



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS

GISELLE BIANCO BORTOLETTO

ESTUDO DE VARIANTES ASSOCIADAS À DOENÇA DE MÉNIÈRE

CAMPINAS

2020

GISELLE BIANCO BORTOLETTO

ESTUDO DE VARIANTES ASSOCIADAS À DOENÇA DE MÉNIÈRE

Tese apresentada à Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas como parte dos requisitos exigidos para a obtenção do título de Mestra em Ciências, Área de Concentração em Genética Médica.

ORIENTADOR: Profa. Dra. Edi Lúcia Sartorato.

ESTE TRABALHO CORRESPONDE À VERSÃO FINAL DA DISSERTAÇÃO PELA ALUNA GISELLE BIANCO BORTOLETTO, E ORIENTADA PELA PROFA. DRA. EDI LÚCIA SARTORATO.

CAMPINAS

2020

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca da Faculdade de Ciências Médicas
Maristella Soares dos Santos - CRB 8/8402

B648e Bortoletto, Giselle Bianco, 1993-
Estudo de variantes associadas à doença de Ménière / Giselle Bianco
Bortoletto. – Campinas, SP : [s.n.], 2020.

Orientador: Edi Lúcia Sartorato.
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade
de Ciências Médicas.

1. Doença de Ménière. 2. Perda auditiva neurossensorial. 3. Medicina
Concierge. I. Sartorato, Edi Lúcia, 1962-. II. Universidade Estadual de
Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Study of variants related to Ménière's disease

Palavras-chave em inglês:

Ménière's Disease

Neurosensory hearing loss

Concierge medicine

Área de concentração: Genética Médica

Titulação: Mestra em Ciências

Banca examinadora:

Edi Lúcia Sartorato [Orientador]

Camila Andréa de Oliveira

Fernando Augusto de Lima Marson

Data de defesa: 31-01-2020

Programa de Pós-Graduação: Ciências Médicas

Identificação e informações acadêmicas do(a) aluno(a)

- ORCID do autor: <https://orcid.org/0000-0002-1762-6988>

- Currículo Lattes do autor: <http://lattes.cnpq.br/7582646844092740>

COMISSÃO EXAMINADORA DA DEFESA DE MESTRADO

GISELLE BIANCO BORTOLETTO

ORIENTADOR: EDI LÚCIA SARTORATO

MEMBROS:

1. PROF (A). DR (A). EDI LÚCIA SARTORATO

2. PROF (A). DR (A). CAMILA ANDRÉA DE OLIVEIRA

3. PROF (A). DR (A). FERNANDO AUGUSTO DE LIMA MARSON

Programa de Pós-Graduação em Genética Médica da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas.

A ata de defesa com as respectivas assinaturas dos membros encontra-se no SIGA/Sistema de Fluxo de Dissertação/Tese e na Secretaria do Programa da FCM.

Data de Defesa: 31/01/2020

Dedico este trabalho à comunidade científica, e aos meus terapeutas Rogério e Graziella que foram essenciais nesse processo.

AGRADECIMENTOS

À minha querida orientadora Dra. Edi Lúcia Sartorato, por dar-me a chance de iniciar a tão sonhada carreira acadêmica me aceitando em seu grupo de pesquisa quatro anos atrás, por todos os conselhos, apoio e ensinamentos e, principalmente, por toda confiança que sempre teve em mim e no meu trabalho – mesmo quando eu mesma não tinha mais. Sem ti eu nunca teria chegado até aqui. Obrigada.

À minha mãe, minha irmã e meu pai, por todo o apoio e compreensão durante todos esses anos, mesmo eu fazendo parte de um mundo completamente diferente. Obrigada por sempre me incentivarem, me ajudarem e por nunca me deixarem desistir do meu sonho. Amo vocês.

À minha família que sempre acreditou em mim. Amo vocês.

À minhas queridas amigas Luana, Taís, Graziella e Pamela por passarem por todos os momentos – bons e ruins – ao meu lado, por sempre estarem me segurando e me mostrando que valia a pena continuar quando eu queria desistir. Todos os momentos em que vocês estiveram ao meu lado foram essenciais para eu conseguir chegar até aqui e continuar no sonho. Não sei o que teria sido de mim e da minha carreira sem cada risada, cada conversa, cada pastel, cada rodízio, cada puxão de orelha, cada colo, cada palavra de carinho que vocês têm me proporcionado nesses anos. Amo vocês.

Aos meus queridos colegas de trabalho do Laboratório de Genética Humana/CBMEG Nadya, Matheus, Marcela, Laiz, Lorryama, Fábio, Geovanna, Davi, Felipe, Mara, Helena, Sueli, Ana Paula, Adriana e à professora Dra. Maricilda por todo o apoio, conversas e conselhos durante esses anos. Cada almoço, cada confraternização foram únicos. Obrigada por tudo.

À Dra. Karen Lopes por toda ajuda com a parte clínica do projeto, por todas as dúvidas esclarecidas e conselhos. Obrigada.

Ao Dr. Fernando Marson e à Dra. Camila de Oliveira por terem aceitado gentilmente serem a banca avaliadora da minha defesa.

À Dra. Carmen Bertuzzo, à Dra Mônica Mello, ao Dr. Arthur Menino e à Dra Andréa Guerra por terem sido a banca avaliadora do meu exame de qualificação e terem colaborado de forma extraordinária para este trabalho e para o meu crescimento como pesquisadora.

Aos pacientes, sem os quais não seria possível a realização desde projeto.

À todos os funcionários e professores do CBMEG e da Secretaria da Pós-Graduação da FCM que sempre colaboraram para um ambiente harmonioso. Um obrigada especial à Marcinha, secretária do programa de Ciências Médicas, por todas as dúvidas sandas e todo o suporte burocrático durante todos os esses anos.

Às minhas amigas Tatiana e Silvana por sempre terem fé em mim e na minha carreira. Amo vocês.

Amos meus terapeutas Rogério, Graziella e Fábio por terem segurado a barra comigo e me ajudado num dos piores anos da minha vida. Devo minha saúde física e psicológica a vocês e sou eternamente grata por ter a honra de ser tratada por profissionais tão competentes e humanos como vocês. Arrisco dizer que sem vocês cuidando da minha mente – e da minha coluna (rsrsrs), hoje eu não estaria há poucas semanas de defender a minha tese, dando mais um passo em direção ao meu sonho. Um enorme obrigada.

A todos os meus amigos que me acompanharam de perto e de longe e que sempre acreditaram na minha capacidade e me apoiaram na realização deste trabalho. Cada um de vocês tem um espaço no meu coração.

Enfim, agradeço a todos que de alguma forma contribuíram para que esse trabalho tenha sido realizado.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

“Existem momentos na vida da gente, em que as palavras perdem o sentido ou parecem inúteis, e, por mais que a gente pense em uma forma de empregá-las elas parecem não servir. Então a gente não diz, apenas sente” (Freud).

RESUMO

Doença de Ménière (DM) é um distúrbio complexo do ouvido interno caracterizado pela tríade de episódios recorrentes de vertigem, zumbido e plenitude auricular, que se associam a uma perda auditiva progressiva. A DM é uma das vestibulopatias mais frequentes, com prevalência de 46 a 200 casos em cada 100 mil indivíduos. Ela varia em cada etnia e região, tendo uma prevalência conhecida em caucasianos, embora não haja dados desta prevalência no Brasil. Além disso, não existe diferença de distribuição entre os sexos nos pacientes afetados pela DM. Embora a etiologia desta labirintopatia ainda seja desconhecida, é provável que seja resultado de uma interação entre fatores ambientais e genéticos. Caracterizar molecularmente a DM tem sido um desafio ao longo dos anos. O objetivo deste estudo foi rastrear variantes em genes candidatos em 30 pacientes clinicamente diagnosticados com Doença de Ménière, com a proposta de um possível algoritmo para o diagnóstico molecular facilitado, visando à medicina personalizada. Para tanto, foram investigados os genes *DPT*, *SEMA3D*, *KCNE3*, *SLC44A2*, *PRKCB* e a variante intergênica rs4947296 pela técnica de Sequenciamento Automático de Sanger. Não foi encontrada nenhuma variante relacionada à DM nos genes *DPT*, *SEMA3D*, *PRKCB* ou na variante rs4947296. Entre as variantes observadas, com possível relação com a DM, no gene *KCNE3*, foi encontrada a variante rs2270676 (c.198T>C) em cinco pacientes. Entretanto estudos *in silico* realizados ainda são contraditórios, indicando a necessidade de estudos funcionais para elucidar as possíveis alterações fenotípicas. No gene *SLC44A2* também foram encontradas as variantes rs3087969 (c.198T>C) e rs2288904 (c.455A>G). Embora essas variantes sejam polimórficas, estudos já estabeleceram a relação de ambas em heterozigose com casos graves de DM, uma vez que, a expressão da proteína nesses casos é afetada. Entretanto, análise de prontuários sobre a evolução da DM nos pacientes refutam que haja qualquer associação entre as variantes rs2288904 e rs3087969 e a forma grave da doença. Também não foi encontrado o alelo A/G da variante intergênica rs4947296 no indivíduos. Estudos funcionais recentes sobre essa variante demonstraram sua regulação em diversos genes, incluindo as vias TWEAK/Fn14, que controlam processos inflamatórios, o que sugere uma etiologia autoimune para os pacientes com DM portadores da variante. A proposta principal do presente estudo foi estabelecer um algoritmo para o diagnóstico molecular da DM com a finalidade de facilitar e melhorar o processo de diagnóstico, bem como a construção de uma painel gênico que inclua todas essas variantes a fim de melhorar, agilizar e reduzir custos na triagem molecular da DM.

Palavras-chave: Doença de Ménière; perda auditiva neurossensorial; *SLC44A2*; rs4947296; medicina personalizada.

ABSTRACT

Ménière's Disease (MD) is an inner ear complex disorder characterized by recurrent episodes of spontaneous vertigo, tinnitus, fluctuating sensorineural hearing loss and aural fullness. MD is one of the most frequent vestibular disorders, with a prevalence rate of 46 to 200 cases in 100 thousand individuals. It ranges within each region and ethnicity, with a higher prevalence in Caucasians, but there is no such data in Brazilian population. Also, there is no difference of gender distribution in patients with MD. Although its etiology is unknown, it may be a result of the interplay between environmental and genetic factors. It has been a challenge to diagnose it through genetic investigations. The aim of this study was to search for variants in candidate genes in 30 patients clinically diagnosed with Ménière's Disease, with a proposal of a likely algorithm to the easier molecular diagnosis towards the personalized medicine. Therefore, we investigated the genes *DPT*, *SEMA3D*, *KCNE3*, *SLC44A2*, *PRKCB* and the intergenic variant rs4947296 through Sanger Sequencing technique. Within the observed variants, with a possible association to MD, in the gene *KCNE3* it was found the variant rs2270676 (c.198T>C) in five patients. However, *in silico* predictions are still contradictory, indicating the necessity of functional studies to elucidate the possible phenotypic alterations. In the gene *SLC44A2* it was found the variants rs3087969 (c.198T>C) and rs2288904 (c.455A>G). Even though these are polymorphic variants, studies have already set the association of both in heterozygosity with cases of severe MD since the expression of the protein in this case is affected. However, the study of medical records of the patients regarding the evolution of the disease refutes the theory that there is any association between the variants rs2288904 and rs3087969 with severe cases of MD. Also, the A/G allele of the intergenic variant rs4947296 has not been found in the subjects. Recent functional studies have shown its regulation in a range of genes, including the TWEAK/Fn14 pathway, which controls the inflammatory processes. It suggests an autoimmune etiology for the MD patients carriers of this variant. The main proposal of the present study was to be able to establish an algorithm to the molecular diagnose of MD with the purpose to easy and improve the diagnose process, aiming a personalized medicine, as well as the proposal of manufacturing a genic panel that includes all these variants looking towards to the improvement, agility and lessen costs to molecular screening of MD.

Key-words: Ménière's Disease; sensorineural hearing loss; *SLC44A2*; rs4947296; personalized medicine.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	13
1.1 A Perda Auditiva.....	13
1.1.1 A etiologia das perdas auditivas	15
1.1.2 A genética da perda auditiva	16
1.2 A Doença de Ménière	17
1.2.1 Gene <i>DPT</i>	22
1.2.2 Gene <i>SEMA3D</i>	22
1.2.3 Gene <i>SLC44A2</i>	23
1.2.4 Gene <i>PRKCB</i>	24
1.2.5 Variante rs4947296	24
2. OBJETIVOS.....	26
2.1 Geral	26
2.2 Específicos	26
3. MATERIAIS E MÉTODOS	27
3.1 Casuística.....	27
3.2 Caracterização da amostra.....	29
3.3 Rastreamento de genes e variantes	31
3.3.1 Padronização das Reações em Cadeia da Polimerase (<i>PCR</i>) e amplificação dos fragmentos	31
3.3.2 Purificação dos produtos de <i>PCR</i>	33
3.3.3 Reação para sequenciamento	33
3.3.4 Análise das sequências obtidas	33
3.4 Estudo in silico.....	33
3.4.1 Human Splicing Finder 3.1 (HSF)	34
3.4.2 SpliceAid 2	35
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	37
4.1 Gene <i>DPT</i>	39

4.2 Gene SEMA3D	42
4.3 Gene PRKCB	42
4.4 Gene KCNE3.....	43
4.5 Gene SLC44A2	47
4.6 Variante intergênica rs4947296	57
4.7 Propostas	57
5. CONCLUSÃO	60
6. REFERÊNCIAS	61
7. ANEXOS.....	68
7.1 Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa da FCM/UNICAMP.....	68
7.2 Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa da FCM/UNICAMP do projeto anterior.	73
7.3 TCLE de Reconsentimento.....	74
7.4 Ciclos das PCRs utilizadas neste trabalho.....	77

1. INTRODUÇÃO

1.1 A Perda Auditiva

O termo Perda Auditiva é considerado pela Organização Mundial da Saúde (OMS) para os casos onde há o comprometimento total ou parcial da capacidade auditiva no paciente; e a surdez é utilizada para descrever quadros onde há perda total da audição. Entretanto, em publicações relacionadas à genética, o termo Perda Auditiva é o mais empregado para descrever qualquer grau de comprometimento auditivo, uni ou bilateralmente, uma vez que perdas auditivas que possuem a mesma etiologia genética podem apresentar manifestações bastante variáveis. Sabendo-se que essa terminação pode não se aplicar a outros profissionais, como otorrinolaringologistas, por exemplo, e para evitar quaisquer complicações no entendimento deste estudo, o termo empregado em toda a dissertação será 'perda auditiva'.

