, V. A.; OTTO, P. A.; MIGRONI-NETTO, R. C. Prevalence of the A1555G (*12S rRNA*) and tRNASer(UCN) mitochondrial mutations in hearing-impaired Brazilian patients. **Brazilian journal of medical and biological research**, São Paulo, v. 39, n. 2, p. 219-226, 2006.
- AVRAHAM, K. B.; HASSON, T.; STEEL, K. P.; KINGSLEY, D. M.; RUSSELL, L. B.; MOOSEKER, M. S.; COPELAND, N. G.; JENKINS, N. A. The mouse Snell's waltzer deafness gene encodes an unconventional myosin required for structural integrity of inner ear hair cells. **Nature Genetics**, New York, v. 11, p. 369-375, 1995.
- BATISSOCO, A. C.; ABREU-SILVA, R. S.; BRAGA, M. C.; LEZIROVITZ, K.; DELLA-ROSA, V.; TABITH-JR, A.; OTTO, P.; MINGRONI-NETTO, R. C. Prevalence of *GJB2* (connexin-26) and *GJB6* (connexin-30) mutations in a cohort of 300 Brazilian hearing-impaired individuals: implications for diagnosis and genetic counseling. **Ear and Hearing**, Philadelphia, v.30, n. 1, 1-7, 2009.
- BENNETT, M. V.; BARRIO, L. C.; BARGIELLO, T. A.; SPRAY, D. C.; HERTZBERG, E.; SÁEZ, J. C. Gap junctions: New tools, new answers, new questions. **NEURON**, Cambridge, v. 6, p. 305-320, 1991.
- BOTSTEIN, D.; RISCH, N. Discovering genotypes underlying human phenotypes: past successes for mendelian disease, future approaches for complex disease. **Nature Genetics**, New York, 33 Suppl:228-37, 2003.
- BRAGA, M. C. C.; OTTO, P. A.; SPINELLI, M. Recurrence Risks in cases of Nonsyndromic Deafness. **Brazilian Journal of Dysmorphology and Speech-ear Diseases**, v. 2, p.33-40, 1999.
- BROBBY, G. W.; MULLER-MYHSOK, B.; HORSTMANN, R. D. Connexin 26 R143W mutation associated with recessive nonsyndromic sensorineural deafness in Africa. **New England Journal of Medicine**, Boston, v. 338, n. 8, p. 548-50, 1998.
- CAMPBELL, D. A.; MCHALE, D. P.; BROWN, K. A.; MOYNIHAN, L. M.; HOUSEMAN, M.; KARBANI, G.; PARRY, G.; JANJUA, A. H.; NEWTON, V.; AL-GAZALI, L.; MARKHAM, A. F.; LENCH, N. J.; MUELLER, R.F. A new locus for non-syndromal, autosomal recessive, sensorineural hearing loss (DFNB16) maps to human chromosome 15q21-q22. **Journal of Medical Genetics**, London, v. 34, n. 12, p. 1015-7, 1997.
- CHANG, Y.S.; HUANG, H.D.; YEH, K.T.; CHANG J.G. Identification of novel mutations in endometrial cancer patients by whole-exome sequencing. **International Journal of Oncology**, Athens, v. 50, n. 5, p. 1778-1784, 2017.

CHEN, L.; YANG, J.; XING, Z.; YUAN, F.; SHU, Y.; ZHANG, Y.; KONG, X.; HUANG, T.; LI, H.; CAI, Y.D. An integrated method for the identification of novel genes related to oral cancer. **Public Library of Science one**, San Francisco, v. 12, n. 4, p. e0175185, 2017.

CHUNG J.; PARK S. M.; CHANG S. O.; CHUNG, T.; LEE K.Y.; KIM, A.R.; PARK, J.H.; KIM, V.; PARK, W.Y.; OH S.H; KIM, D.; PARK, W.J; CHOI, B.Y. A novel mutation of *TMPRSS3* related to milder auditory phenotype in Korean postlingual deafness: a possible future implication for a personalized auditory rehabilitation. **Journal of Molecular Medicine**, Berlin, v. 92, n. 6, p.651–663, 2014.

COHN, E. S.; KELLEY, P. M.; FOWLER, T. W.; GORGA, M. P.; LEFKOWITZ, D. M.; KUEHN, H. J.; SCHAEFER, G. B.; GOBAR, L. S.; HAHN, F. J.; HARRIS, D. J.; KIMBERLING, W. J. Clinical studies of families with hearing loss attributable to mutations in the connexin 26 gene (*GJB2/DFNB1*). **Pediatrics**, Springfield, v. 103, p. 546–550, 1999.

COHN, E. S.; KELLEY, P. M. Clinical phenotype and mutations in Connexin26 (*DFNB1/GJB2*), the most common cause of childhood hearing loss. **American Journal of Medical Genetics**, Hoboken, v. 89, p. 130–136, 1999.

COMMON, J. E. A.; BITNER-GLINDZICZ, M.; O'TOOLE, E. A.; BARNES, M. R.; JENKINS, L.; FORGES, A.; KELSELL, D. P. Specific loss of connexin 26 expression in ductal sweat gland epithelium associated with the deletion mutation *del(GJB6-D13S1830)*. **Clinical and Experimental Dermatology**, Oxford, v. 30, 688-693, 2005.

COOPER, D. N.; KRAWCZAK, M.; POLYCHRONAKOS, C.; TYLER-SMITH, C.; KEHRER-SAWATZKI, H. Where genotype is not predictive of phenotype: towards an understanding of the molecular basis of reduced penetrance in human inherited disease. **Human genetics**, Berlin, v. 132, p. 1077–1130, 2013.

CORDES, S.; FRIEDMAN, N. Genetic Hearing Loss.UTMB – **The University of Texas Medical Branch, Department of Otolaryngology**. Disponível em: <<http://www.utmb.edu/otoref/Grnds/Genetic-HL-0004/Genetic-HL-pic-m-0004.pdf>>. Acessado em: 22 de setembro de 2014.

DAVIS, H.; SILVERMAN, R.S. **Hearing and deafness**. 3ª ed. New York: Holt, Rinehart & Wilson: p.253-79, 1970.

DE KOK, Y. J.; VAN DER MAAREL, S. M.; BITNER-GLINDZICZ, M.; HUBER, I.; MONACO, A. P.; MALCOLM, S.; PEMBREY, M. E.; ROPERS, H. H.; CREMERS, F.P. Association between X-linked mixed deafness and mutations in the POU domain gene *POU3F4*. **Science**, Washington, v. 267, n. 5198, p. 685-8, 1995.

DEL CASTILLO, I.; VILLAMAR, M.; MORENO-PELAYO, M.A.; CASTILLO, F. J. D.; ALVAREZ, A.; TELLERIA, D.; MENENDEZ, I.; MORENO, F.A deletion involving the connexin 30 gene in nonsyndromic hearing impairment. **New England Journal of Medicine**, Boston, v. 346, n. 4, p. 243-249, 2002.

DEL CASTILLO, F. J.; RODRÍGUEZ-BALLESTEROS, M.; ALVAREZ, A.; HUTCHIN, T.; LEONARDI, E.; OLIVEIRA, C. A.; AZAIEZ, H.; BROWNSTEIN, Z.; AVENARIUS, M. R.; MARLIN, S.; PANDYA, A.; SHAHIN, H.; SIEMERING, K. R.; WEIL, D.; WUYS, W.;

AGUIRRE, L. A.; MARTÍN, Y.; MORENO-PELAYO, M. A.; VILAMAR, M.; ABRAHAM, K. B.; DAHL, H. H. M.; KANAAN, M.; NANCE, W. E.; PETIT, C.; SMITH, R. J. H.; VAN CAMP, G.; SARTORATO, E. L.; MURGIA, A.; MORENO, F.; DEL CASTILLO, I. A novel deletion involving the connexin-30 gene, del(*GJB6-D13S1854*), found in trans with mutations in the *GJB2* gene (connexin-26) in subjects with DFNB1 non-syndromic hearing impairment. **Journal of Medical Genetics**, London, v. 42, p. 588-594, 2005.

DENOYELLE, F.; MARLIN, S.; WEIL, D.; MOATTI, L.; CHAUVIN, P.; GARABÉDIAN, E. N.; PETIT, C. Clinical features of the prevalent form of childhood deafness, DFNB1, due to a connexin-26 gene defect: implications for genetic counseling. **The Lancet**, London, v. 353, p. 1298–1303, 1999.

DIAZ-HORTA, O.; SUBASIOGLU-UZAK, A.; GRATI, M.; DESMIDT, A.; FOSTER II, J.; CAO, L.; BADEMCI, G.; TOKGOZ-YILMAZ, S.; DUMAN, D.; CENGIZ, F. B.; ABAD, C.; MITTAL, R.; BLANTON, S.; LIU, X. Z.; FAROOQ, A.; WALZ, K.; LU, Z.; TEKINA, M. *FAM65B* is a membrane-associated protein of hair cell stereocilia required for hearing. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 111, n. 27, p. 9864–9868, 2014.

DICIONÁRIO MICHAELIS. **Editora Melhoramento Ltda – Uol**, 2009. Disponível em: <<http://michaelis.uol.com.br/moderno/portugues/index.php?lingua=portugues-portugues&palavra=s%EDndrome>>. Acesso em: 25 de outubro de 2015.

ELBRACHT, M.; SENDEREK, J.; EGGERMANN, T.; THÜRMER, C.; PARK, J.; WESTHOFEN, M.; ZERRES, K. Autosomal recessive postlingual hearing loss (DFNB8): compound heterozygosity for two novel *TMPRSS3* mutations in German siblings. **Journal of Medical Genetics**, London, v. 44, n. 6, e81, 2007.

ESTIVILL, X.; GOVEA, N.; BARCELO, E.; BADENAS, C.; ROMERO, E.; MORAL, L.; SCOZZRI, R.; D'URBANO, L.; ZEVIANI, M.; TORRONI, A. Familial progressive sensorineural deafness is mainly due to the mtDNA *A1555G* mutation and is enhanced by treatment with aminoglycosides. **The American Journal of Human Genetics**, Baltimore, v. 62, p. 27-35, 1998.

FRIEDMAN, T. B.; GRIFFITH, A. J. Human nonsyndromic sensorineural deafness. **Annual review of genomics and human genetics**, Palo Alto, v. 4, p. 341–402, 2003.

FORTNUM, H. M.; SUMMERFIELD, A. Q.; MARSHALL, D. H.; DAVIS, A. C.; BAMFORD, J. M. Prevalence of permanent childhood hearing impairment in the United Kingdom and implications for universal neonatal hearing screening: questionnaire based ascertainment study. **British Medical Association**, London, v. 323, n. 1–6, 2001.

GAO, J.; WANG, Q.; DONG, C.; CHEN, S.; QI, Y.; LIU, Y. Whole Exome Sequencing Identified *MCM2* as a Novel Causative Gene for Autosomal Dominant Nonsyndromic Deafness in a Chinese Family. **PLoS One**, San Francisco, v. 10, n. 7, p. e0133522, 2015.

GAO, X.; YUAN, Y. Y.; WANG, G. J.; XU, J. C.; SU, Y.; LIN, X.; DAI, P. Novel Mutations and Mutation Combinations of *TMPRSS3* Cause Various Phenotypes in One Chinese Family with Autosomal Recessive Hearing Impairment. **BioMed Research International**, New York, Epub 2017.

GASPARINI, P.; ESTIVILL, X.; VOLPINI, V.; TOTARO, A.; CASTELLVI-BEL, S.; GOVEA, N.; MILA, M.; DELLA MONICA, M.; VENTRUTO, V.; DE BENEDETTO, M.; STANZIALE, P.; ZELANTE, L.; MANSFIELD, E. S.; SANDKUIJL, L.; SURREY, S.; FORTINA, P. Linkage of DFNB1 to non-syndromic neurosensory autosomal-recessive deafness in Mediterranean families. **European Journal of Human Genetics**, Basel, 5(2):83-8, 1997.

GORLIN, R.; TORIELLO, H.; COHEN, M. **Hereditary Hearing Loss and its Syndromes**. New York, Oxford University Press, 1995.

GILISSEN, C.; HOISCHEN, A.; BRUNNER, H. G.; VELTMAN, J. A. Disease gene identification strategies for exome sequencing. **European Journal of Human Genetics**, Basel, v. 20, p. 490–497, 2012.

GUILFORD, P.; BEN-ARAB, S.; BLANCHARD, S.; LEVILLIERS, J.; WEISSENBACH, J.; BELKAHIA, A.; PETIT, C. A non-syndrome form of neurosensory, recessive deafness maps to the pericentromeric region of chromosome 13q. **Nature Genetics**, New York, v. 6, p. 24–28, 1994.

GUIPPONI, M.; VUAGNIAUX, G.; WATTENHOFER, M.; SHIBUYA, K.; VAZQUEZ, M.; DOUGHERTY, L.; SCAMUFFA, N.; GUIDA, E.; OKUI, M.; ROSSIER, C.; HANCOCK, M.; BUCHET, K.; REYMOND, A.; HUMMLER, E.; MARZELLA, P.L.; KUDOH, J.; SHIMIZU, N.; SCOTT, H.S.; ANTONARAKIS, S. E.; ROSSIER, B. C. The transmembrane serine protease (TMPRSS3) mutated in deafness DFNB8/10 activates the epithelial sodium channel (ENaC) in vitro. **Human Molecular Genetics**, Oxford, v.11, n. 23, p. 2829-36.

HALL, T.A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. **Nucleic Acids Symposium Series**, Oxford, v. 41, p. 95-98, 1999.

HARRIS, A. L. Emerging issues of connexin channels: biophysics fills the gap. **Quarterly reviews of biophysics**, London, v. 34, p. 325-472, 2001.

HARVEY, C. B.; WANG, Y.; DARMOUL, D.; PHILLIPS, A.; MANTEI, N.; SWALLOW, D. M. Characterization of a human homologue of a yeast cell division cycle gene, *MCM6*, located adjacent to the 5-prime end of the lactase gene on chromosome 2q21. **Federation of European Biochemical Societies letters**, Amsterdam, v.398, n. 2-3, p. 135-140, 1996.

HASSON, T.; GILLESPIE, P. G.; GARCIA, J. A.; MACDONALD, R. B.; ZHAO, Y.; YEE, A. G.; MOOSEKER, M. S.; COREY, D. P. Unconventional myosins in inner-ear sensory epithelia. **The Journal of cell biology**, New York, v. 137, n. 6, p. 1287-1307, 1997.

HEGAN, P. S.; LANAHAN, A. A.; SIMONS, M.; MOOSEKER, M. S. Myosin VI and cardiomyopathy: left ventricular hypertrophy, fibrosis, and both cardiac and pulmonary vascular endothelial cell defects in the Snell's waltzer mouse. **Cytoskeleton (Hoboken)**, Hoboken, v. 72, n. 8, p. 373-387, 2015.

HILGERT, N.; SMITH, R. J. H.; VAN CAMP, G. Forty-six genes causing nonsyndromic

hearing impairment: which ones should be analyzed in DNA diagnostics?. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 681, n. 2-3, p. 189–196, 2009.