A perda auditiva é o *déficit* sensorial mais frequente nos humanos. Esta condição restringe a expressão oral, interfere na vida social e econômica e pode levar a alterações no desenvolvimento cognitivo e psicológico do indivíduo afetado. Segundo a OMS, cerca de 466 milhões de pessoas são afetadas no mundo, sendo 34 milhões de crianças. No Brasil, cerca de 80 a 90% das crianças com algum tipo de perda auditiva não completam o ensino fundamental. (OMS, 2018; TOMBLIN *et al.*, 2014)

Em países desenvolvidos, um a cada 1000 recém-nascidos apresentam perda auditiva (OMS, 2018). No Brasil a estimativa geral é de quatro a cada 1000 nascimentos, podendo variar de acordo com a região estudada de 2 a 7 para cada 1000 nascimentos (OMS, 2018). Ainda segundo a OMS, a frequência de pessoas acima de 15 anos com perda auditiva superior a 41 dB é menor em países desenvolvidos do que nos subdesenvolvidos (Gráfico 1).

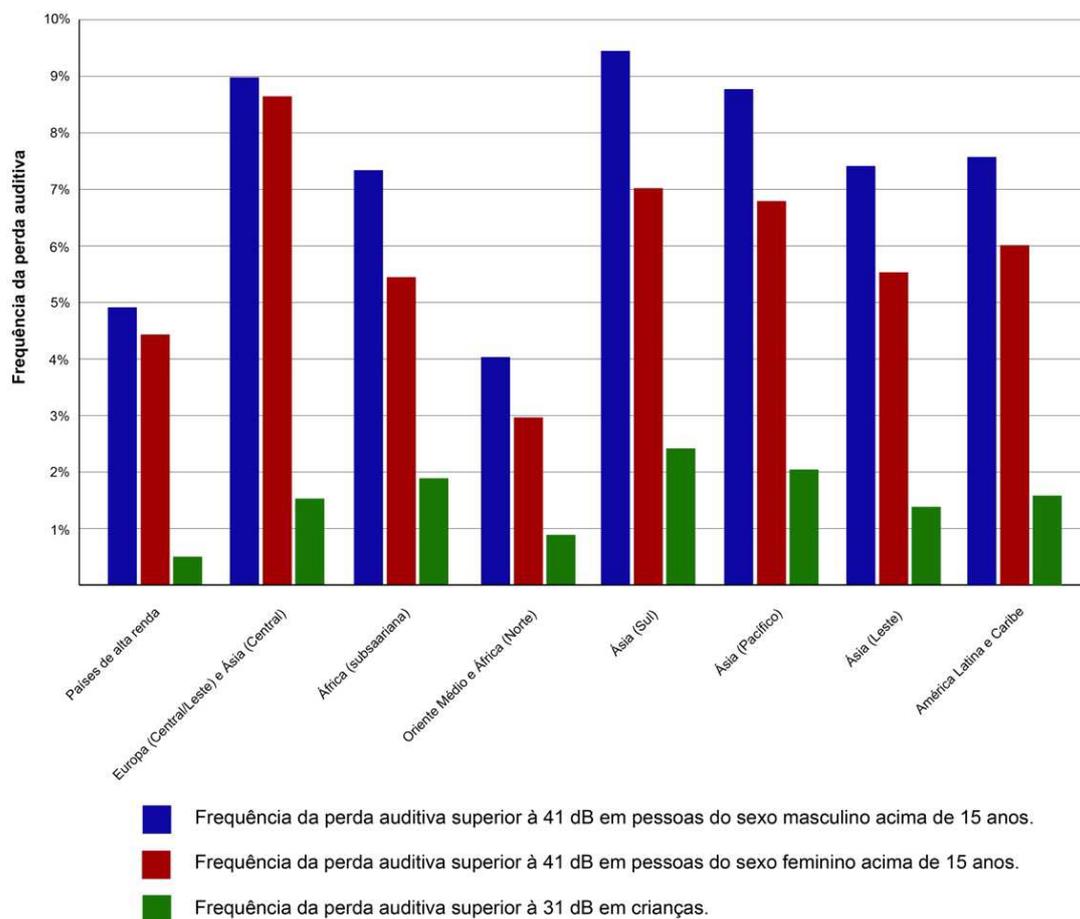


Gráfico 1. Frequência mundial de indivíduos afetados com perda auditiva (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 2017).

A PA pode ser classificada de diversas formas: o tipo (neurossensorial, condutiva ou mista); a idade de início (pré-lingual ou pós-lingual); a lateralidade (bilateral ou unilateral), a gravidade (leve, moderada, severa ou profunda); e a etiologia (genética ou ambiental, e sindrômica ou não-sindrômica). Tais classificações auxiliam os profissionais na determinação da causa, prognóstico, condução e linha de tratamento, bem como necessidade de testes genéticos, por exemplo, uma vez que há genes que predispõe uma perda auditiva com padrão já conhecido – por exemplo, idade de início e gravidade. (ITO, 2010; MARTINS 2017; ADAMOV, 2017).

De acordo com a localização da região afetada, que impede a propagação das ondas sonoras, a PA pode ser condutiva, neurossensorial ou mista. A condutiva ocorre devido a problemas na condução do som (causada

por problemas físicos na orelha externa e/ou média); a neurosensorial representa a perda por problemas na orelha interna que levam a um déficit na transdução mecânica das ondas sonoras, bem como no envio dos impulsos elétricos para o cérebro. Já a mista se dá quando o indivíduo apresenta tanto os problemas condutivos quanto neurosensoriais. (ITO, 2010; MARTINS 2017; ADAMOV, 2017).

A PA pré ou pós-lingual define a perda auditiva antes da aquisição da oralização ou após, respectivamente. A classificação de acordo com o grau de perda em decibéis pode ser leve (27-40 dB), moderada (41-55 dB), moderada/severa (56-70 dB), severa (71-90 dB) e profunda (superior a 90 dB) (ITO, 2010; MARTINS 2017; ADAMOV, 2017).

1.1.1 A etiologia das perdas auditivas

Como citado, a etiologia da PA pode ser por fatores ambientais e/ou genéticos (tabela 2). Estima-se que aproximadamente 40-50% dos casos sejam atribuídos a fatores ambientais, como exposição regular a sons de alta intensidade, traumas acústicos, uso de drogas ototóxicas e infecções virais. Já para os casos com etiologia genética (50-60%), os principais fatores incluem alterações em diferentes genes e/ou elementos regulatórios que estão envolvidos no desenvolvimento da estrutura e função do aparelho auditivo. Outro fator a ser levado em consideração é a queda na proporção de fatores ambientais da PA com a melhora do sistema de saúde, e dos avanços científicos no entendimento dos mecanismos genéticos. (DROR; AVRAHAM 2009; RAVIV; DROR; AVRAHAM, 2010; ANGELI *et al.*, 2012).

No Brasil, os casos de perda auditiva devido a fatores ambientais ainda são predominantes (66% dos casos), seguidos por 19% de etiologia desconhecida e 15% de herança genética (PUPO *et al.*, 2008).

Tabela 1. Fatores ambientais e genéticos envolvidos na perda auditiva (ADAMO, 2017)

Causas de perda auditiva		
Ambiental	Pré-Natal	Infecção materna (rubéola, citomegalovírus, sífilis, toxoplasmose, herpes)
		Uso de medicamentos ototóxicos durante a gestação
		Irradiação durante a gestação
	Peri-Natal	Pré-maturidade, Icterícia grave
		Trauma de parto
		Anóxia
	Pós-Natal	Terapia intensiva neonatal de mais de cinco dias
		Meningites, Otites
		Sarampo, Caxumba
		Exposição contínua a ruídos ou sons muito altos
Ventilação mecânica		
Traumatismos cranianos		
Genética	Síndrômico	Autossômico dominante
		Autossômico recessivo
		Ligada ao X
		Mitocondrial
	Não-Síndrômico	Autossômico dominante
		Autossômico recessivo
		Ligada ao X
		Ligada ao Y
		Mitocondrial

1.1.2 A genética da perda auditiva

Mais de 103 genes distribuídos em 150 *loci* já foram associados a perdas auditivas de origem genética (VAN CAMP & SMITH, 2012). Dentre esses genes, há predominância da relação entre as perdas auditivas com alterações no gene *GJB2* (GenBank 2706). Ele foi o primeiro gene a ser relatado na perda auditiva neurossensorial não-sindrômica, presente em aproximadamente 80% dos casos autossômicos recessivos (RABIONET *et al.*, 2000).

Já foram descritas na literatura mais de 400 síndromes que possuem a perda auditiva como sintoma (GIBSON, 2010). Essas síndromes compreendem um conjunto vasto de doenças hereditárias no qual a perda auditiva pode estar associada a diversos distúrbios do sistema nervoso, endócrino, cardiovascular, musculoesquelético entre outros. Uma das condições clínicas incluídas entre os quadros síndrômico é a Doença de Ménière (DM): um distúrbio que ocorre no ouvido interno caracterizado por sintomas de vertigem, perda auditiva neurossensorial, zumbido e plenitude auricular (GIBSON, 2010).

1.2A Doença de Ménière

Em 1861, Prosper Ménière descreveu a clássica tríade de vertigem episódica, perda de audição neurossensorial flutuante e zumbido. Atualmente, a DM continua sendo um dos maiores enigmas da dinâmica dos fluidos na orelha interna. É amplo o campo de estudo sobre essa doença, uma vez que entender a doença de Ménière é controlar a dinâmica dos fluidos labirínticos (ANDREWS, 2004).

A DM pode ocorrer em qualquer idade, sendo mais frequente em adultos entre 30-50 anos e menos comum em crianças e adultos jovens. A incidência varia dependendo da região geográfica e grupo étnico, contudo, parece ser mais frequente em caucasianos (AGRAWAL, *et al.*, 2013). Em 2010, o Instituto Nacional de Surdez e Outros Distúrbios de Comunicação (NIDCD) estimou que 615.000 indivíduos nos Estados Unidos apresentavam a doença de Ménière, com mais de 45 mil novos casos diagnosticados a cada ano. No Brasil, um estudo relata que a DM pode ser considerada a segunda labirintopatia mais prevalente na clínica (GANANÇA *et al.*, 2002).

A causa da DM ainda é desconhecida, provavelmente resulte de uma combinação de fatores ambientais e genéticos (multifatorial). Alguns possíveis fatores de risco que predisõem à doença incluem infecções virais, trauma na orelha interna, poluição sonora, alergias, respostas anormais do sistema imunológico, e enxaquecas (MERCHANT *et al.*, 2005; MINOR *et al.*, 2004; PAPARELLA, 1984; VRABEC, 2010).

Embora a maioria dos casos seja esporádico, o que significa que eles ocorrem em pessoas sem histórico da doença na família, casos onde se observa herança genética têm sido relatados, com uma prevalência entre 5 a 15% (VRABEC *et al.*, 2010; MORRISON *et al.*, 2009). Quando a doença é familiar, padrões de herança autossômica dominante e recessivo já foram descritos (ARWEILER *et al.*, 1995, MORRISON & JOHNSON, 2002).

Uma vez que se acredita que os sintomas de DM são causados por hidropisia endolinfática (HE) da orelha interna (SEMAAN *et al.*, 2005), genes envolvidos na regulação da homeostase têm sido considerados genes candidatos associados à DM. Alguns destes genes estão envolvidos com o

transporte de água da orelha interna, e outros regulam a composição iônica da endolinfa (VRABEC, 2010). Estudos têm focado principalmente nos genes Aquaporin - *AQP1-4* (MHATRE *et al.*, 2002, CANDREIA *et al.*, 2010), *KCNE1* e *KCNE3* (DOI *et al.*, 2005), *ADD1* regulador de atividade da bomba de Na⁺ e K⁺ (TEGGI *et al.*, 2008) e *COCH* (*coagulation factor C homolog*) (FRANSEN *et al.*, 1999) entre outros.

As aquaporinas (*AQP*) são poros celulares, ou canais de água responsáveis pelo movimento hídrico para dentro e para fora das células. Esse processo regulatório exige uma quantidade mínima de energia porque o fluxo da água segue o gradiente osmótico existente (Figura 1). Nos mamíferos existem 12 *AQPs* identificadas, cada uma com diferente localização tissular e diferentes propriedades regulatórias e de permeabilidade (ECKHARD, 2012).

Entre as *AQPs*, principalmente as isoformas 1-5 têm sido associadas à fisiopatologia da DM. A *AQP2* tem despertado especial interesse com relação a DM. Sua expressão na orelha interna tem sido investigada em vários estudos com resultados contraditórios. Alguns autores relatam a presença exclusiva da *AQP2* no saco endolinfático (KUMAGAMI *et al.*, 1998; BEITZ *et al.*, 1999; BEITZ *et al.*, 2003). Outros a identificaram apenas na membrana de Reissner (ZHONG, 2003), em particular nas estruturas que estão em contato com a endolinfa (MHATRE *et al.*, 2002), com predomínio nos giros médio e apical da cóclea (MERVES *et al.*, 2000).

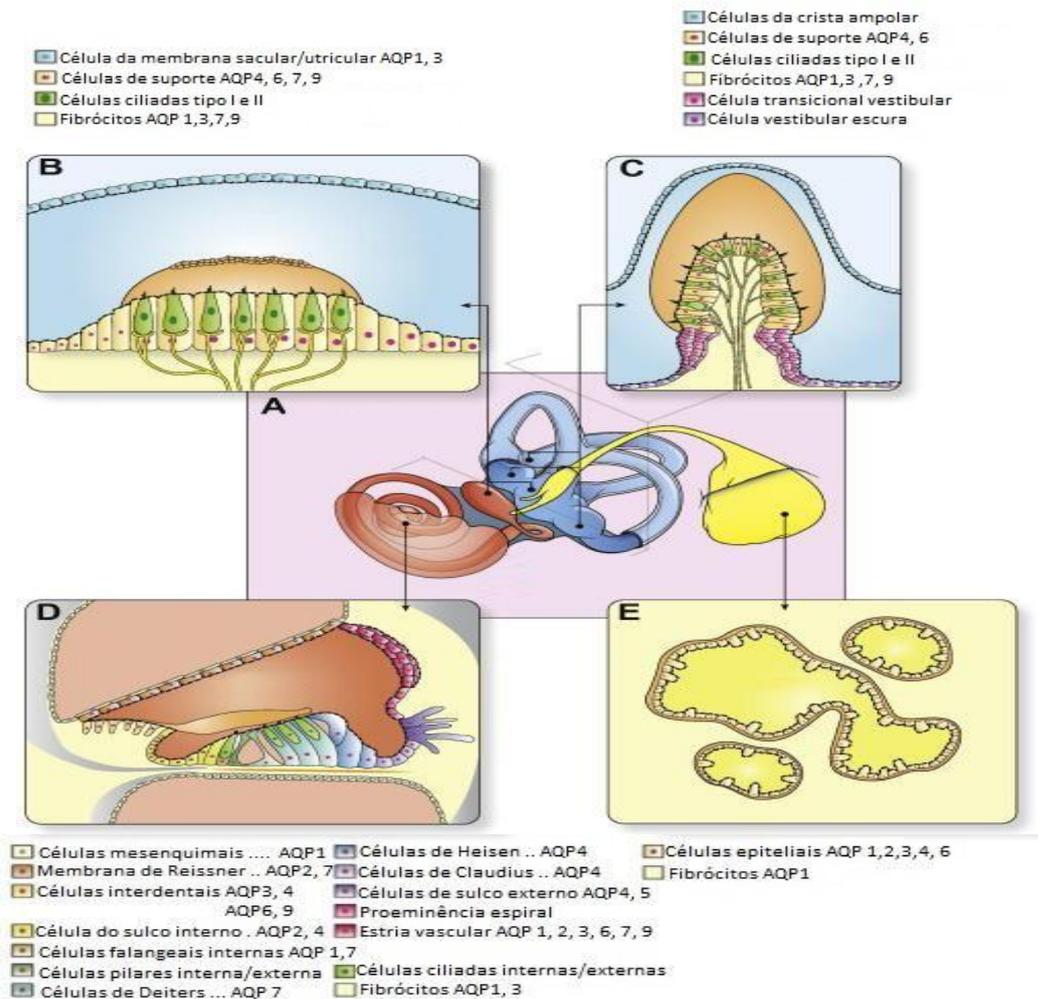


Figura 1. Representação esquemática da orelha interna e seus órgãos sensoriais com ilustração da expressão dos subtipos de AQP's em cada tipo celular (Modificado de ECKHARD *et al.*, 2012). (A) Labirinto membranoso, (B) Macula, (C) Ducto Coclear, (D) Órgão de Corti, (E) Saco endolinfático. (JENTSCH, 2000 *Nature Reviews/Neuroscience*).