HOFFMAN, H.J.; DOBIE, R.A.; LOSONCZY, K.G.; THEMANN, C.L.; FLAMME, G.A. Declining Prevalence of Hearing Loss in US Adults Aged 20 to 69 Years. **Journal of the American Medical Association otolaryngology, head & neck surgery**, Chicago, v. 143, n. 3, p. 274-285, 2017.

KEATS, B. J. B.; BERLIN, C.I. Genomes and Hearing Impairment. **Genome Research**, New York, v. 9, n. 1, p. 7-16, 1999.

KELSELL, D. P.; DUNLOP, J.; STEVENS, H. P.; LENCH, N. J.; LIANG, J. N.; PARRY, G.; MUELLER, R. F.; LEIGH, I. M. Connexin 26 Mutations in Hereditary Non-syndromic sensorineural Desfness. **Nature**, New York, v. 387, n. 6628, p. 80-3, 1997.

KENT, W. J.; SUGNET, C.W.; FUREY, T.S.; ROSKIN, K.M.; PRINGLE, T. H.; ZAHLER, A. M.; HAUSSLER, D. The human genome browser at UCSC. **Genome research**, New York, v; 12, n. 6, p. 996-1006, 2002.

KIANG, D.T.; JIN, N.; TU, Z.J.; LIN, H.H. Upstream genomic sequence of the human connexin 26 gene. **Gene**, Oxford, v. 199, n. 1-2, p. 165-71, 1997.

KOBAYASHI, Y.; YANG, S.; NYKAMP, K.; GARCIA, J.; LINCOLN, S.E.; TOPPER, S.E. Pathogenic variant burden in the ExAC database: an empirical approach to evaluating population data for clinical variant interpretation. **Genome medicine**, London, v. 9, n. 1, p. 13, 2017.

LAFRAMBOISE, T. Single nucleotide polymorphism arrays: a decade of biological, computational and technological advances. **Nucleic Acids Research**, London, v. 37, n. 13, p. 4181–4193, 2009.

LEE, Y.; PARK, D.; KIM, S. Y.; PARK, W. J. Pathogenic mutations but not polymorphisms in congenital and childhood onset autosomal recessive deafness disrupt the proteolytic activity of TMPRSS3. **Journal of medical genetics**, London, v. 40, n. 8, p. 629-631, 2003

LERER, I.; SAGI, M.; MALAMUD, E.; LEVI, H.; RAAS-ROTHSCHILD, A.; ABELIOVICH, D. Contribution of connexin 26 mutations to nonsyndromic deafness in Ashkenazi patients and the variable phenotypic effect of the mutation 167delT. **The American Journal of Medical Genetics**, Hoboken v. 95, n. 1, p. 53-6, 2000.

LEZIROVITZ, K.; NICASTRO, F. S.; PARDONO, E.; ABREU-SILVA, R. S.; BATISSOCO, A. C.; NEUSTEIN, I.; SPINELLI, M.; MINGRONI-NETTO, R. C. Is autosomal recessive deafness associated with oculocutaneous albinism a "coincidence syndrome"? **Journal of Human Genetics**, New York, v. 51, n. 8, p. 716-20, 2006.

LEZIROVITZ, K.; PARDONO, E.; DE MELLO AURICCHIO, M. T.; DE CARVALHO E SILVA, F. L.; LOPES, J. J.; ABREU-SILVA, R. S.; ROMANOS, J.; BATISSOCO, A. C.; MINGRONI-NETTO, R. C. Unexpected genetic heterogeneity in a large consanguineous Brazilian pedigree presenting deafness. **European Journal of Human Genetics**, Hampshire, v. 16, n. 1, p. 89-96, 2008.

LEZIROVITZ, K.; BRAGA, M. C.; THIELE-AGUIAR, R. S.; AURICCHIO, M. T.; PEARSON, P. L.; OTTO, P. A.; MINGRONI-NETTO, R. C. A novel autosomal dominant deafness locus (DFNA58) maps to 2p12-p21. **Clinical Genetics**, Medford, v. 75, n. 5, p. 490-3, 2009.

LIU, X. Z.; XIA, X. J.; KE, X. M.; OUYANG, X. M.; DU, L. L.; LIU, Y. H.; ANGELI, S.; TELISCHI, F. F.; NANCE, W. E.; BALKANY, T.; XU, L. R. The prevalence of connexin 26 (*GJB2*) mutations in the Chinese population. **Human Genetics**, Berlin, v. 111, p. 394-397, 2002.

LIU, L.; LI, Y.; LI, S.; HU, N.; HE, Y.; PONG, R.; LIN, D.; LU, L.; LAW, M. Comparison of Next-Generation Sequencing Systems. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**, Ohio, v. 2012, Article ID 251364, p.11, 2012. Review Article.

MARZIANO, N. K.; CASALOTTI, S. O.; PORTELLI, A.E.; BECKER, D. L.; FORGE, A. Mutations in the Gene for Connexin 26 (*GJB2*) that cause hearing Loss a Dominant Negative Effect on Connexin 30. **Human Molecular Genetics**, Oxford, v. 12, n. 8, p. 805-812, 2003.

MAW, M. A.; AALLEN-POWELL, D. R.; GOODEY, R. J.; STEWART, I. A.; NANCARROW, D. J.; HAYWARD, N. K.; GARNER, R. J. M. The Contribution of the DFNB01 Locus to Neurosensory Deafness in a caucasian Population. **The American Journal of Human Genetics**, Baltimore, v. 57, p. 629-635, 1995.

MELO, U. S.; MACEDO-SOUZA, L. I.; FIGUEIREDO, T.; MUOTRI, A. R.; GLEESON, J. G.; COUX, G.; ARMAS, P.; CALCATERRA, N. B.; KITAJIMA, J. P.; AMORIM, S.; OLÁVIO, T. R.; GRIESI-OLIVEIRA, K.; COATTI, G. C.; ROCHA, C. R.; MARTINS-PINHEIRO, M.; MENCK, C. F.; ZAKI, M. S.; KOK, F.; ZATZ, M.; SANTOS, S. Overexpression of *KLC2* due to a homozygous deletion in the non-coding region causes SPOAN syndrome. **Human Molecular Genetics**, Oxford, v. 24, n. 24, p. 6877-6885, 2015

MOHIDDIN, S. A.; AHMED, Z. M.; GRIFFITH, A. J.; TRIPODI, D.; FRIEDMAN, T. B.; FANANAPAZIR, L.; MORELL, R. J. Novel association of hypertrophic cardiomyopathy, sensorineural deafness, and a mutation in unconventional myosin VI (*MYO6*). **Journal of medical genetics**, London, v. 41, n. 4, p. 309-314, 2004.

MOORTHIE, S.; MATTOCKS, C.; WRIGHT, C. F. Review of massively parallel DNA sequencing technologies. **Human Genome Organisation journal**, Dordrecht, v. 5, n. 1-4, p. 1-12, 2011.

MORTON, N. E. Genetic epidemiology of hearing impairment. **Annals of the New York Academy of Sciences**, New York, v. 630, n. 1, p. 16-31, 1991.

NHS - NATIONAL GENETICS AND GENOMICS EDUCATION CENTRE, 2015. Disponível em: < <http://www.geneticseducation.nhs.uk/laboratory-process-and-testing-techniques/next-generation-sequencing-ngs> > Acessado em: 16 de novembro de 2015.

NG, S. B.; BUCKINGHAM, K. J.; LEE, C.; BIGHAM, A. W.; TABOR, H. K.; DENT, K. M.; HUFF, C. D.; SHANNON, P. T.; JABS, E. W.; NICKERSON, D. A.; SHENDURE, J.; BAMSHAD, M. J. Exome sequencing identifies the cause of a mendelian disorder. **Nature**

Genetics, New York, v. 42, n. 1, p. 30-5, 2010.