As evidências da biologia molecular conduzem para uma nova visão de que a homeostase hídrica da orelha interna é regulada em parte via sistema vasopressina- Aquaporina 2 (VP-AQP2) e que a hidropisia endolinfática, característica morfológica da DM, reflete a má regulação deste sistema no fluido da orelha interna. Essa suposição é sustentada por evidências clínica e experimentais: níveis plasmáticos da VP estão elevados nos pacientes com DM (TAKEDA *et al.*, 1995; AOKI *et al.*, 2005); aplicação aguda e crônica de VP produz hidropisia endolinfática em cobaias e em ratos (KUMAGAMI *et al.*, 1998; TAKEDA *et al.*, 2000; KITANO *et al.*, 2001; TAKEDA *et al.*, 2003)

Além da AQP2, estudos apontam que na orelha interna a AQP5 também

desempenha uma provável função na regulação do volume de endolinfa por “secreção e reabsorção de água” (HIRT *et al.*, 2010). Neste papel, *AQP5* e *AQP2* podem mediar o fluxo de água bidirecionalmente entre a perilinfa e endolinfa, que depende do gradiente de pressão osmótica e hidrostática entre os dois compartimentos de fluido da orelha interna (NAKASHIMA *et al.*, 2012, ECKHARD *et al.*, 2012). Portanto, disfunções das *AQP5* e *AQP2* podem estar potencialmente envolvidas em doenças da orelha interna relacionadas com alteração da regulação do volume da endolinfa como ocorre nos casos de DM.

Estudos de expressão e função apontam um claro envolvimento dos genes das *AQPs* na homeostase da orelha interna (ISHIYAMA *et al.*, 2006). Contudo, apenas nos últimos anos estudos associando variantes nestes genes e DM têm sido realizados. Dessa forma, ainda há poucas informações sobre a real relevância dessas alterações na etiologia da doença.

Os canais de potássio são a maior e mais complexa família de canais iônicos, representada por pelo menos 70 *loci* do genoma humano (GUTMAN *et al.*, 2005). Na orelha interna canais compostos por proteínas *KCNE/KCNQ* estão presentes na membrana celular apical das células marginais, na estria vascular, onde desempenham a importante função de assegurar a homeostasia do K^+ (Figura 6). A perda da funcionalidade destes canais leva a uma redução do potencial elétrico da endolinfa, o que pode causar perda auditiva (JEFFREY *et al.*, 2010). Qualquer redução no gradiente de concentração de K^+ leva a uma redução do potencial de endolinfa, e isto pode reduzir a sensibilidade a estímulos auditivos (LOPES, 2015). Acredita-se que um processo semelhante ocorra nas células do epitélio marginal vestibular (JEFFREY *et al.*, 2010).

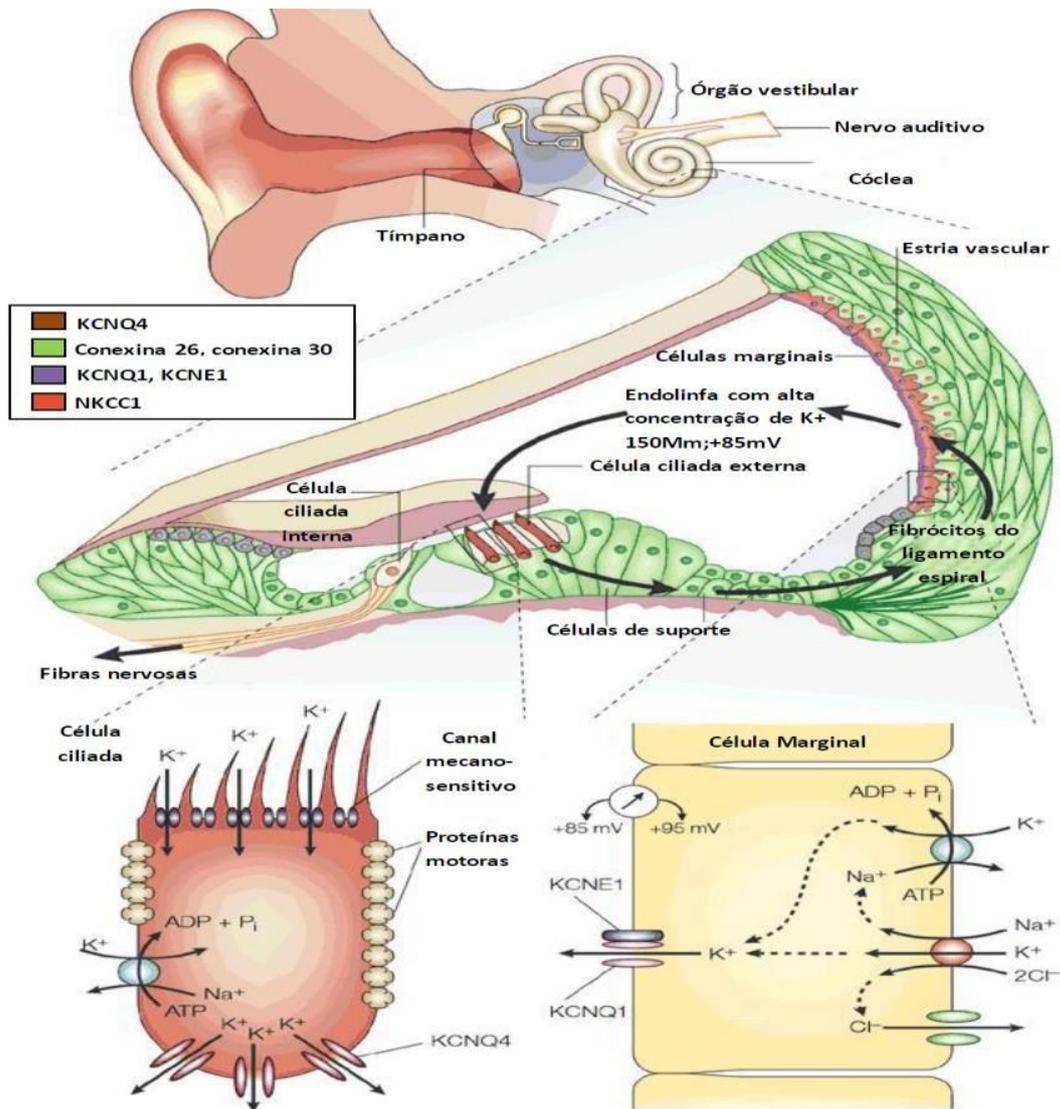


Figura 2. Desenho esquemático mostrando a via de reciclagem do K^+ na escala média da orelha interna e as localizações dos genes envolvidos (JENTSCH, 2000 *Nature Reviews/Neuroscience*).

A família do gene *KCNE* foi originalmente sugerida como candidata à DM por Doi e colaboradores (2005), que reportaram uma representação aumentada do alelo A no SNP rs1805127, no gene *KCNE1*, e do alelo C no SNP rs2270676 no gene *KCNE3* em pacientes japoneses com DM, o que poderia indicar um aumento da suscetibilidade a DM nesses casos. No entanto, Campbell e colaboradores (2010) não encontraram relação entre *KCNE1* e DM, mesmo o número de pacientes com DM estudado tenha sido consideravelmente grande (180). Por outro lado, Hietikko e colaboradores (2012) realizaram um estudo que incluiu mutações já reportadas em seis genes candidatos à DM, sendo eles, *AQP2*, *KCNE1*, *KCNE3*, *HCFC1*, *COCH* e *ADD1*.

Os indivíduos estudados eram finlandeses, com DM, sendo 38 casos esporádicos e 21 casos com história familiar. Em tal estudo apenas a variação rs1805127 no gene *KCNE1* foi identificada, corroborando os achados de Doi e col. (2005) e indicando, portanto, um possível envolvimento dessa variação com DM.

Devido à dificuldade de se detectar alterações moleculares associadas a DM, novos genes têm sido buscados na literatura na tentativa de se estabelecer uma correlação entre alterações nestes genes e a DM.

1.2.1 Gene *DPT*

O gene *DPT* está localizado na região 1q24.2 (GRCh38.p13) e contém 4 éxons, sendo apenas a parte inicial do quarto éxon codificante (MARTIN-SIERRA *et al.*, 2017; ENST00000367817.3). A proteína Dermato pontina, codificada pelo gene *DPT*, é uma proteína da matriz extracelular que contém 201 aminoácidos, e interage com proteínas da superfície celular e com proteoglicanos. Essa proteína é expressa em fibroblastos e interage com colágenos tipos I e II, além de manter a homeostase vascular. Ela é encontrada em vários tecidos e a maior parte das tirosinas é sulfatada. Estudos postulam que a Dermato pontina também modifica o comportamento do TGF-beta pela interação com a Decorina (MARTIN-SIERRA *et al.*, 2017; KATO *et al.*, 2011).

O gene *DPT* não havia sido relacionado à DM até recentemente, quando Martín-Sierra e colaboradores observaram uma variante nova em heterozigose segregando juntamente com a DM em uma família com expressividade variável da doença. Tendo em vista os níveis de expressão consideráveis do gene *DPT* nos tecidos cocleares e nos canais semicirculares humanos, alterações nas proteínas poderiam levar a mudanças fenotípicas significativas (MARTIN-SIERRA *et al.*, 2017).

1.2.2 Gene *SEMA3D*

A proteína Semaphorina, codificada pelo gene *SEMA3D*, está envolvida na inibição da motilidade e migração das células endoteliais, regulando as dinâmicas no citoesqueleto e a adesão celular. Este gene encontra-se na

posição 7q21.11 do genoma humano. (GRCh38.p13) e possui vinte éxons codificantes e possui um papel importante no desenvolvimento cardiovascular (MARTIN-SIERRA et al., 2017; ENST00000284136.10).

Assim como o gene *DPT*, o gene *SEMA3D* também não havia sido relacionado a alterações na audição até recentemente (2017), quando um estudo de exoma realizado por Martín-Sierra e colaboradores encontrou uma nova variante no éxon 15 deste gene segregando juntamente com o fenótipo da DM em uma família. Em tal estudo, o grupo sugere que essa variante provavelmente produz uma alteração funcional na sequência da proteína.

1.2.3 Gene SLC44A2

É sabido que alterações no gene *SLC44A2* (*locus* 19p13.2; GRCh38.p13) estão fortemente relacionadas a quadros de perda auditiva, porém apenas recentemente este se tornou um gene candidato nos estudos sobre a DM. Nas células de suporte do ouvido interno existe um tipo de antígeno da família das proteínas semelhantes às transportadoras de colina, o CLT2 (atualmente chamado de *SLC44A2*), que é alvo de alguns anticorpos relacionados a perdas auditivas autoimunes em humanos. A expressão do gene *SLC44A2* é extremamente importante na manutenção da homeostase do ouvido interno (THANKAM et al., 2016).

Um estudo de 1999 realizado por Thankam e colaboradores demonstrou que a ligação de anticorpo à proteína *SLC44A2* das células de suporte do ouvido interno pode atrapalhar a sobrevivência das células ciliadas e, conseqüentemente, a percepção do som (THANKAM et al., 1999).

Em 2016, Nair e colaboradores aventaram a possibilidade de que o gene *SLC44A2*, o qual possui sítios polimórficos implicados em doenças humanas, poderia conter alguma variante relacionada à DM. De fato, as variantes rs3087969 (éxon 4) e rs2288904 (éxon 7) em heterozigose, mostraram uma tendência à associação com a DM intratável comparada com a forma menos grave e controles normais (NAIR et al., 2016).

1.2.4 Gene *PRKCB*

O gene *PRKCB*, localizado no *locus* 16p12.2-p12.1, codifica uma proteína quinase-serina-e-treonina-específica que pode ser ativada por cálcio e diacilglicerol (MARTIN-SIERRA *et al.*, 2016). Esta proteína está envolvida em diversas funções celulares, como indução de apoptose em células endoteliais, por exemplo. Estudos em ratos sugerem que essa proteína modula funções neuronais e se associa a comportamentos conflituosos de medo induzido após situação de stress (MARTIN-SIERRA *et al.*, 2016).

A variante rs1131692056 (c.275G>T), localizada no éxon 3 do gene, envolve dois dos seis transcritos, e ambas são expressas no ouvido interno humano (MARTIN-SIERRA *et al.*, 2016). O estudo realizado por Martín-Sierra (2016) demonstrou que células com esta variante apresentaram alterações como: 1) nenhum contato com a membrana basilar; 2) uma posição diferente no topo a na lateral da parede do túnel externo; 3) isolamento de corpos celulares adjacentes; 4) uma superfície endolinfática extensa; e 5) um citoplasma escurecido (MARTÍN-SIERRA, 2016).

1.2.5 Variante rs4947296

Vários estudos têm descrito associações da DM com doenças autoimunes graves, como artrite reumatoide, lúpus e psoríase. Baseado nos resultados de estudos de proteômica realizados em pequenos grupos de pacientes, a autoimunidade tem sido proposta como uma potencial causa da DM, ainda que as evidências que suportem essa teoria sejam limitadas.

Contudo, ainda que o mecanismo de doenças autoimunes da orelha interna não seja bem compreendido ainda, os sintomas vestibulares dessas doenças também são encontrados em pacientes com DM bilateral, e estes pacientes apresentam níveis elevados de citocinas pró-inflamatórias, como Interleucinas pró-inflamatórias (IL 1, 2, 6, 7) e Fatores de Necrose Tumoral (TNF).

Além disso, alguns Fatores de Necrose Tumoral estão envolvidos em vias que modulam a inflamação em várias doenças autoimunes, como a Esclerose Múltipla, por exemplo. Um deles é o TNF indutor fraco de apoptose (TWEAK): uma citocina que regula várias respostas celulares e é ativada

através de seu receptor, Fn14, que por sua vez é altamente expresso nas células epiteliais. Essa ligação induz a ativação prolongada de uma das vias do Fator Nuclear Kappa B - NF- κ B, que é extremamente importante na regulação das respostas imunes e inflamatórias.

Diante disto, Frejo e colaboradores (2017) tentaram identificar *loci* de suscetibilidade a doenças autoimunes usando *Immune genotyping array*. Neste estudo, o grupo identificou uma variante intergênica, rs4947296, através de uma série de análises envolvendo bioinformática, estudos funcionais e estudos de expressão, concluíram que esta variante regula a expressão de uma série de genes, incluindo a via TWEK/Fn14-Fator Nuclear Kappa B – F- κ B.

A variante rs4947296 encontrada numa região intrônica do cromossomo 6 é um *locus* quantitativo de expressão trans (através de produtos difusos de outros genes), e regula a expressão de muitos genes da via TWEK/Fn14 em células mononucleares periféricas, levando a uma resposta inflamatória mediada por NF- κ B na DM (LOPEZ-ESCAMEZ, 2018). Portanto, essa alteração em específico já associada à DM bilateral poderia estabelecer uma relação entre a DM e respostas autoimunes.

Com este trabalho espera-se contribuir com a caracterização molecular da DM e, considerando os benefícios clínicos que os resultados podem gerar, contribuir para melhor prognóstico, tratamento e aconselhamento genético.

Conhecendo a alta prevalência da hidropisia endolinfática, sua vasta sintomatologia, muitas vezes incapacitante, e o impacto da sua repercussão clínica na qualidade de vida dos pacientes, estudos que almejem maiores esclarecimentos sobre sua fisiopatologia são de extrema importância, uma vez que aumentam o leque de possibilidades terapêuticas, contribuindo para a cura e/ou controle dessa enfermidade.

Portanto, pesquisas voltadas para a sua etiologia beneficiará grandemente o conhecimento genético e, certamente, permitirá um melhor entendimento da doença e uma melhora nas estratégias terapêuticas para o controle dos sintomas.

2. OBJETIVOS

2.1 Geral

Rastrear genes candidatos e suas variantes previamente associadas em indivíduos diagnosticados clinicamente com Doença de Ménière.

2.2 Específicos

- a) Investigar a região codificante dos genes *KCNE3* e *DPT*;
- b) Rastrear as variantes rs2288904 (*SLC44A2*), rs3087969 (*SLC44A2*), rs1057519374 (*SEMA3D*), rs1131692056 (*PRKCB*);
- c) Avaliar a patogenicidade das alterações detectadas e sua relação com o fenótipo da DM.
- d) Propor um algoritmo de diagnóstico da DM por meio do rastreamento da variante intergênica rs4947296.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Casuística

A casuística do presente estudo é composta por 30 indivíduos com idade entre 25 e 70 anos com Doença de Ménière (DM), esporádica ou familiar, diagnosticados de acordo com os critérios estabelecidos pelo Comitê de Audição e Equilíbrio da AAO-HNS (1995), em acompanhamento no ambulatório de Otoneurologia da disciplina de Otologia e Otoneurologia da Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP).

O recrutamento dos pacientes foi feito para um projeto do grupo de pesquisa anterior a este (Lopes, 2015). Com isso, para o presente estudo foram utilizadas apenas as amostras de DNA já armazenadas em biorrepositório. As avaliações clínicas e moleculares já realizadas nesta amostra de pacientes estão detalhadas a seguir. Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas sob o parecer de número 3.271.159 (Anexo 1).

Durante os atendimentos na UNIFESP, os indivíduos foram avaliados clinicamente e realizaram exames otoneurológicos como: audiometria e imitanciometria, documentação do limiar psicoacústico da audição; potencial evocado auditivo de tronco encefálico (PEATE), eletrococleografia, eletroneistagmografia e potencial evocado miogênico vestibular (VEMP) para avaliação objetiva da função do sistema vestibular. Aqueles que obtiveram o diagnóstico clínico de DM foram selecionados para investigação molecular da doença.

Todos os participantes receberam orientações sobre a triagem laboratorial da DM e concordaram em participar do estudo, assinando o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE), aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da UNIFESP (parecer 451.626), e autorizaram a coleta e o armazenamento de sua amostra biológica para estudos futuros.

Os indivíduos que apresentaram histórico de traumas, cirurgia otológica e doenças retrococleares; exames complementares inconclusivos; e (ou) que

não concederam consentimento formal mediante assinatura do TCLE foram excluídos deste projeto.

Após as coletas efetuadas no ambulatório de Otorrinolaringologia/UNIFESP, as amostras de sangue periférico dos indivíduos foram enviadas ao Laboratório de Genética Molecular Humana do Centro de Biologia Molecular e Engenharia Genética (CMBEG/UNICAMP), onde foram realizados a extração e o armazenamento de DNA genômico em biorrepositório, estabelecido em projeto anterior, aprovado pelo CEP/UNICAMP sob o parecer 895.704 (Anexo 2) e responsabilidade da pesquisadora Dra. Edi Lúcia Sartorato.

As análises moleculares já realizadas na amostra de pacientes foram as triagens dos genes *GJB2*, *GJB6* e *MTRNR1* para critério de exclusão, e dos genes da Aquaporina (*APQ2*, *AQP3*) e *KCNE1*. Tais resultados encontram-se descritos no projeto citado.

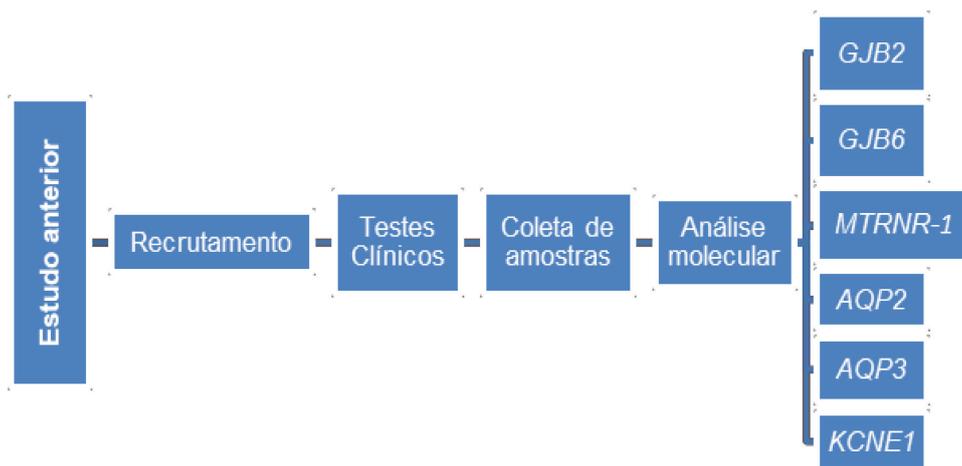


Figura 4. Fluxograma com desenho do projeto anterior realizado pelo grupo.

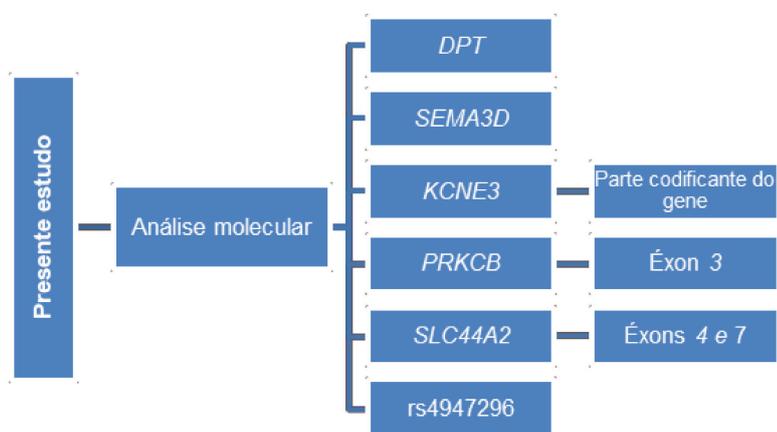


Figura 5. Fluxograma com desenho do presente projeto.

3.2 Caracterização da amostra

A casuística deste estudo é composta por pacientes não relacionados e sem consanguinidade conhecida.

Dos 30 pacientes que compõe este estudo, 19 são do sexo feminino e 11, do sexo masculino; há predominância da raça branca (67,7%); as idades variam de 29 a 64 anos, com mediana de 52 anos e com 20% de coeficiente de variação, caracterizando a amostra como simétrica e homogênea de acordo com o estudo realizado previamente por Lopes (2015) (Figura 6).

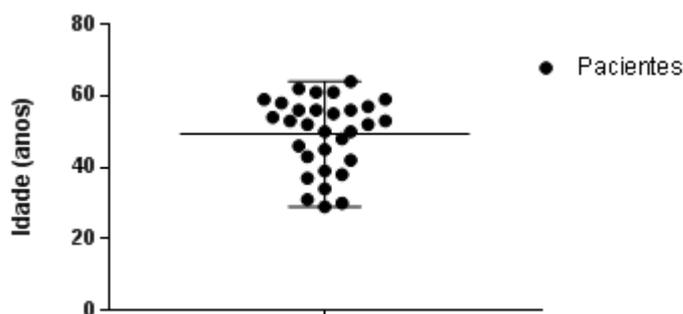


Figura 6. Análise descritiva da idade, em anos, nos pacientes com DM (Lopes, 2015).

A mediana é maior para o gênero feminino, assim como para a raça branca. A variabilidade da idade é maior entre os homens e os pacientes de raça não branca, conforme mostrado na figura 7 (Lopes, 2015).

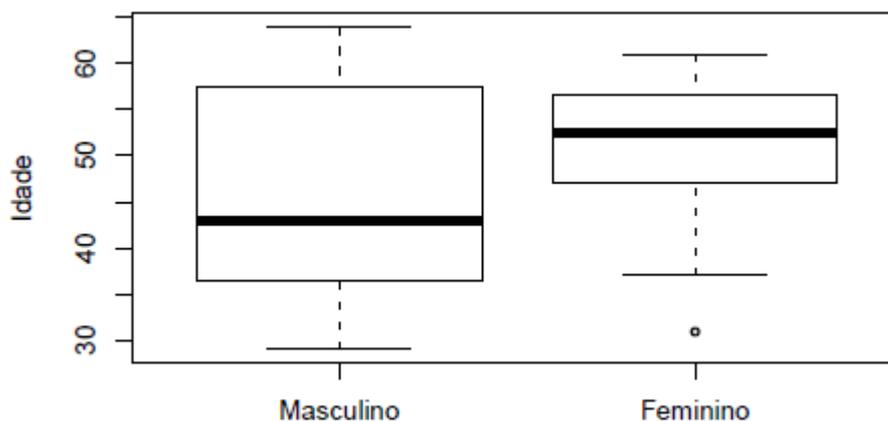


Figura 7. Variabilidade da idade em relação ao gênero nos pacientes com DM (Lopes, 2015).

Em relação ao tempo de doença auto relatado pelos pacientes, a mediana foi 5 anos, a média (desvio padrão) 7,6 (8,3) anos, variando de 0,5 a 40 anos, conforme ilustrado na Figura 8.

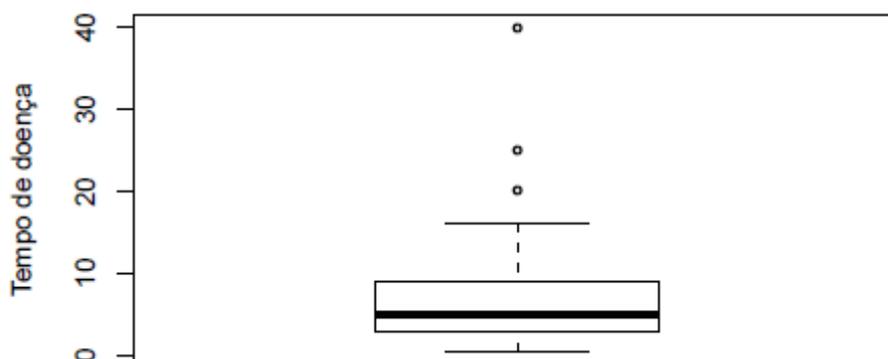


Figura 8. Variabilidade do tempo da doença nos pacientes com DM (Lopes, 2015).

De acordo com estudo prévio realizado por Lopes (2015), as características clínicas observadas nesta amostra são a prevalência do acometimento unilateral (77,4%) em relação à bilateral, sendo os casos esporádicos os mais encontrados entre os pacientes (80,6%). Os sintomas mais prevalentes na crise inicial da doença foram vertigem e zumbido, e a enxaqueca foi tida como a comorbidade mais prevalente na amostra (Quadro 1). Além disso, a mediana do tempo de doença referido pelos pacientes foi de cinco anos.

Quadro 1. Características clínicas dos pacientes com doença de Ménière (Lopes, 2015).

Uni/ Bilateral	História Familiar	Sintomas Iniciais	Perda Auditiva*	Enxaqueca	Média da Idade de início (mín-máx)
24/ 7	6	Vertigem: 22 Zumbido: 24 Perda auditiva: 17 Plenitude aural: 10	Estágio 1: 5 Estágio 2: 7 Estágio 3: 15 Estágio 4: 4	13 (41,9%)	41,5 anos (19 - 64)

(*)Classificação de acordo com AAO-HNS, 1995: média aritmética dos limiares tonais das frequências de 0,5, 1, 2 e 3 kHz. Média calculada para a pior orelha na doença de Ménière bilateral.

É importante ressaltar que o grau de perda auditiva não está diretamente relacionado ao tempo de evolução da doença nesta amostra estudada, conforme mostrou Lopes (2015) na figura 9.

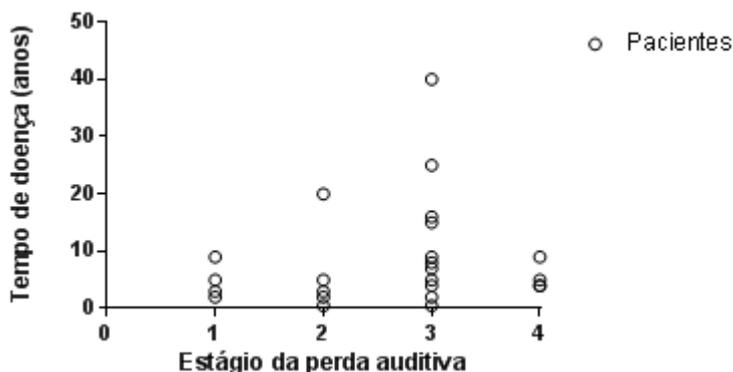


Figura 9. Relação entre perda auditiva e tempo de evolução da doença nos pacientes com DM (Lopes, 2015).