OMIM™ - **ONLINE MENDELIAN INHERITANCE IN MAN™**. Johns Hopkins University, USA. World Wide Web, 2015. Disponível em: < <http://www.omim.org/>> Acessado em: 25 de outubro de 2015.

OITICICA, J.; BARBOZA-JUNIOR, L. C.; BATISSOCO, A. C.; LEZIROVITZ, K.; MINGRONI-NETTO, R. C.; HADDAD, L. A.; BENTO, R. F. Retention of progenitor cell phenotype in otospheres from guinea pig and mouse cochlea. **Journal of Translational Medicine**, Londono, v. 8, p. 119, 2010.

PETIT, C. Genes Responsible for Human Hereditary Deafness: Symphony of a Thousand. **Nature Genetics**, New York, v. 14, n. 4, p. 385-91, 1996. Review.

PETIT, C.; LEVILLIERS, J.; HARDELI, J. P. Molecular Genetics of Hearing Loss. **Annual Reviews of Genetics**, Palo Alto, v. 35, p. 589-646, 2001.

PREZANT, T. R.; AGAPIAN, J. V.; BOHLMAN, M. C.; BU, X.; OZTAS, S.; QIU, W-Q.; ARNOR, K. S.; CORTOPASSI, G. A.; JABER, L.; ROTTER, J. I.; SHOHAT, M.; FISCHER-GHODSIAN, N. Mitochondrial ribosomal RNA mutation associated with both antibiotic-induced and non-syndromic deafness. **Nature Genetics**, New York, v. 4, p. 289-294, 1993.

PUPO, A. C.; PIRANA, S.; SPINELLI, M.; LEZIROVITZ, K.; MINGRONI NETTO, R. C.; MACEDO, L. S. Study of a Brazilian family presenting non-syndromic hearing loss with mitochondrial inheritance. **Brazilian Journal of Otorhinolaryngology**, São Paulo, v. 74, n.5, p.786-9, 2008.

QING, J.; YAN, D.; ZHOU, Y.; LIU, Q.; WU, W.; XIAO, Z.; LIU, Y.; LIU, J.; DU, L.; XIE, D.; LIU, X. Z. Whole-exome sequencing to decipher the genetic heterogeneity of hearing loss in a Chinese family with deaf by deaf mating. **PLOS ONE**, San Francisco, v. 9, p. 10, e109178, 2014.

RICHARD, G.; BROWN, N.; SMITH, L. E.; TERRINONI, A.; MELINO, G.; MACKIE, R. M.; BALE, S. J.; UITTO, J. The spectrum of mutations in erythrokeratodermias--novel and de novo mutations in *GJB3*. **Human genetics**, Berlin, v. 106, n. 3, p. 321-329, 2000.

RICHARD, G.; SMITH, L. E.; BAILEY, R. A.; ITIN, P.; HOHL, D.; EPSTEIN, E. H. JR.; DIGIOVANNA, J. J.; COMPTON, J. G.; BALE, S. J. Mutations in the human connexin gene *GJB3* cause *erythrokeratoderma variabilis*. **Nature genetics**, New York, v. 20, n. 4, p. 366-369, 1998.

RICHARDS, S.; AZIZ, N.; BALE, S.; BICK, D.; DAS, S.; GASTIER-FOSTER, J.; GRODY, W. W.; HEGDE, M.; LYON, E.; SPECTOR, E.; VOELKERDING, K.; REHM, H. L.; ACMG LABORATORY QUALITY ASSURANCE COMMITTEE. Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: a joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology. **Genetics in medicine: official journal of the American College of Medical Genetics**, Baltimore, v. 17, n. 5, p. 405-424, 2015

RÜSCHENDORF, F.; NÜRNBERG P. ALOHOMORA: a tool for linkage analysis using 10K SNP array data. **Bioinformatics**, Oxford, v. 21, n. 9, p. 2123-2125, 2005.

SCHRIJVER, I. Hereditary Non-Syndromic Sensorineural Hearing Loss Transforming Silence to Sound. **The Journal of Molecular Diagnostics**, Bethesda, v. 6, n. 4, 2004. Review.

SCHUBERT, C. R.; CRUICKSHANKS, K. J.; WILEY, T. L.; KLEIN, R.; KLEIN, B. E.; TWEED, T. S. Diphtheria and hearing loss. **Public health reports**, Washington, v. 116, n. 4, p. 362-368, 2001.

SELF, T.; SOBE, T.; COPELAND, N. G.; JENKINS, N. A.; AVRAHAM, K. B. STEEL, K. P. Role of myosin VI in the differentiation of cochlear hair cells. **Developmental biology**, San Diego, v. 214, n. 2, p. 331-341, 1999.

SHEARER, E.; SMITH, R. J. H. Massively parallel sequencing for genetic diagnosis of hearing loss: the new standard of care. **Otolaryngology and head and neck surgery**, Thousand Oaks, v. 153, n. 2, p. 175-182, 2015.

SUNDSTROM, R. A.; VAN LAER, L.; VAN CAMP, G.; SMITH, R. J. H. Autosomal Recessive Nonsyndromic Hearing Loss. **American Journal of Medical Genetics**, Hoboken, v. 89, p. 123-129, 1999.

SWEENEY, H. L.; HOUDUSSE, A. What can myosin VI do in cells?. **Current opinion in cell biology**, Philadelphia, v. 19, p. 57-66, 2007.

TANG, H.-Y.; FANG, P.; WARD, P. A.; SCHMITT, E.; DARILEK, S.; MANOLIDIS, S.; OGHALAI, J. S.; ROA, B. B.; ALFORD, R. L. DNA sequence analysis of *GJB2*, encoding connexin 26: observations from a population of hearing impaired cases and variable carrier rates, complex genotypes, and ethnic stratification of alleles among controls. **American Journal of Medical Genetics**, Hoboken, v. 140A, p. 2401-2415, 2006. Note: *Erratum*: Am. J. Med. Genet. 146A: 2979 only, 2008.

TOPSAKAL, V.; HILGERT, N.; VAN DINTHER, J.; TRANEBJAERG, L.; RENDTORFF, N. D.; ZAROWSKI, A.; OFFECIERS, E.; VAN CAMP, G.; VAN DE HEYNING, P. Genotype-phenotype correlation for DFNA22: characterization of non-syndromic, autosomal dominant, progressive sensorineural hearing loss due to *MYO6* mutations. **Audiology & neuro-otology**, Basel, v. 15, p. 211-220, 2009.

VAN CAMP, G.; SMITH, R.J.H. (03/2017). **Hereditary Hearing Loss Homepage**. Disponível em: <<http://hereditaryhearingloss.org/>>. Acesso em: 01 abr. 2017.

VAN LAER, L.; MCGUIRT, W. T.; YANG, T.; SMITH, R. J. H.; VAN CAMP, G. Autosomal Dominant Nonsyndromic Hearing Impairment. **American Journal of Medical Genetics**, Hoboken, v. 89, p. 167-174, 1999.

VAN LAER, L., CRYNS, K.; SMITH, R. J.; VAN CAMP, G. Nonsyndromic hearing loss. **Ear and Hearing**, Philadelphia, v. 24, p. 275-88, 2003.

VONA, B.; NANDA, I.; HOFRICHTER, M. A.; SHEHATA-DIELER, W.; HAAF, T. Non-

syndromic hearing loss gene identification: A brief history and glimpse into the future. **Molecular and cellular probes**, London, v. 29, n. 5, p. 260-270, 2015.

WATTENHOFER, M.; DI IORIO, M.V.; RABIONET, R.; DOUGHERTY, L.; PAMPANOS, A.; SCHWEDE, T.; MONTSERRAT-SENTIS, B.; ARBONES, M. L.; ILIADES, T.; PASQUADIBISCEGLIE, A.; D'AMELIO, M.; ALWAN, S.; ROSSIER, C.; DAHL, H. H.; PETERSEN, M.B.; ESTIVILL, X.; GASPARINI, P.; SCOTT, H.S.; ANTONARAKIS, S. E. Mutations in the *TMPRSS3* gene are a rare cause of childhood nonsyndromic deafness in Caucasian patients. **Journal of molecular medicine**, Berlin, v. 80, n. 2, p. 124-131, 2002.

WEEGERINK, N. J. D.; SCHRADERS M.; OOSTRIK J.; HUYGEN, P. L.M.; STROM T. M.; GRANNEMAN, S.; PENNING, R. J. E.; VENSELAAR, H.; HOEFSLOOT, L. H.; ELTING, M.; CREMERS, C. W. R. J.; ADMIRAAL, R. J. C.; KREMER, H.; KUNSTCORRESPONDING, H. P. M. Genotype-phenotype correlation in DFNB8/10 families with *TMPRSS3* mutations. **Journal of the Association for Research in Otolaryngology**, New York, v. 12, n. 6, p. 753–766, 2011.

WELLS, A. L.; LIN, A. W.; CHEN, L. Q.; SAFER, D.; CAIN, S. M.; HASSON, T.; CARRAGHER, B. O.; MILLIGAN, R. A.; SWEENEY, H. L. Myosin VI is an actin-based motor that moves backwards. **Nature**, New York, v. 401, p. 505-508, 1999.

WILGOSS, A.; LEIGH, I. M.; BARNES, M. R.; DOPPING-HEPENSTAL, P.; EADY, R. A.; WALTER, J. M.; KENNEDY, C. T.; KELSELL, D. P. Identification of a novel mutation R42P in the gap junction protein beta-3 associated with autosomal dominant erythrokeratoderma variabilis. **The Journal of investigative dermatology**, Baltimore, v. 113, p. 1119-1122, 1999.

XIA, J. H.; LIU, C. Y.; TANG, B. S.; PAN, Q.; HUANG, L.; DAI, H. P.; ZHANG, B. R.; XIE, W.; HU, D. X.; ZHENG, D.; SHI, X. L.; WANG, D. A.; XIA, K.; YU, K. P.; LIAO, X. D.; FENG, Y.; YANG, Y. F.; XIAO, J. Y.; XIE, D. H.; HUANG, J. Z. Mutations in the gene encoding gap junction protein beta-3 associated with autosomal dominant hearing impairment. **Nature genetics**, New York, v. 20, p. 370-373, 1998.

YANG, J. J.; HUANG, S. H.; CHOU, K. H.; LIAO, P. J.; SU, C. C.; LI, S. Y. Identification of mutations in members of the connexin gene family as a cause of nonsyndromic deafness in Taiwan. **Audiology & neuro-otology**, Basel, v. 12, p. 198-208, 2007.

YOU, Z.; KOMAMURA, Y.; ISHIMI, Y. Biochemical analysis of the intrinsic Mcm4-Mcm6-mcm7 DNA helicase activity. **Molecular and cellular biology**, Washington, v. 19, n. 12, p. 8003-8015, 1999.

YOU, Z.; MASAI, H. DNA binding and helicase actions of mouse MCM4/6/7 helicase. **Nucleic Acids Symposium Series**, Oxford, v. 33, n. 9, p. 3033–3047, 2005.

ZANCHETTA, S.; OHARA, K.; RODRIGUES, P. T.; CARVALHO, E.L.; RICHIERI-COSTA, A. “New” Autosomal-Dominant Infantile Sensorineural Non-Progressive High-Frequency Hearing Loss: Report on a Brazilian Family. **American Journal of Medical Genetics**, Hoboken, v. 95, n. 1, p. 13-6, 2000.

9. ANEXOS

ESTUDO GENÉTICO-CLÍNICO DOS CASOS DE SURDEZ PARA USO EM ACONSELHAMENTO GENÉTICO

Etiqueta

DADOS PESSOAIS

REGISTRO Nº: _____ DATA DA CONSULTA: _____

NOME DO PACIENTE: _____

ENDEREÇO: _____

TELEFONE: _____

ENCAMINHADO POR: () 1.DERDIC () 2.HC-IMPLANTE COCLEAR () 3.HC OTORRINO () 4.SURDEZ
SÚBITA () 5.I.C. () 6.OUTROS MÉDICO _____

DATA NASC.: _____ IDADE: _____ SEXO: () 1=M () 2=F

NATURAL: _____

OCUPAÇÃO: _____ ESCOLARIDADE: _____

GRUPO ÉTNICO: () 1.Branco () 2.Pardo () 3.Negro () 4.Oriental

MÃE: _____

DATA NASC./idade: _____ NATURAL: _____

OCUPAÇÃO: _____

ESCOLARIDADE: _____

PAI: _____

DATA NASC./idade: _____ NATURAL: _____

OCUPAÇÃO: _____

ESCOLARIDADE: _____

HISTÓRICO FAMILIAL

CONSANGUINIDADE PARENTAL: () 1.NÃO () 2.SIM GRAU: _____

OUTROS CASOS DE SURDEZ NA FAMÍLIA: () 1.NÃO () 2.SIM () 3. NÃO SABE

H.D. GENÉTICA: () 1.AR () 2.AD () 3. LIGADO AO X () 4. MITOCONDRIAL

CASOS DE DOENÇAS GENÉTICAS NA FAMÍLIA: () 1.NÃO () 2.SIM

MÃE DO PROPÓSITO TEVE ABORTOS: () 1.NÃO () 2.SIM

(VIDE HEREDOGRAMA PG 5)

CARACTERIZAÇÃO DA SURDEZ

LATERALIDADE: ()1.Unilateral ()2.Bilateral ()3.Não determinada
 ÉPOCA EM QUE PERCEBEU O PROBLEMA: ()1.Pré-lingual ()2.Pós-lingual
 Idade de início:_____

IDADE EM QUE FOI FEITO O DIAGNÓSTICO:_____

EVOLUÇÃO: ()1.Estacionária ()2.Progressiva ()3.Súbita ()4.Não determinada
 TIPO: ()1.Sensorineural ()2.Conduutivo ()3.Misto ()4.Não determinado
 GRAU DA PERDA (Davis e Silverman, 1970):
 ()1.Leve (21-40dB) ()2.Moderada (41-70dB) ()3.Severa (71-90dB) ()4.Profunda (>91dB)

QUEIXAS DE: ZUMBIDO ()1.NÃO ()2.SIM TONTURA ()1.NÃO ()2.SIM

EXAMES REALIZADOS:

AUDIOMETRIA: ()1.NÃO FEZ ()2.NÃO TROUXE ()3.CÓPIA NA PASTA
 BERA/PEATE: ()1.NÃO FEZ ()2.NÃO TROUXE ()3.CÓPIA NA PASTA
 EMISSÕES OTO-ACÚSTICAS: ()1.NÃO FEZ ()2.NÃO TROUXE ()3.CÓPIA NA PASTA
 EXAMES DE IMAGEM: ()1.NÃO FEZ ()2.NÃO TROUXE ()3.INFORMAÇÃO MÉDICA ()4.CÓPIA NA PASTA QUAL?_____

MALFORMAÇÃO CÓCLEO-VESTIBULAR ()0.NÃO SEI ()1.NÃO TEM ()2.AQUEDUTO VESTIBULAR ALARGADO ()3.MONDINI ()4.APLASIA DE MICHEL ()5.outra(s)