3.3 Rastreamento de genes e variantes

3.3.1 Padronização das Reações em Cadeia da Polimerase (PCR) e amplificação dos fragmentos

A análise molecular deste estudo foi realizada no Laboratório de Genética Molecular Humana do Centro de Biologia Molecular da Universidade Estadual de Campinas (CBMEG/UNICAMP), com aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP, sob o parecer 3.271.159 (Anexo 1).

A amplificação dos éxons foi feita por meio da técnica *PCR* (*Polymerase Chain Reaction*), com *primers* desenhados de acordo com as especificações descritas na tabela 2.

Tabela 2. Primers utilizados nas ampliações das sequências.

Gene	Localização	Banco de dados	Primers 5' → 3'	pb
<i>DPT</i>	Éxon 04	ENST00000367817.3	F – CTG CCA TGT CCT TTC TCA CT	398
			R – GCG CAC TGT ATA TGT GGT GT	
<i>SEMA3D</i>	Éxon 15	ENST00000284136.10	F – TAG TAC TGC ATC TGC CAC TG	197
			R – ATG GGA GAA AAA GCA TAT CA	
<i>PRKCB</i>	Éxon 03	ENST00000303531.11	F – ATG ATC TCT TCC TCC CTT TC	206
			R – GAC TGT GGA CAG AGA AAA GC	
<i>KCNE3</i>	Éxon 03	ENST00000310128.8	F – GCT TCT ACC GAG TCT TCC C	447
			R – GGA CAC TGA GAC CTG ATG C	
<i>SLC44A2</i>	Éxon 04	ENST00000335757.9	F – AGG AGT GGC AGT GTC TCA GT	195
			R – AGA TGG GGA ATG CCT AGA AT	
	Éxon 07	ENST00000335757.9	F – GGC AGT GGC AGT GTA CTA GA	206
			R – CTG CAT GGA GCA GAG GAT	
rs4947296	intergênica	Ensembl NC_000006.12	F – ATT ACA GGT GTG AGC CAC TG	244
			R – TTT TCC TTT CAG GTA TCT TGC	

Para um volume de 25µL de reação para os genes *DPT*, *SEMA*, *PRKCB*, *KCNE3* e *SLC44A2*, a padronização foi feita utilizando em torno de 50ng de DNA genômico, 200µM de cada desoxinucleotídeo trifosfato (dATP, dCTP, dGTP e dTTP), 5,0pmol de cada primer (*forward* e *reverse*), 2,5U da enzima Taq DNA polimerase em Tampão de PCR 10X (Tris-HCl 10mM pH 8,8), 25mM de MgCl₂, completando com água até o volume final.

Para a reação com a variante intergênica rs4947296, a padronização da reação foi feita com 500ng de DNA genômico, 200µM de cada desoxinucleotídeo trifosfato (dATP, dCTP, dGTP e dTTP), 5,0pmol de cada primer (*forward* e *reverse*), 2,5U da enzima Taq DNA polimerase em Tampão de PCR 10X ((NH₄)₂SO₄), 25 mM de MgCl₂, completando com água até o volume final de 10µL.

As ampliações foram realizadas em aparelho termociclador *Veriti® 96-Well Thermal Cycler (Applied Biosystems)*, sendo realizados 32 ciclos de aquecimento a 95°C para a desnaturação do DNA, seguido das temperaturas de 52°C a 57°C para o anelamento dos *primers*, e então de 72°C para a extensão das novas fitas. As condições da *PCR* para cada par de primer estão resumidas no anexo 4 deste trabalho. Os produtos de amplificação foram visualizados em gel de agarose 1%, após coloração com brometo de etídio.

3.3.2 Purificação dos produtos de *PCR*

Os fragmentos que foram amplificados pela técnica de *PCR* foram purificados utilizando-se o kit *Wizard SV Gel and PCR Clean-UP System* (Promega Corporation, EUA). Após a purificação, a quantidade e a pureza das amostras de DNA foram determinadas por densidade óptica em espectrofotômetro NanoDrop® ND-8000 (Thermo Scientific).

3.3.3 Reação para sequenciamento

As reações de sequenciamento para todos os genes foram executadas no sequenciador automático *ABI PRISM® 3700 DNA Analyzer* utilizando-se o *BigDye™ Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit* (Applied Biosystem, EUA), de acordo com o protocolo recomendado pelo fabricante. As reações foram constituídas de 40-80ng de DNA, 2µL do *Mix BigDye*, 1µL de *primer* (5pmol), completando com água deionizada para um volume final de 10µL. As condições de amplificação foram: 96 °C (1 min), seguido de 30 ciclos de 96 °C (10 seg), 57 °C (5 seg), 72 °C (30 seg), finalizando a 72 °C (5 min).

3.3.4 Análise das sequências obtidas

As sequências obtidas foram analisadas e comparadas com as sequências de referência dos genes, com o auxílio dos programas *Chromas Lite®* (http://www.technelysium.com.au/chromas_lite.html), *Gene Runner®* 3.01 (<http://www.generunner.net>) e *CLC Sequence Viewer* 6.1 (CLC bio A/S).

3.4 Estudo *in silico*

Para melhor compreensão das alterações nas proteínas codificadas pelos genes estudados, foram realizadas predições *in silico* das variantes encontradas nos pacientes através de duas plataformas específicas para variantes sinônimas: *Human Splicing Finder* e *SpliceAid*.

3.4.1 Human Splicing Finder 3.1 (HSF)

O HSF é uma plataforma online que pode ser acessada por meio do endereço eletrônico <<http://umd.be/HSF3/>> e combina 12 diferentes algoritmos para identificar e prever o efeito de alterações nos sítios de reconhecimento de *splicing* (“*splicing motifs*”), incluindo as regiões doadoras e aceptoras de *splicing*, o ponto de ramificação (“*branch point*”) e sequências auxiliares conhecidas por ativarem ou reprimirem o *splicing*: sequências Exônicas Ativadoras de *Splicing* (*Exonic Splicing Enhancers – ESE*) e sequências Exônicas Silenciadoras de *Splicing* (*Exonic Splicing Silencers – ESS*). Esses algoritmos são baseados em *Position Weight Matrices (PWM)*, *Maximum Entropy Principle (MEP)* ou *Motif Comparison Method (MCM)*. Um limiar de valor consensual e um limiar de pontuação da variante são pré-estabelecido para cada um deles baseado em dados da literatura.

Para as regiões doadoras ou aceptoras de *splicing*, os valores consensuais no *PWM* variam de 0 a 100 e no *MEP*, de -20 a +20; o limiar é definido em 65 (*PWM*) e 3 (*MEP*). Isso significa que todo sinal com uma pontuação acima do limiar é considerado um sítio de *splicing* (doador ou aceptor). Quando uma mutação ocorre, se o valor do alelo selvagem é acima do limiar e o valor da variante (entre alelo selvagem e mutante) é abaixo de -10% (*PWM*) ou -30% (*MEP*), é considerado que a alteração quebra o sítio de *splicing*. Por outro lado, se o valor do alelo selvagem é abaixo do limiar e o valor da variante é acima de +10% (*PWM*) ou +30% (*MEP*), é considerado que a alteração cria um novo sítio de *splicing*.

Os valores para o *Branch Point* também variam de 0 a 100 (*PWM*), e o limiar é definido em 67, sendo que todo sinal acima deste número é considerado um potencial *branch point*. Se o valor do alelo selvagem é acima do limiar e o valor da variante é abaixo de -10%, é considerado que a mutação quebra o *branch point*.

Em relação aos ESE e ESS, o valor consensual também varia de 0 a 100 (*PWM*) para cada um, mas o limiar é estabelecido de forma diferente para cada algoritmo. Todo sinal com um valor acima do limiar definido é considerado como um potencial ESE ou ESS. Se o valor do alelo selvagem é acima do limiar e o do alelo mutante é abaixo, é considerado que a mutação quebra o

ESE; e se o valor do alelo selvagem é abaixo do limiar e o do alelo mutante, acima, então é considerado que a alteração cria um novo ESS. Com o algoritmo *MCM*, se o sítio de reconhecimento de *splicing* que está sendo testado existe no banco de dados, é considerado como um potencial ESE ou ESS, também. Se o sítio de reconhecimento de *splicing* do alelo selvagem está presente no banco de dados, e o do alelo mutante, ausente, então é considerado que a mutação quebra o ESE; já se o do alelo selvagem está ausente no banco de dados, e o do alelo mutante está presente, é considerado que a mutação cria um novo ESS.

Finalmente, quando há a combinação de ambos ESEs e ESSs, o processo permanece o mesmo: se o sítio de reconhecimento testado existe no banco de dados, é considerado como potencial ESE ou ESS. Se o do alelo selvagem está presente no banco de dados e o do alelo mutante está ausente, é considerado que a mutação quebra o ESE; e se o do alelo selvagem está ausente no banco de dados, e o do alelo mutante está presente, é considerado que a mutação cria um novo ESS, assim como se fossem analisados separadamente.

A imagem 7 é uma imagem da interface da plataforma que exemplifica como interpretar os dados.

Sinal Predito	Algoritmo de Predição	Posição no cDNA	Interpretação
Novo sítio acceptor	1 - HSF Matrices		Ativação de um sítio acceptor exônico crítico, com presença de um ou mais <i>branch points</i> . Potencial alteração de <i>splicing</i> .
Novo sítio ESS	1 - Fas-ESS hexamers 2 - HSF Matrices - hnRNP A1		Criação de um sítio ESS. Potencial alteração de <i>splicing</i> .
Sítio ESE quebrado	1 - ESR Sequences from Goren et al. 2 - EIEs from Zhang et al.		Alteração de um sítio ESE. Potencial alteração de <i>splicing</i> .

Figura 7. Tabela explicativa de como interpretar os dados obtidos na predição *in silico* usando o *HSF*. (Modificado de <<http://umd.be/HSF3/technicaltips.html>>)

3.4.2 SpliceAid 2

Esta ferramenta procura os sítios de reconhecimento de *splicing* exatos em um banco de dados de seqüências de RNA-alvo estritamente avaliados experimentalmente. Com isso, ela é útil para predizer o efeito de mutações no

DNA ao nível de sequências-alvo de proteínas de ligação a RNA que determinam o padrão do *splicing* no mRNA. Nesta versão da plataforma, existem dados expressivos relacionados aos *splicing* retirados dos principais banco de dados de proteômica e transcritoma, de sítios de *splicing* 5' e 3', e sequências de *branch point*. Além disso, reúne 2,220 sítios-alvo de 62 proteínas humanas de *splicing* (que englobam tanto as proteínas das famílias SR – ativadoras de *splicing* – quanto as da família hnRNP – repressoras de *splicing*) e seus dados de expressão em 320 tecidos. Com isso, ele prevê os padrões de alteração de *splicing*, auxilia na identificação do efeito molecular das mutações e a entender *splicings* alternativos de tecido-específico.

Assim como no HSF, a imagem gerada pelo SpliceAid2 a partir das informações inseridas também possuem um limiar, mas não trabalha com números. Ao invés disso, ele mostra as proteínas envolvidas no *splicing* na região determinada. É importante fazer a comparação entre a sequência normal e a sequência mutante, para melhor visualização das alterações. As proteínas mostradas acima do limiar são ESEs, enquanto as mostradas abaixo são ESSs. A plataforma pode ser acessada através do website <http://193.206.120.249/splicing_tissue.html>.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste trabalho, 30 pacientes com hipótese diagnóstica da (DM) foram estudados. Vários genes e variantes foram rastreadas na tentativa da associação com a doença. A tabela 3 apresenta o resultado geral de todos os genes e variantes rastreados.

Todos os genes e variantes estudados foram rastreados baseados em prévios estudos realizados na literatura científica. Apesar da heterogeneidade clínica da DM, algumas variantes têm sido apontadas como relacionadas à DM, ou à sua suscetibilidade.

Como é possível observar na tabela, apenas seis pacientes relataram histórico familiar de DM. Contudo, não é possível inferir nenhuma correlação entre os achados do estudo com a hereditariedade da DM. Além disso, não foi possível contatar nenhum dos familiares para possível triagem neste momento.

Ao estudar o questionário de recrutamento de todos os pacientes, foi percebido que todos eles relataram períodos de grande estresse previamente ao início do aparecimento dos sintomas da DM. Esse fato sugere que fatores epigenéticos podem estar correlacionados à doença e, principalmente, ao aparecimento dos sintomas. Contudo, isso não havia sido relatado na literatura ainda; portanto, mais estudos são necessários a fim de corroborar e detalhar o quanto de influência fatores epigenéticos podem ter na DM.

Tabela 3. Resultados dos rastreamentos realizados até o momento.

Paciente	DPT	SEMA	PRKCB	KCNE3	SLC44A2 éxon 4	SLC44A2 éxon 7	rs4947296
1	rs12060879	-		-			
	rs78760104						
	rs114910915						
2	rs78760104	-	-	-	rs3087969	rs2288904	-
3	rs78760104	-	-	-			
4	rs12060879	-	-	-	rs3087969	rs2288904	-
	rs78760104						
5	rs78760104	-		-	rs3087969	-	-
6	rs78760104	-		-	rs3087969	-	-
7	rs78760104	-	-	-	rs3087969	rs2288904	-
8	rs78760104	-		-	rs3087969	rs2288904	
9	rs78760104	-		-	rs3087969	rs2288904	
10	rs78760104	-		-	rs3087969	rs2288904	-
11	rs78760104	-		rs2270676	rs3087969	rs2288904	
12	rs78760104	-		-	rs3087969	rs2288904	
13	rs12060879	-		rs2270676	rs3087969	rs2288904	
	rs78760104						
14	rs78760104	-		-	rs3087969	rs2288904	-
15	-	-		-	rs3087969	rs2288904	-
16	rs78760104	-		-	rs3087969	rs2288904	
17	rs78760104	-		rs2270676	rs3087969	rs2288904	
18	rs78760104	-		-	rs3087969	rs2288904	
19	rs78760104	-		rs2270676	rs3087969	rs2288904	
20	rs78760104	-		rs2270676	rs3087969	rs2288904	-
21	rs78760104	-		-	rs3087969	rs2288904	-
22	rs78760104	-		-	rs3087969	rs2288904	-
23	-	-		-	rs3087969	rs2288904	-
24	rs78760104	-		-	rs3087969	rs2288904	
25	rs12060879	-	-	-	rs3087969	rs2288904	
	rs78760104						
	rs58987681						
26	rs78760104	-		-	rs3087969	-	-
27	-	-		rs2270676	rs3087969	rs2288904	-
28	rs78760104	-		-	rs3087969	rs2288904	
29	-	-		-	rs3087969	rs2288904	-
30	rs78760104	-		-	rs3087969	-	-
	rs58987681						

Legenda: Pacientes em negrito possuem Histórico Familiar de DM.

*Campos preenchidos com (-) indicam que o paciente não possui alterações.

**Campos em branco indicam que o rastreamento ainda não foi realizado.

4.1 Gene DPT

Foram rastreados 30 pacientes para alterações no gene *DPT*. Foram encontradas as variantes rs12060879 em quatro pacientes, rs114910915 em um paciente, rs58987681 em dois pacientes, e rs78760104 em 26 pacientes, sendo que, apenas a primeira variante é exônica.

Tabela 4. Resultado do rastreamento de variantes no gene *DPT*.

Paciente	Alteração	Genótipo	Significado	Predição	Referência
1	rs12060879 (c.582C>T)	C/T	Exônica / Variante sinônima	Alteração de Sítio ESS intrônico	Ensembl SpliceAid2 HSF 3.1
	rs78760104 (c.*39_*40insA)	A/A	3 prime UTR variant	-	Ensembl
	rs114910915 (c.*61T>C)	T/C	3 prime UTR variant	-	Ensembl
2	rs78760104 (c.*39_*40insA)	-/A	3 prime UTR variant	-	Ensembl
3	rs78760104 (c.*39_*40insA)	A/A	3 prime UTR variant	-	Ensembl
4	rs12060879 (c.582C>T)	C/T	Exônica / Variante sinônima	Alteração de Sítio ESS intrônico	Ensembl SpliceAid2 HSF 3.1
	rs78760104 (c.*39_*40insA)	A/A	3 prime UTR variant	-	Ensembl
5	rs78760104 (c.*39_*40insA)	A/A	3 prime UTR variant	-	Ensembl
6	rs78760104 (c.*39_*40insA)	-/A	3 prime UTR variant	-	Ensembl
7	rs78760104 (c.*39_*40insA)	-/A	3 prime UTR variant	-	Ensembl
8	rs78760104 (c.*39_*40insA)	-/A	3 prime UTR variant	-	Ensembl
9	rs78760104 (c.*39_*40insA)	A/A	3 prime UTR variant	-	Ensembl
10	rs78760104 (c.*39_*40insA)	-/A	3 prime UTR variant	-	Ensembl
11	rs78760104 (c.*39_*40insA)	-/A	3 prime UTR variant	-	Ensembl
12	rs78760104 (c.*39_*40insA)	-/A	3 prime UTR variant	-	Ensembl
13	rs12060879 (c.582C>T)	C/T	Exônica / Variante sinônima	Alteração de Sítio ESS intrônico	Ensembl SpliceAid2 HSF 3.1
	rs78760104 (c.*39_*40insA)	A/A	3 prime UTR variant	-	Ensembl

14	rs78760104 (c.*39_*40insA)	A/A	3 prime UTR variant	-	Ensembl
15	-	-	-	-	-
16	rs78760104 (c.*39_*40insA)	-/A	3 prime UTR variant	-	Ensembl
17	rs78760104 (c.*39_*40insA)	A/A	3 prime UTR variant	-	Ensembl
18	rs78760104 (c.*39_*40insA)	A/A	3 prime UTR variant	-	Ensembl
19	rs78760104 (c.*39_*40insA)	A/A	3 prime UTR variant	-	Ensembl
20	rs78760104 (c.*39_*40insA)	-/A	3 prime UTR variant	-	Ensembl
21	rs78760104 (c.*39_*40insA)	A/A	3 prime UTR variant	-	Ensembl
22	rs78760104 (c.*39_*40insA)	-/A	3 prime UTR variant	-	Ensembl
23	-	-	-	-	-
24	rs78760104 (c.*39_*40insA)	A/A	3 prime UTR variant	-	Ensembl
25	rs12060879 (c.582C>T)	C/T	Exônica / Variante sinônima	Alteração de Sítio ESS intrônico	Ensembl SpliceAid2 HSF 3.1
	rs78760104 (c.*39_*40insA)	A/A	3 prime UTR variant	-	Ensembl
	rs58987681 (c.*171C>T)	C/T	3 prime UTR variant	-	Ensembl
26	rs78760104 (c.*39_*40insA)	-/A	3 prime UTR variant	-	Ensembl
27	-	-	-	-	-
28	rs78760104 (c.*39_*40insA)	-/A	3 prime UTR variant	-	Ensembl
29	-	-	-	-	--
30	rs78760104 (c.*39_*40insA)	-/A	3 prime UTR variant	-	Ensembl
	rs58987681 (c.*171C>T)	C/T	3 prime UTR variant	-	Ensembl

Legenda: Pacientes em negrito possuem Histórico Familiar de DM.

O gene *DPT* foi selecionado para este estudo principalmente baseado no fato de uma nova variante, c. 544C<T (rs748718975), ter sido observada em três irmãs com DM que possuíam histórico de doença autoimune, e em dois outros indivíduos com fenótipo incompleto da doença por Martín-Sierra em 2017. Trata-se de uma alteração *missense* rara (MAF: < 0.01) que leva à troca do aminoácido Arginina por uma Cisteína na posição 182 da proteína. Essa

alteração não foi observada em nenhum dos pacientes estudados até o momento.

A variante exônica rs12060879 encontrada em quatro pacientes é uma alteração sinônima (p.Tyr194=), não havendo, portanto, alteração na sequência de aminoácidos da proteína. Contudo, o estudo *in silico* realizado pelas plataformas SpliceAid2 e HSF demonstrou que esta alteração exclui um Sítio Exônico Silenciador de *Splicing* (ESS), criando um novo sítio de *splicing* intrônico que provavelmente não tem impacto na proteína (Figuras 8 e 9). Entretanto, ainda não existem estudos funcionais na literatura sobre a variante. Essa variante foi encontrada em pacientes sem histórico familiar de sintomas da DM.



Figura 8. Imagem do resultado das predições *in silico* realizadas pela plataforma SpliceAid2 para a variante rs12060879. a) Resultado da predição como alelo selvagem; b) Resultado da predição com a variante, mostrando a perda do sítio ESS.

▼ Exonic Splicing Regulatory Sequences from Goren et al.				
Sequence Position	cDNA Position	Reference motif	Mutant motif	Variation
42	+42		tatgac	New Site

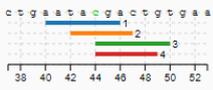
▼ Interpreted Data			
This table shows only relevant results related to the mutation position and context. The mutation occurs in the deep intronic positions, the following table show results of splicing and auxiliary sites that could be created by the mutation			
Predicted signal	Prediction algorithm	cDNA Position	Interpretation
New ESE Site	1 - EIEs from Zhang et al.		Creation of an intronic ESE site. Probably no impact on splicing.
	2 - ESR Sequences from Goren et al.		
	3 - ESE-Finder - SRp40		
	4 - RESCUE ESE Hexamers		

Figura 9. Imagem do resultado da predição *in silico* realizada pela plataforma HSF para a variante rs12060879 mostrando que provavelmente não há impacto na região de *splicing*.

As demais variantes encontradas nos pacientes na triagem para o gene *DPT* são intrônicas, na região 3' UTR, e não possuem qualquer relação com a Doença de Ménière.

4.2 Gene SEMA3D

Nenhuma alteração foi encontrada no éxon 15 deste gene em nenhum dos 30 pacientes triados, embora estudos realizados por Martín-Sierra e colaboradores (2017) tenham descrito e mostrado a variante rs1057519374 segregando juntamente com a DM em três indivíduos em uma família com expressividade variável da doença.

Com as modelagens da proteína e estudos funcionais, puderam constatar que esta é uma variante *missense* rara, porém não há descrição da frequência na população nos bancos de dados. A troca do aminoácido Prolina por uma Serina na posição 580 da proteína possivelmente causa uma alteração estrutural (MARTIN-SIERRA *et al.*, 2017).

4.3 Gene PRKCB

Quatro pacientes foram triados para o gene *PRKCB*, porém nenhuma alteração foi encontrada.

Recentemente, Martín-Sierra e colaboradores (2016) encontraram uma variante até então não descrita no gene *PRKCB* ao realizar o *Whole Exome*

Sequencing de uma família espanhola. Eles observaram a presença da variante em três indivíduos que possuíam a DM.

Por meio da técnica de *Real Time qPCR*, a qual foi utilizada para analisar a expressão gênica com o alelo selvagem e com o alelo alterado, eles demonstraram que a presença da variante diminuía a expressão do gene nas células da cóclea e do vestibulo (MARTÍN-SIERRA, 2016).

A variante foi descrita como *Missense*, com alteração da estrutura da proteína, e não foi encontrada em nenhum outro indivíduo em nenhum banco de dados de nenhuma população que o grupo pesquisou (MARTÍN-SIERRA, 2016).

4.4 Gene KCNE3

Trinta pacientes foram triados para a região codificante do gene *KCNE3*. Em seis pacientes (20%) sem histórico familiar da DM foi encontrada a variante de interesse rs2270676 (c.198T>C) em heterozigose (Figura 10). Todos os resultados estão resumidos na tabela 5.

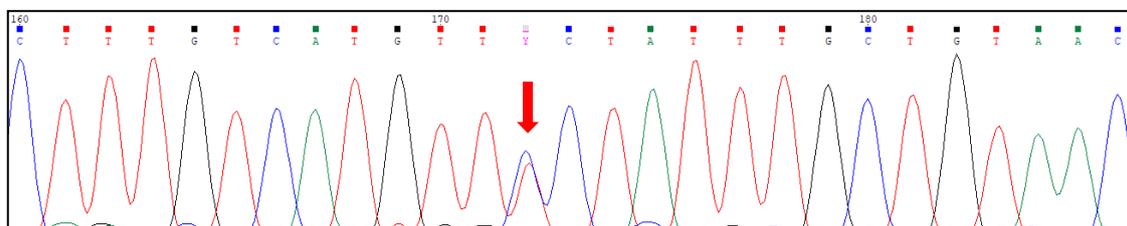


Figura 10. Eletoferograma mostrando a variante rs2270676 (c.198T>C) em heterozigose.

Tabela 5. Resultado do rastreamento de variantes no gene *KNCE3*.

Paciente	Alteração	Genótipo	Significado	Predições	Referência
1	Normal	T/T		-	-
2	Normal	T/T		-	-
3	Normal	T/T		-	-
4	Normal	T/T		-	-
5	Normal	T/T		-	-
6	Normal	T/T		-	-
7	Normal	T/T		-	-
8	Normal	T/T		-	-

9	Normal	T/T		-	-
10	Normal	T/T		-	-
11	rs2270676 (c.198T>C)	T/C	Exônica / Variante sinônima	Inconclusivas	Ensembl SpliceAid2 HSF 3.1 Mutation Taster SIFT
12	Normal	T/T		-	-
13	rs2270676 (c.198T>C)	T/C	Exônica / Variante sinônima	Inconclusivas	Ensembl SpliceAid2 HSF 3.1 Mutation Taster SIFT
14	Normal	T/T		-	-
15	Normal	T/T		-	-
16	Normal	T/T		-	-
17	rs2270676 (c.198T>C)	T/C	Exônica / Variante sinônima	Inconclusivas	Ensembl SpliceAid2 HSF 3.1 Mutation Taster SIFT
18	Normal	T/T		-	-
19	rs2270676 (c.198T>C)	T/C	Exônica / Variante sinônima	Inconclusivas	Ensembl SpliceAid2 HSF 3.1 Mutation Taster SIFT
20	rs2270676 (c.198T>C)	T/C	Exônica / Variante sinônima	Inconclusivas	Ensembl SpliceAid2 HSF 3.1 Mutation Taster SIFT
21	-	-		-	-
22	Normal	T/T		-	-
23	Normal	T/T		-	-
24	Normal	T/T		-	-
25	Normal	T/T		-	-
26	Normal	T/T		-	-
27	rs2270676 (c.198T>C)	T/C	Exônica / Variante sinônima	Inconclusivas	Ensembl SpliceAid2 HSF 3.1 Mutation Taster SIFT
28	Normal	T/T		-	-
29	Normal	T/T		-	-
30	Normal	T/T		-	-

Legenda: Pacientes em negrito possuem Histórico Familiar de DM.

A variante rs2270676 (c.198T>C) é um polimorfismo (MAF: 0.14) que não altera a sequência de aminoácidos da cadeia polipeptídica. Estudos sobre

essa variante têm sido realizados na tentativa de associá-la à DM, uma vez que o gene em que ela se encontra tem uma expressão dominante no saco endolinfático, e os canais *KCNE3* são expressos intensamente no epitélio da porção distal (DOI *et al.*, 2005).

Contudo, os estudos têm se mostrado contraditórios: enquanto DOI e colaboradores (2005) estabeleceu uma associação entre esta variante e a DM esporádica em um estudo de população japonesa com pacientes controles e diagnosticados com a DM, Campbell e colaboradores (2010) não obtiveram sucesso na replicação dos dados no estudo com caucasianos, pois as frequências encontradas no grupo controle foram significativas, e refutava a associação com a DM. Neste estudo, Campbell chegou à conclusão que a população controle de Doi não era fidedigna de representar a população geral, pois este não indicou a origem da casuística, nem se eram geneticamente compatíveis, e já foi reportado que dependendo da região japonesa, uma subestrutura populacional pode existir e levar a associações falsas (CAMPBELL *et al.*, 2010).

Estudos *in silico* desta variante realizados por três plataformas diferentes também mostram resultados contraditórios. A predição pela plataforma SpliceAid2 mostrou que a alteração leva à perda de um sítio ESE e um ESS (Figura 11), enquanto a plataforma HSF indica que há apenas a criação de um sítio ESSE intrônico, sem provável impacto no splicing (Figura 12).



Figura 11. Imagem do resultado das predições *in silico* realizadas pela plataforma SpliceAid2 para a variante rs2270676. a) Resultado da predição com o alelo selvagem; b) Resultado da predição com a variante, mostrando a perda dos sítios ESS e ESE.

Interpreted Data			
This table shows only relevant results related to the mutation position and context. The mutation occurs in the deep intronic positions, the following table show results of splicing and auxiliary sites that could be created by the mutation			
Predicted signal	Prediction algorithm	cDNA Position	Interpretation
New ESE Site	1 - ESE-Finder - SC35		Creation of an intronic ESE site. Probably no impact on splicing.
	2 - EIEs from Zhang et al.		

Figura 12. Imagem do resultado da predição *in silico* realizada pela plataforma HSF para a variante rs2270676, mostrando que há a criação de um sítio ESE intrônico, que provavelmente não tem impacto no *splicing*.

Em contrapartida com esta última análise, a predição realizada pela plataforma *Mutation Taster* indica que há alteração no sítio de *splicing* e que a estrutura da proteína pode ser afetada (Figura 13). Numa quarta predição *in silico*, realizada pela plataforma SIFT, é informado que a alteração é tolerada (não patogênica), com uma pontuação de 0,93 (Figura 14).