GESTAÇÃO

INTERCORRÊNCIAS: ()1.NÃO ()2.SIM
 PRÉ-NATAL: ()1.NÃO ()2.SIM Obs.:_____

INFECÇÕES MATERNAS: ()1.NÃO ()2.SIM QUAL?_____

USO DE DROGAS e MEDICAMENTOS: ()1.NÃO ()2.SIM Quais?_____

OBSERVAÇÕES:_____

PERÍODO PERINATAL

INTERCORRÊNCIAS: ()1.NÃO ()2.SIM
 PARTO: ()1.NORMAL ()2.FORCEPS ()3.CESÁRIA Motivo:_____

NASCIMENTO: ()1.TERMO - 37 a 42sem ()2.PRÉ-TERMO - <37sem ()3.PÓS-TERMO - >42sem
 Ao nascer: Peso_____ Comprimento_____

Boas condições de vitalidade: ()1.NÃO ()2.SIM
 ANOXIA: ()1.NÃO ()2.SIM CIANOSE: ()1.NÃO ()2.SIM
 ICTERÍCIA: ()1.NÃO ()2.SIM Banho de luz(Fototerapia): ()1.NÃO ()2.SIM
 INCOMPATIBILIDADE DE Rh ()1.NÃO ()2.SIM
 FEBRE ALTA: ()1.NÃO ()2.SIM DEFEITOS FÍSICOS: ()1.NÃO ()2.SIM
 INCUBADORA: ()1.NÃO ()2.SIM Motivo:_____

UTI neonatal: ()1.NÃO ()2.SIM Motivo:_____

SAÍDA DA MATERNIDADE COM A MÃE: ()1.NÃO Motivo:_____ ()2.SIM
 OBSERVAÇÕES:_____

EXPOSIÇÃO A FATORES ETIOLÓGICOS AMBIENTAIS

ANTIBIÓTICOS AMINOGLICOSÍDEOS: ()1.NÃO ()2.SIM Quais?_____ ()3.NÃO SABE
 OUTRAS DROGAS OTOTÓXICAS: ()1.NÃO ()2.SIM Quais?_____

INFECÇÕES DE ORELHA: ()1.NÃO ()2.SIM DIABETES MELITO: ()1.NÃO ()2.SIM
 MENINGITE/MENINGOENCEFALITES: ()1.NÃO ()2.SIM SARAMPO: ()1.NÃO ()2.SIM
 CAXUMBA: ()1.NÃO ()2.SIM INFECÇÕES DAS VIAS AÉREAS SUPERIORES: ()1.NÃO ()2.SIM
 EXPOSIÇÃO CONSTANTE A RUÍDOS: ()1.NÃO ()2.SIM, por qto tempo?_____

OUTRAS DOENÇAS: ()1.NÃO ()2.SIM OBS.: _____

INTERNAÇÕES: ()1.NÃO ()2.SIM
 OBS.: _____ CIRURGIAS: ()1.NÃO ()2.SIM
 OBS.: _____

DESENVOLVIMENTO NEUROMOTOR

DESENVOLVIMENTO: ()1.NORMAL ()2.ATRASADO BEBÊ: ()1.FIRME ()2. MOLE
 SUSTENTOU O PESCOÇO: _____ SENTOU: _____
 ENGATINHOU: _____
 ANDOU: _____
 PRIMEIRAS PALAVRAS: _____

HIPÓTESE DIAGNÓSTICA

ETIOLOGIA: ()1.GENÉTICA(HEREDITÁRIA) ()2.AMBIENTAL (ADQUIRIDA) ()3.IDIOPÁTICA
 MANIFESTAÇÃO: ()NÃO-SINDRÔMICA (isolada) ()SINDRÔMICA Qual? _____
 ()3.NÃO DETERMINADA
 H.D. GENÉTICA: ()1.AR ()2.AD ()3. LIGADO AO X ()4. MITOCONDRIAL
 COLETA DE MATERIAL PARA DIAGNÓSTICO/PESQUISA:

Paciente	Registro	Parentesco	Datas das coletas	Sangue /DNA	Saliva /DNA	Cariót.	Sangue /RNA	Saliva /RNA	Outros

INFORMAÇÕES - ACONSELHAMENTO GENÉTICO

PAIS PRETENDEM TER MAIS FILHOS: ()1.NÃO ()2.SIM
 MÉTODOS CONTRACEPTIVOS: LAQUEADURA ()1.NÃO ()2.SIM VASECTOMIA ()1.NÃO ()2.SIM

CONSULTA

()1. Paga ()2. Não Paga Obs.: _____
 Valor: _____

HEREDOGRAMA

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

HOSPITAL DAS CLÍNICAS

DA FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

I - DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO SUJEITO DA PESQUISA OU RESPONSÁVEL LEGAL

1. NOME DO PACIENTE :.....

DOCUMENTO DE IDENTIDADE Nº : SEXO : M F

DATA NASCIMENTO:/...../.....

ENDEREÇO :..... Nº APTO:

BAIRRO: CIDADE

CEP:..... TELEFONE: DDD (.....)

2. RESPONSÁVEL LEGAL

NATUREZA (grau de parentesco, tutor, curador etc.)

DOCUMENTO DE IDENTIDADE :.....SEXO: M F

DATA NASCIMENTO.:/...../.....

ENDEREÇO: Nº APTO:

BAIRRO: CIDADE:

CEP: TELEFONE: DDD (.....).....

DADOS SOBRE A PESQUISA

1. TÍTULO DO PROTOCOLO DE PESQUISA: Estudos Genético-Moleculares em Surdez Não Síndrômica e Síndrômica

PESQUISADOR : **Jeanne Oiticica Ramalho Ferraz**

CARGO/FUNÇÃO: **Chefe do LIM32/Laboratório de Otorrinolaringologia** INSCRIÇÃO REGIONAL Nº: **CRM: 96354 - SP** CONSELHO

UNIDADE DO HCFMUSP: **Laboratório de Otorrinolaringologia – LIM32**

3. AVALIAÇÃO DO RISCO DA PESQUISA:

RISCO MÍNIMO

RISCO MÉDIO

RISCO BAIXO

RISCO MAIOR

4. DURAÇÃO DA PESQUISA : mínimo de 24 meses, mas o sangue coletado poderá ser armazenado em biorrepositório por tempo máximo de 10 anos (renováveis) para a continuação dos estudos sobre a causa da perda auditiva

HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO-HCFMUSP

1. O estudo serve para descobrir as possíveis causas da doença denominada “*Surdez hereditária*” em você ou seu filho. A surdez, perda ou deficiência auditiva, é definida para esse estudo como qualquer dificuldade de audição independente do tipo ou grau. A Surdez pode ser causada por fatores ambientais ou genéticos. Em muitos casos, o fator genético é herdado do pai e/ou da mãe, por isso, chamamos esses casos de “*Surdez hereditária*”. Quando a surdez é hereditária, há um risco de que essa dificuldade de audição venha a se repetir em outras pessoas da família. Os exames descritos abaixo têm como objetivo tentar identificar a causa da perda auditiva em você ou seu filho.
2. Todos os exames clínicos e coleta de sangue relacionados abaixo serão realizados dentro de ambiente hospitalar, cercado por infra-estrutura especializada no atendimento de urgência, pronto-socorro, enfermaria.
3. Descrição dos exames: A **audiometria** é um teste realizado para saber se sua audição está normal ou se há surdez e determina a quantidade desta perda. Neste exame colocamos fones em suas orelhas e você escutará sons e a voz da pessoa que fará o seu exame. A **audiometria comportamental** tem a mesma finalidade, mas é utilizada para avaliar crianças de 0 a 24 meses. Nesse exame são utilizados brinquedos e instrumentos musicais pedagógicos. São apresentados estímulos vocais e instrumentais para criança e o examinador observa as mudanças de comportamento da criança (movimentos corporais dos membros, da cabeça em procura e/ou localização da fonte sonora, contração do músculo orbicular do olho como piscar, etc) frente a esses estímulos, para posterior elaboração do relatório da avaliação audiológica. A **imitanciometria** é feita junto com a audiometria e pesquisa o quanto a membrana que tampa o fundo da sua orelha se move e se o músculo da orelha responde ao som alto. Neste exame colocamos um fone em uma orelha e uma sonda de borracha na outra orelha, você vai sentir a orelha tampada e ouvir sons altos, mas logo volta ao normal. As **emissões otoacústicas** são feitas para saber se células dentro da sua orelha estão funcionando bem. Vamos colocar uma sonda de borracha em uma orelha de cada vez, e você vai escutar sons não tão altos. O **Potencial evocado de tronco encefálico (PEATE)** avalia a integridade da via auditiva desde o nervo auditivo até o tronco encefálico, sendo muito utilizado na avaliação de indivíduos difíceis de serem avaliados por meio de procedimentos convencionais. Para a realização desse exame, primeiro a pele atrás das orelhas e na testa é limpa com pasta abrasiva e são fixados eletrodos (com uma fita adesiva antialérgica) nestes locais, e ainda são colocados fones. O paciente fica deitado, o mais tranquilo e relaxado possível, com os olhos suavemente fechados e recebe estímulo sonoro através dos fones. Sempre que o nervo auditivo e as estruturas do tronco encefálico forem ativados pelo estímulo sonoro, é gerada uma quantidade mínima de eletricidade que é captada pelos eletrodos, registrada no equipamento e interpretada pelo examinador. Os **exames de sangue** são feitos no laboratório onde um funcionário vai retirar um pouco do seu sangue, no braço, usando uma agulha. Você vai sentir uma picada antes da retirada e depois vai ser orientado a fazer pressão no local da picada com algodão. A **tomografia computadorizada de ossos temporais** trata-se de um exame de imagem importante na identificação de possíveis anomalias, malformações ou ossificação da cóclea, que podem fornecer pistas sobre a causa da sua perda auditiva. Você vai ficar deitado em uma mesa de

exame por alguns minutos. Ao mesmo tempo, o anel de raios X no interior do tomógrafo vai girando à volta da mesa de exame, tomando fotos altamente detalhadas que podem posteriormente ser exibidas na forma de fotografias. A **ressonância magnética dos ouvidos** é fundamental para a determinação das condições da orelha interna e do nervo auditivo. Você simplesmente deita-se numa confortável mesa de exame que, muito lenta e suavemente, vai passando através de uma abertura. Você vai ficar deitado em uma espécie de túnel por alguns minutos, e ouvirá um ruído alto que é decorrente do barulho que a máquina faz enquanto colhe as imagens. O **teste de percepção de fala** trata-se de um teste subjetivo que avalia a capacidade de detecção e discriminação de sons da fala, palavras e frases.

4. Riscos dos exames: Os exames de **audiometria**, **imitanciometria**, **emissões otoacústicas**, **teste de percepção de fala** e **potencial evocado de tronco encefálico (PEATE)** não envolvem riscos de lesão ou dano para a saúde. Os **exames de sangue** oferecem risco baixo, pois serão realizados através de punção venosa para coleta de sangue. Pode ocorrer dor no momento da punção, extravasamento de sangue com equimose na pele, sangramento local em caso de compressão inadequada após punção. Estes sintomas são leves e transitórios, podendo ser corrigidos no próprio ambiente hospitalar. A **tomografia computadorizada** oferece risco baixo. O exame utiliza Raios X para obter as imagens necessárias, em quantidade maior do que por exemplo a ressonância magnética. O exame dura em média de 15 a 30 minutos; entretanto, devido à moderna tecnologia o tempo de exposição do corpo aos raios X, na realidade, é bem menor, de apenas alguns segundos. Portanto, apesar da maior quantidade de radiação, a brevidade do exame minimiza os riscos, e o risco associado a um único exame é muito pequeno. Este risco aumenta à medida que o número de exames adicionais realizados cresce. No entanto, esta quantidade de Raios X de um único exame pode ser prejudicial para pacientes grávidas, portanto, tal fato será devidamente questionado no momento da solicitação do exame. Como o aparelho de tomografia possui abertura bem ampla, é grande e não é fechado, isto em geral é suficiente para proporcionar comodidade. É incomum o paciente relatar fobia ou sensação que não pode tolerar a realização do exame, pois ele é muito rápido. Portanto, o mais provável é que você não sentirá incomodo de espécie alguma. Em certos casos pode se fazer necessário o uso de um meio de contraste para mostrar determinados vasos de modo mais claro e preciso. As injeções endovenosas de meios de contraste radiológico são quase sempre desacompanhadas de qualquer reação ou desconforto. Em alguns casos, porém, podem ocorrer durante a injeção do contraste uma leve sensação de calor ou ardor no corpo e ou um gosto metálico na boca, entretanto estes sintomas costuma ser frustrados e logo desaparecem. Em certos casos poderão ser sentidas, momentaneamente, náuseas, coceiras ou irritação na pele, sintomas inflamatórios no local da punção ou no trajeto venoso. Caso ocorram, estes sintomas poderão ser contornados no momento ou logo após o exame, com a medicação apropriada, utilizando-se o mesmo acesso venoso obtido para a infusão do meio de contraste, no próprio ambiente hospitalar. A meia vida do meio de contraste administrado pela veia é de aproximadamente 2 horas, e quase 100% da dose será eliminada da corrente sanguínea em 24 horas; entretanto isto só é válido para pacientes com função renal normal. O meio de contraste pode induzir ainda à insuficiência renal aguda, o que pode ocorrer em 2-7% dos exames. Este risco é maior para indivíduos com insuficiência renal leve ou moderada prévias, ou diabetes. Portanto, a presença destes dados na história será devidamente questionada no momento da solicitação do exame, e o mesmo contra-indicado se for o caso, visando minimizar riscos. Em casos excepcionalmente e extremamente raros podem ocorrer reações alérgicas de

maior gravidade como anafilaxia, edema de laringe, broncoespasmo, parada cardíco-respiratória e óbito. Entretanto, a utilização de meios de contraste modernos (não iônicos) tem reduzido sensivelmente a ocorrência dessas reações. De um modo geral, as reações, variando de leves a graves, ocorrem em 1-3% dos casos para os contrastes não iônicos e em 12% dos casos para os contrastes iônicos. Atualmente, com os contrastes mais modernos, as reações mais graves como anafilaxia podem ocorrer em 0,01-0,04% dos casos. Óbito ocorre em 2-30 indivíduos por 1.000.000 de exames, em geral por anafilaxia ou falência renal aguda. Em caso de complicações mais graves, as medidas de ressuscitação cardio-respiratória serão tomadas no próprio ambiente hospitalar. A **ressonância magnética** oferece risco baixo. É um dos mais seguros exames de imagem, não utiliza radiação ionizante, seus agentes de contraste são muito mais seguros que os da tomografia, pois são contrastes à base de gadolínio que praticamente não produzem reações alérgicas. As reações alérgicas anafiláticas com este tipo de contraste são da ordem de 1 ocorrência para 100.000 exames realizados. O risco de reações adversas com o contraste variam de 1 a 3% e incluem cefaléia, frieza, dor ou queimação no local da injeção, náuseas e vertigem. Estes sintomas são leves e transitórios, podendo ser corrigidos no próprio ambiente hospitalar caso haja indicação. O risco inerente ao exame está relacionado aos portadores de marca-passos, implantes metálicos, clips de aneurisma, próteses metálicas. Estes objetos podem ser deslocados pelo grande campo magnético gerado. Entretanto, isto será corrigido excluindo-se estes casos do estudo durante a avaliação inicial, visto que configuram contra-indicação formal ao exame. Serão excluídos ainda os pacientes que sofrem de claustrofobia, ou seja, que sentem medo em ambientes fechados, pois o exame é sempre realizado em uma maca fechada.