Mutation Taster [documentation](#)

mutation t@sting

Prediction **polymorphism** Model: *without_aae*, prob: 1.6923898722397e-10 (classification due to TGP/ExAC, **real probability is shown anyway**) [\(explain\)](#)

Summary [hyperlink](#)

- homozygous in TGP or ExAC
- protein features (might be) affected
- splice site changes

Figura 13. Imagem do resultado da predição *in silico* realizada pela plataforma *Mutation Taster* para a variante rs2270676, mostrando há alteração do sítio de *splicing* e que as características da proteína podem ser afetadas.

https://sift.bii.a-star.edu.sg/sift-bin/catfile.csh?usr/local/web/www/sift/tmp/9f7f072184_sequences.siftresults.predictions+Predictions+PRE

Predictions

Substitution at pos 66 from F to F is predicted to be TOLERATED with a score of 0.93.
 Median sequence conservation: 4.32
 Sequences represented at this position:3

Figura 14. Imagem do resultado da predição *in silico* realizada pela plataforma *SIFT* para a variante rs2270676.

Com isso, estabelecer qualquer relação da variante rs2270676 com a DM ainda requer mais estudos, principalmente funcionais, para melhor entendimento das possíveis alterações estruturais causadas na proteína e seus resultados fenotípicos.

4.5 Gene SLC44A2

Os éxons 4 e 7 do gene *SLC44A2* foram rastreados para análise das variantes rs3087969 e rs2288904, já previamente relacionadas ao fenótipo de DM. Foram rastreados 28 pacientes, dentre os quais todos apresentaram a variante rs3087969 (Tabela 6) e apenas quatro não apresentaram a variante rs2288904 (Tabela 7).

A variante rs3087969 (c.198T>C) é um polimorfismo (MAF: 0.37) encontrado no éxon 4 do gene e que não altera a sequência de aminoácidos da proteína. Da casuística estudada, 17 pacientes (60,7%) são homocigotos (Figura 15) para esta alteração e 11, heterocigotos (39,3%) (Figura 16).

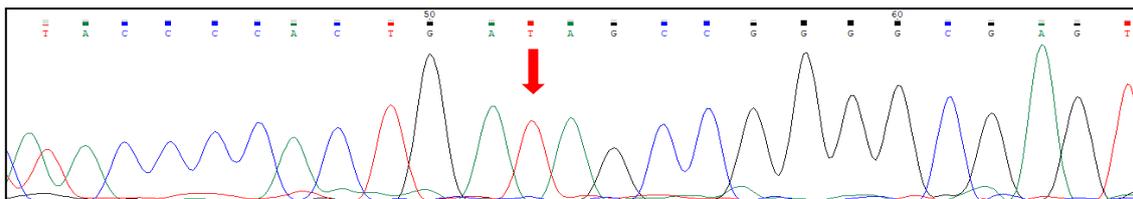


Figura 15. Eletroferograma mostrando a variante rs3087969 (c.198T>C) em homozigose.

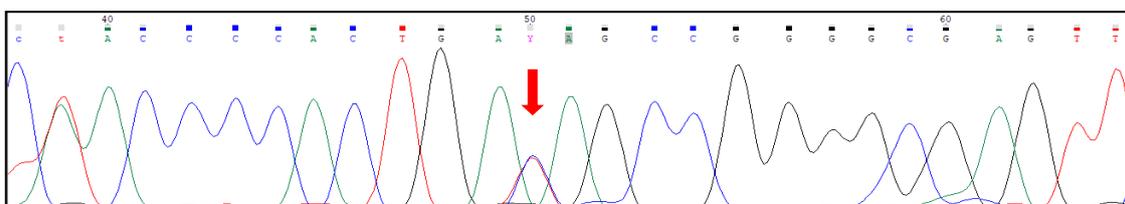


Figura 16. Eletroferograma mostrando a variante rs3087969 (c.198T>C) em heterozigose.

Tabela 6. Resultado do rastreamento de variantes no éxon 04 gene *SLC44A2*.

Paciente	Alteração	Genótipo	Significado Clínico	Predições
2	rs3087969 (c.198T>C)	T/C	Variante Sinônima	Inconclusivas
4	rs3087969 (c.198T>C)	T/T	Variante Sinônima	Inconclusivas
5	rs3087969 (c.198T>C)	T/C	Variante Sinônima	Inconclusivas
6	rs3087969 (c.198T>C)	T/C	Variante Sinônima	Inconclusivas
7	rs3087969 (c.198T>C)	T/C	Variante Sinônima	Inconclusivas
8	rs3087969 (c.198T>C)	T/C	Variante Sinônima	Inconclusivas
9	rs3087969 (c.198T>C)	T/T	Variante Sinônima	Inconclusivas
10	rs3087969 (c.198T>C)	T/C	Variante Sinônima	Inconclusivas
11	rs3087969 (c.198T>C)	T/T	Variante Sinônima	Inconclusivas
12	rs3087969 (c.198T>C)	T/T	Variante Sinônima	Inconclusivas
13	rs3087969 (c.198T>C)	T/T	Variante Sinônima	Inconclusivas
14	rs3087969 (c.198T>C)	T/T	Variante Sinônima	Inconclusivas
15	rs3087969 (c.198T>C)	T/C	Variante Sinônima	Inconclusivas
16	rs3087969 (c.198T>C)	T/T	Variante Sinônima	Inconclusivas
17	rs3087969 (c.198T>C)	T/T	Variante Sinônima	Inconclusivas
18	rs3087969 (c.198T>C)	T/T	Variante Sinônima	Inconclusivas
19	rs3087969 (c.198T>C)	T/T	Variante Sinônima	Inconclusivas
20	rs3087969 (c.198T>C)	T/T	Variante Sinônima	Inconclusivas
21	rs3087969 (c.198T>C)	T/C	Variante Sinônima	Inconclusivas
22	rs3087969 (c.198T>C)	T/T	Variante Sinônima	Inconclusivas
23	rs3087969 (c.198T>C)	T/C	Variante Sinônima	Inconclusivas
24	rs3087969 (c.198T>C)	T/T	Variante Sinônima	Inconclusivas
25	rs3087969 (c.198T>C)	T/T	Variante Sinônima	Inconclusivas
26	rs3087969 (c.198T>C)	T/C	Variante Sinônima	Inconclusivas
27	rs3087969 (c.198T>C)	T/T	Variante Sinônima	Inconclusivas
28	rs3087969 (c.198T>C)	T/T	Variante Sinônima	Inconclusivas
29	rs3087969 (c.198T>C)	T/T	Variante Sinônima	Inconclusivas
30	rs3087969 (c.198T>C)	T/C	Variante Sinônima	Inconclusivas

Legenda: Pacientes em negrito possuem Histórico Familiar de DM.

Foram realizadas análises de predição *in silico* em quatro plataformas a fim de se estabelecer uma assertiva patogenicidade fenotípica da alteração. Contudo, houve discrepâncias nos resultados.

Enquanto na plataforma SpliceAid2 foi obtido um resultado onde há a perda de um sítio ESS e de um sítio ESE (Figura 17), o HSF mostrou que há um potencial sítio de *splicing*, com criação de um sítio ESS intrônico e potencial

branch point (Figura 18); porém não indicou alterações relevantes para a função da proteína.

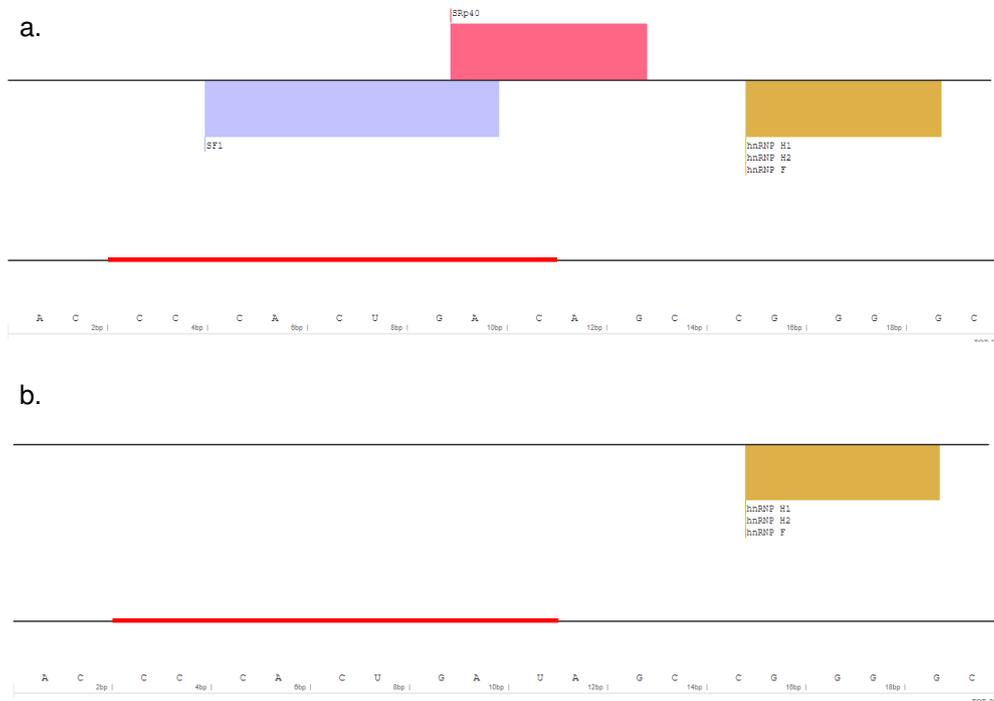


Figura 17. Imagem do resultado das predições *in silico* realizadas pela plataforma SpliceAid2 para a variante rs3087969. a) Resultado da predição com o alelo selvagem; b) Resultado da predição com a variante, mostrando a perda dos sítios ESS e ESE.

Potential splice sites	Potential Branch Points	Enhancer motifs	Silencer motifs	Other motifs				
▼ HSF Matrizes								
Sequence Position	cDNA Position	Splice site type	Motif	New splice site	Wild Type	Mutant	If cryptic site use, exon length variation	Variation (%)
5	+5	Acceptor	ccccactgacagcc	ccccactgatagCC	82.56	74.88	NA	-9.3
▼ Branch Points calculation is performed using a new algorithm.								
Sequence Position	cDNA Position	Branch Point motif	CV for reference sequence (0-100)	CV for mutant sequence (0-100)	Variation			
8	+8	cactgāc	88.2	84.3	-4.41 %			
▼ Silencer motifs from Sironi et al.								
Threshold values: Motif 1: 60 Motif 2: 60 Motif 3: 60 Variation expresses the difference between reference and mutant values. Wild Type value is taken as reference.								
Sequence Position	cDNA Position	Sironi Motif Reference	Reference silencer (value 0-100)	Sironi Mutant motif	Mutant silencer (value 0-100)	Variation		
11	+11			Motif 2 - [T/G]G[T/A]GGGG	tgatagc (62.22)	Positive silencer -16		

Figura 18. Imagem do resultado da predição *in silico* realizada pela plataforma HSF para a variante rs3087969, mostrando que há a criação de um sítio ESS intrônico, um potencial sítio de *splicing* e um potencial *branch point*.

Contudo, as predições realizadas pelas plataformas *Mutation Taster* e SIFT (Figuras 19 e 20) indicaram que com a variante rs3087969 há possível alteração da proteína, e que há mudança no sítio de *splicing*.

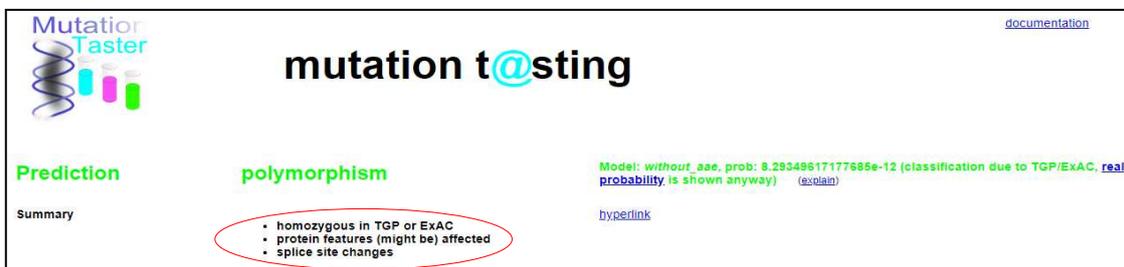


Figura 19. Imagem do resultado da predição *in silico* realizada pela plataforma *Mutation Taster* para a variante rs3087969, mostrando há alteração do sítio de *splicing* e que as características da proteína podem ser afetadas.

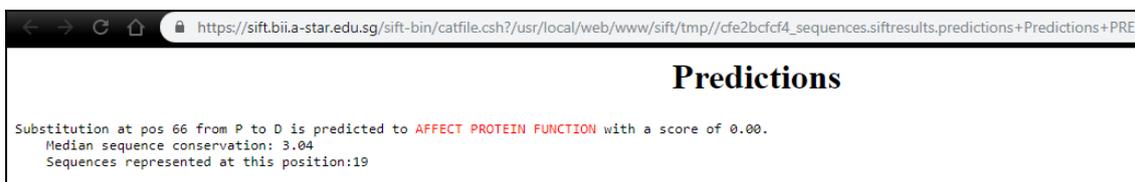


Figura 20. Imagem do resultado da predição *in silico* realizada pela plataforma *SIFT* para a variante rs3087969, indicando que há alteração na função da proteína.

Nenhuma outra variante foi encontrada no éxon 04 deste gene.

A variante polimórfica (MAF: 0.37) rs2288904 (c.455A>G) encontrada no éxon 07 do gene *SLC44A2* é uma alteração *missense* que leva à troca de uma Arginina por uma Glutamina na posição 154 da proteína. Dos pacientes triados, 17 (60,7%) apresentaram a alteração em homozigose, sete (25%) são heterozigotos e quatro (14,3%) não apresentaram nenhuma alteração neste éxon. Os eletroferogramas dos sequenciamentos mostrando a variante podem ser vistos nas figuras 21 e 22.

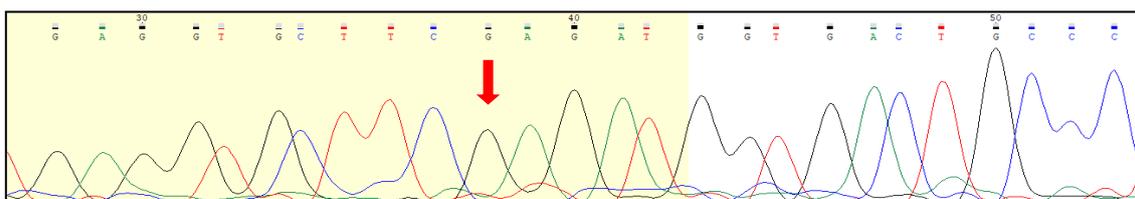


Figura 21. Eletroferograma mostrando a variante rs2288904 (c.455A>G) em homozigose.