5. A identificação da causa da perda auditiva pode auxiliar na escolha do tratamento e vai nos ajudar a calcular a chance desse problema de audição acontecer de novo em outra pessoa da família. Esses exames não vão curar a sua surdez.
6. Caso você queira, pode ver os resultados, no final desta pesquisa. A qualquer momento, você pode entrar em contato para saber os resultados parciais da pesquisa. O principal investigador é a **Dra. Jeanne Oiticica Ramalho Ferraz**, que pode ser encontrado no endereço **Av. Dr. Arnaldo, 455 2º andar sala 2209 – Cerqueira Cesar – São Paulo-SP**. Telefone (11) 3061-7166.

Se você tiver alguma dúvida sobre a pesquisa, entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) – Rua Ovídio Pires de Campos, 225 – 5º andar – tel: 3069-6442 ramais 16, 17, 18 ou 20, FAX: 3069-6442 ramal 26 – E-mail: cappesq@hcnet.usp.br

Você pode desistir ou interromper a sua colaboração neste estudo a qualquer momento, sem necessidade de qualquer explicação; Sua desistência não vai trazer nenhum prejuízo à sua saúde ou bem estar físico. Não vai interferir no seu atendimento ou tratamento médico. Caso tenham sido tiradas fotografias,

- () concordo que sejam incluídas em publicações científicas, se necessário
- () concordo que sejam apresentadas em aulas para profissionais da saúde
- () não concordo que sejam incluídas em nenhum tipo de publicação ou apresentação.

7. Os resultados obtidos serão mantidos em segredo, mas poderão ser divulgados em revistas ou encontros científicos, os seus dados pessoais não serão divulgados.
8. Sempre que surgirem novos resultados da pesquisa, você será informado e poderá entrar em contato quando quiser para saber sobre os resultados.

9. Você não vai ter despesas para participar do estudo. Também não vai ter nenhum apoio financeiro para participar. Qualquer despesa adicional será realizada com o orçamento da pesquisa. Também não há compensação financeira relacionada à sua participação.
10. Num primeiro momento, o seu sangue será utilizado para a realização de testes genéticos de rotina para algumas das causas mais frequentes de Surdez Hereditária. No entanto, existem mais de 100 causas diferentes para a Surdez Hereditária e não existem testes para todas elas no momento. Portanto, é possível que ao final da realização desses testes genéticos de rotina, não seja possível ainda identificar a causa do problema de audição, mesmo que seja genético/hereditário. Caso esses testes iniciais não determinem o diagnóstico, à medida que forem colocados em rotina novos testes, eles serão realizados com o sangue colhido e o resultado será entregue a você. Por isso, precisaremos armazenar o sangue que coletamos de você, por período mínimo de 10 anos com objetivo de identificar a causa do problema de audição em você ou em sua família. Portanto, o DNA extraído a partir do seu sangue ficará armazenado em um banco para definir seu diagnóstico e para se estabelecer novos exames genéticos para a “*Surdez hereditária*”.

“No caso de realização de outras pesquisas usando este material doado, há necessidade de contatá-lo para obter novas autorizações?

Não, eu dispenso estas novas autorizações, pois estou ciente e de acordo que cada nova pesquisa será analisada pela Comissão para Análise de Projetos de Pesquisa do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da USP que autorizará ou não a utilização do material biológico que foi por mim doado.

Sim, no caso de novas pesquisas, eu quero ser contatado para autorizar ou não a utilização do material biológico que foi por mim doado.

Acredito que fui suficientemente informado a respeito do que li ou do que foi lido para mim, sobre o estudo “Estudos Genético-Moleculares em Surdez Não Síndrômica e Síndrômica”.

Eu discuti com o Dra. Jeanne Oiticica Ramalho Ferraz e Dra. Karina Lezirovitz Mandelbaum sobre a minha decisão em participar deste estudo. Ficou claro para mim qual é o objetivo do estudo, quais os procedimentos que serão realizados, os desconfortos e riscos, as garantias de que meus dados serão guardados em segredo e de que minhas dúvidas serão esclarecidas a qualquer momento. Ficou claro também que eu não vou ter despesas e que vou ter acesso garantido ao tratamento hospitalar sempre que for necessário. Concordo em participar deste estudo por vontade própria e sei que posso retirar o meu consentimento a qualquer momento, antes ou durante o estudo, sem prejuízo ou perda de qualquer benefício que eu possa ter adquirido, ou no meu atendimento neste Serviço.

Assinatura do paciente/representante legal

Data / /

Assinatura da testemunha

Data / /

Para casos de pacientes menores de 18 anos, analfabetos, semi-analfabetos ou portadores de deficiência auditiva ou visual.

Declaro que obtive de forma apropriada e voluntária o Consentimento Livre e Esclarecido deste paciente ou representante legal para a participação neste estudo.

Karina Lezirovitz Mandelbaum

Data / /

Jeanne Oiticica Ramalho Ferraz

Data / /

HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA
FACULDADE DE MEDICINA DA
USP - HCFMUSP



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Estudos Genético-Moleculares em Surdez Não Síndrômica e Síndrômica

Pesquisador: Jeanne Oiticica Ramalho Ferraz

Área Temática: Genética Humana:

Área 3. Fármacos, medicamentos, vacinas e testes diagnósticos novos (fases I, II e III) ou não registrados no país (ainda que fase IV), ou quando a pesquisa for referente a seu uso com modalidades, indicações, doses ou vias de administração diferentes daquelas estabelecidas, incluindo seu emprego em combinações.

Versão: 3

CAAE: 02238412.0.1001.0068

Instituição Proponente: Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da USP

Patrocinador Principal: Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da USP
FUNDAÇÃO DE AMPARO A PESQUISA DO ESTADO DE SÃO PAULO

DADOS DA NOTIFICAÇÃO

Tipo de Notificação: Outros

Detalhe: relato

Justificativa: Inclusão de Pesquisador Responsável e Inclusão de pesquisadores Executante para

Data do Envio: 11/02/2014

Situação da Notificação: Parecer Consubstanciado Emitido

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 534.535

Data da Relatoria: 19/02/2014

Apresentação da Notificação:

Os pesquisadores enviam carta, solicitando inclusão de pesquisadores, assim como relatório do andamento da pesquisa.

Objetivo da Notificação:

Incluir a Dra. Karina Lezirovitz Mandelbaum como pesquisadora responsável (antes executante) e incluir a Dra. Juliana Sampaio Silva e Dr. Gustavo Guilherme Deschamps como pesquisadores executantes

Endereço: Rua Ovídio Pires de Campos, 225 5º andar

Bairro: Cerqueira Cesar

CEP: 05.403-010

UF: SP

Município: SÃO PAULO

Telefone: (11)2661-7585

Fax: (11)2661-7585

E-mail: marcia.carvalho@hc.fm.usp.br

HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA
FACULDADE DE MEDICINA DA
USP - HCFMUSP



Continuação do Parecer: 534.535

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Já analisados anteriormente.

Comentários e Considerações sobre a Notificação:

Os pesquisadores apresentam relatório parcial da pesquisa, mostrando que a pesquisa já foi iniciada e que vários casos já foram inclusos. Mostram alguns resultados parciais.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Já analisados anteriormente.

Recomendações:

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

A inclusão dos pesquisadores é aceita, e o relatório parcial aprovado.

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

SAO PAULO, 19 de Fevereiro de 2014

Assinador por:
ALFREDO JOSE MANSUR
(Coordenador)

Endereço: Rua Ovídio Pires de Campos, 225 5º andar

Bairro: Cerqueira Cesar

CEP: 05.403-010

UF: SP

Município: SAO PAULO

Telefone: (11)2661-7585

Fax: (11)2661-7585

E-mail: marcia.carvalho@hc.fm.usp.br