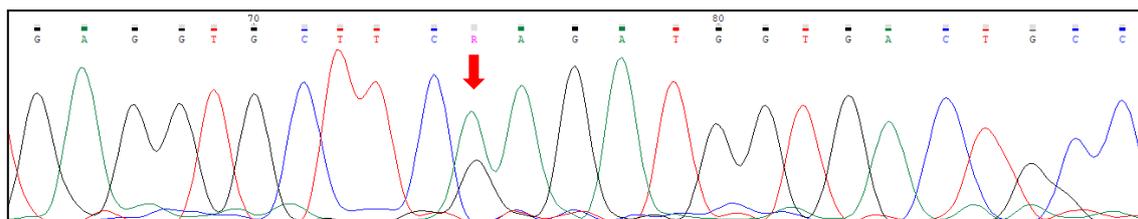


Figura 22. Eletroferograma mostrando a variante rs2288904 (c.455A>G) em heterozigose.

Tabela 7. Resultado do rastreamento de variantes no éxon 07 do gene *SLC44A2*.

Paciente	Alteração	Genótipo	Significado Clínico	Predição
2	rs2288904 (c.455A>G)	A/G	Variante missense	Inconclusivas
4	rs2288904 (c.455A>G)	G/G	Variante missense	Inconclusivas
5	-	-	-	-
6	-	-	-	-
7	rs2288904 (c.455A>G)	A/G	Variante missense	Inconclusivas
8	rs2288904 (c.455A>G)	A/G	Variante missense	Inconclusivas
9	rs2288904 (c.455A>G)	G/G	Variante missense	Inconclusivas
10	rs2288904 (c.455A>G)	A/G	Variante missense	Inconclusivas
11	rs2288904 (c.455A>G)	G/G	Variante missense	Inconclusivas
12	rs2288904 (c.455A>G)	G/G	Variante missense	Inconclusivas
13	rs2288904 (c.455A>G)	G/G	Variante missense	Inconclusivas
14	rs2288904 (c.455A>G)	G/G	Variante missense	Inconclusivas
15	rs2288904 (c.455A>G)	A/G	Variante missense	Inconclusivas
16	rs2288904 (c.455A>G)	G/G	Variante missense	Inconclusivas
17	rs2288904 (c.455A>G)	G/G	Variante missense	Inconclusivas
18	rs2288904 (c.455A>G)	G/G	Variante missense	Inconclusivas
19	rs2288904 (c.455A>G)	G/G	Variante missense	Inconclusivas
20	rs2288904 (c.455A>G)	G/G	Variante missense	Inconclusivas
21	rs2288904 (c.455A>G)	A/G	Variante missense	Inconclusivas
22	rs2288904 (c.455A>G)	G/G	Variante missense	Inconclusivas
23	rs2288904 (c.455A>G)	A/G	Variante missense	Inconclusivas
24	rs2288904 (c.455A>G)	G/G	Variante missense	Inconclusivas
25	rs2288904 (c.455A>G)	G/G	Variante missense	Inconclusivas
26	-	-	-	-
27	rs2288904 (c.455A>G)	G/G	Variante missense	Inconclusivas
28	rs2288904 (c.455A>G)	G/G	Variante missense	Inconclusivas
29	rs2288904 (c.455A>G)	G/G	Variante missense	Inconclusivas
30	-	-	-	-

Legenda: Pacientes em negrito possuem Histórico Familiar de DM.

As predições *in silico* realizadas neste estudo foram inconclusivas. De acordo com o SpliceAid2, há a criação de um sítio ESE na proteína (Figura 23). Já o HSF mostrou que há um potencial sítio de *splicing*, com criação de um sítio ESS intrônico e possível quebra de um *branch point*, com outros pontos de quebra de *splicing motifs* (Figura 24). A ferramenta não indicou alterações relevantes para a função da proteína.

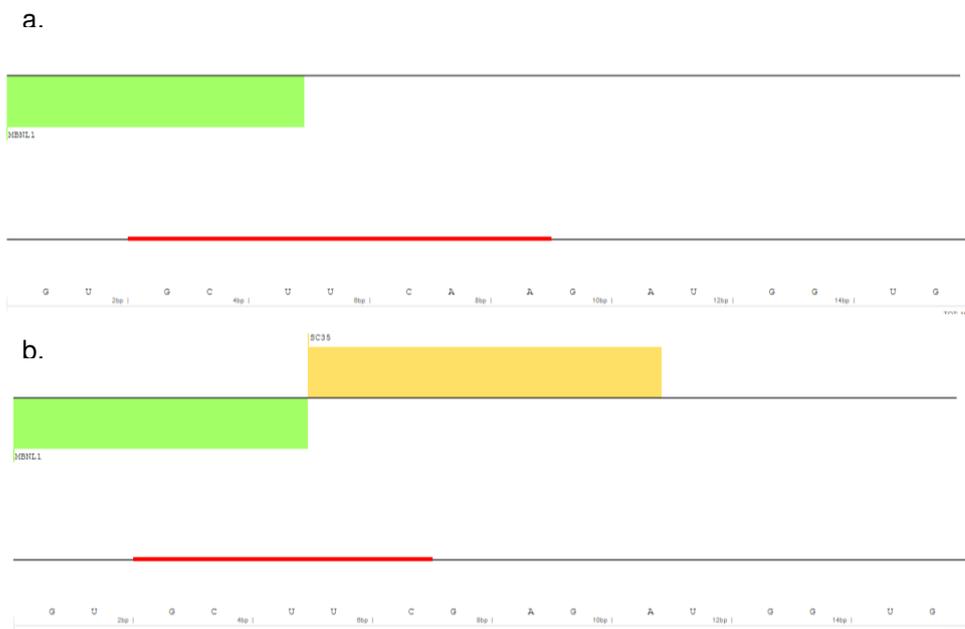


Figura 23. Imagem do resultado das predições *in silico* realizadas pela plataforma SpliceAid2 para a variante rs2288904. a) Resultado da predição com o alelo selvagem; b) Resultado da predição com a variante, mostrando a criação de um sítio ESE.

Potential splice sites	Potential Branch Points	Enhancer motifs	Silencer motifs	Other motifs																					
HSF Matrices <table border="1"> <thead> <tr> <th>Sequence Position</th> <th>cDNA Position</th> <th>Splice site type</th> <th>Motif</th> <th>New splice site</th> <th>Wild Type</th> <th>Mutant</th> <th>If cryptic site use, exon length variation</th> <th>Variation (%)</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>6</td> <td>+6</td> <td>Acceptor</td> <td>aggtgcttcaagat</td> <td>aggtgcttogaagAT</td> <td>74.2</td> <td>73.29</td> <td>NA</td> <td>-1.23</td> </tr> </tbody> </table>					Sequence Position	cDNA Position	Splice site type	Motif	New splice site	Wild Type	Mutant	If cryptic site use, exon length variation	Variation (%)	6	+6	Acceptor	aggtgcttcaagat	aggtgcttogaagAT	74.2	73.29	NA	-1.23			
Sequence Position	cDNA Position	Splice site type	Motif	New splice site	Wild Type	Mutant	If cryptic site use, exon length variation	Variation (%)																	
6	+6	Acceptor	aggtgcttcaagat	aggtgcttogaagAT	74.2	73.29	NA	-1.23																	
Branch Points calculation is performed using a new algorithm. <table border="1"> <thead> <tr> <th>Sequence Position</th> <th>cDNA Position</th> <th>Branch Point motif</th> <th>CV for reference sequence (0-100)</th> <th>CV for mutant sequence (0-100)</th> <th>Variation</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>10</td> <td>+10</td> <td>gcttcaaa</td> <td>67.91</td> <td>38.28</td> <td>Site broken</td> </tr> </tbody> </table>					Sequence Position	cDNA Position	Branch Point motif	CV for reference sequence (0-100)	CV for mutant sequence (0-100)	Variation	10	+10	gcttcaaa	67.91	38.28	Site broken									
Sequence Position	cDNA Position	Branch Point motif	CV for reference sequence (0-100)	CV for mutant sequence (0-100)	Variation																				
10	+10	gcttcaaa	67.91	38.28	Site broken																				
Silencer motifs from Sironi et al. <p>Threshold values: Motif 1: 60 Motif 2: 60 Motif 3: 60 Variation expresses the difference between reference and mutant values. Wild Type value is taken as reference.</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>Sequence Position</th> <th>cDNA Position</th> <th>Sironi Motif Reference</th> <th>Reference silencer (value 0-100)</th> <th>Sironi Mutant motif</th> <th>Mutant silencer (value 0-100)</th> <th>Variation</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>12</td> <td>+12</td> <td></td> <td></td> <td>Motif 1 - CTAGAGGT</td> <td>ttogagat (62.01)</td> <td>New site -22.6%</td> </tr> <tr> <td>14</td> <td>+14</td> <td>Motif 1 - CTAGAGGT</td> <td>caagatgg (73.55)</td> <td>Motif 1 - CTAGAGGT</td> <td>cgagatgg (71.75)</td> <td>-2.44 %</td> </tr> </tbody> </table>					Sequence Position	cDNA Position	Sironi Motif Reference	Reference silencer (value 0-100)	Sironi Mutant motif	Mutant silencer (value 0-100)	Variation	12	+12			Motif 1 - CTAGAGGT	ttogagat (62.01)	New site -22.6%	14	+14	Motif 1 - CTAGAGGT	caagatgg (73.55)	Motif 1 - CTAGAGGT	cgagatgg (71.75)	-2.44 %
Sequence Position	cDNA Position	Sironi Motif Reference	Reference silencer (value 0-100)	Sironi Mutant motif	Mutant silencer (value 0-100)	Variation																			
12	+12			Motif 1 - CTAGAGGT	ttogagat (62.01)	New site -22.6%																			
14	+14	Motif 1 - CTAGAGGT	caagatgg (73.55)	Motif 1 - CTAGAGGT	cgagatgg (71.75)	-2.44 %																			
Exonic Splicing Regulatory Sequences from Goren et al. <table border="1"> <thead> <tr> <th>Sequence Position</th> <th>cDNA Position</th> <th>Reference motif</th> <th>Mutant motif</th> <th>Variation</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>12</td> <td>+12</td> <td>ttaag</td> <td></td> <td>Site broken</td> </tr> <tr> <td>14</td> <td>+14</td> <td>caagat</td> <td></td> <td>Site broken</td> </tr> </tbody> </table>					Sequence Position	cDNA Position	Reference motif	Mutant motif	Variation	12	+12	ttaag		Site broken	14	+14	caagat		Site broken						
Sequence Position	cDNA Position	Reference motif	Mutant motif	Variation																					
12	+12	ttaag		Site broken																					
14	+14	caagat		Site broken																					

Figura 24. Imagem do resultado da predição *in silico* realizada pela plataforma HSF para a variante rs2288904, mostrando que há a criação de um sítio ESS intrônico, um potencial sítio de *splicing*, uma possível quebra de um *branch point*, e possíveis quebras de outros *splicing motifs*.

As predições realizadas pela plataforma *Mutation Taster* indicam que há alteração no sítio de *splicing* com possível alteração da estrutura da proteína (Figuras 25), enquanto resultados obtidos pelo SIFT indicaram que a variante é considerada Tolerada (Figura 26).



documentation

mutation t@sting

Prediction

Summary

polymorphism

- amino acid sequence changed
- homozygous in TGP or ExAC
- protein features (might be) affected
- splice site changes

Model: *simple_aae*, prob: 0.99999883227316 (classification due to TGP/ExAC, [real probability is shown anyway](#))
(explain)

[hyperlink](#)

Figura 25. Imagem do resultado da predição *in silico* realizada pela plataforma *Mutation Taster* para a variante rs2288904, mostrando há alteração do sítio de *splicing* e que as características da proteína podem ser afetadas.

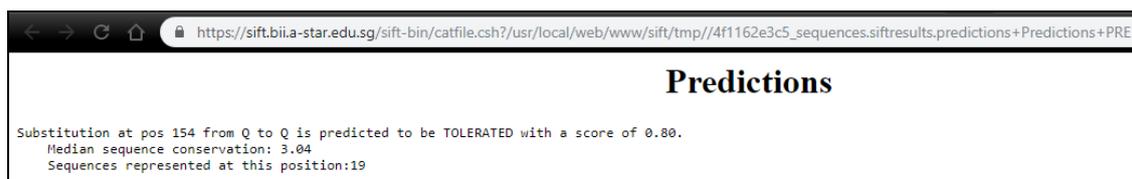


Figura 26. Imagem do resultado da predição *in silico* realizada pela plataforma *SIFT* para a variante rs2288904.

Um último estudo *in silico* foi realizado utilizando a plataforma *Polyphen*, uma vez que, a alteração é *missense*. Os resultados obtidos indicam que a variante rs2288904 é benigna (Figura 27).

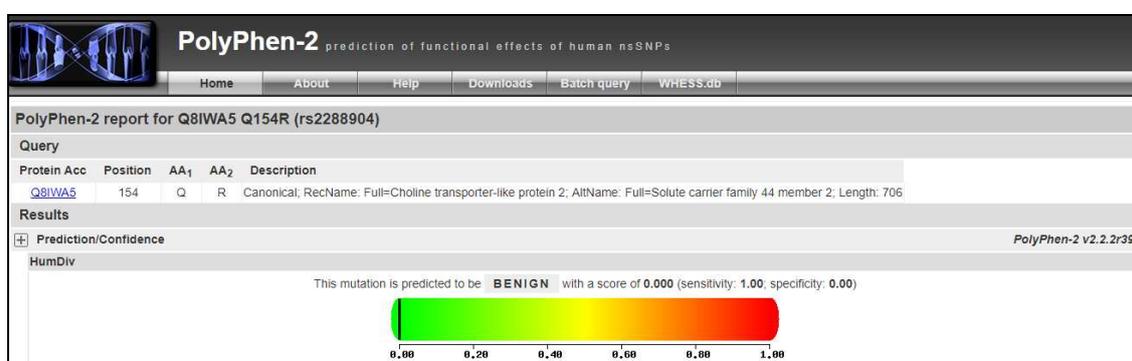


Figura 27. Imagem do resultado da predição *in silico* realizada pela plataforma *Polyphen* para a variante rs2288904.

Apesar dos resultados inconsistentes das predições *in silico* realizadas neste trabalho, um estudo recente de análise dessas duas variantes estabeleceu uma relação entre essas e a DM.

Thankam e colaboradores, em 2016, propuseram que o gene *SLC44A2* poderia ter um papel importante na DM, uma vez que a variante rs2288904 ocasiona a troca de uma Arginina (positivamente carregada) para uma Glutamina (polar neutra), e talvez a expressão em heterozigose do gene pudesse afetar o dobramento da proteína ou as funções das moléculas, interferindo assim na homeostase do ouvido interno. (THANKAM *et al.*, 2016).

Para tanto, foram selecionadas amostras de pacientes com DM que respondiam a tratamento medicamentos (diuréticos diários combinados com supressores vestibulares e dieta restrita de sódio), e pacientes com DM grave que não respondiam aos remédios e recorriam à cirurgia para controle dos sintomas. Após análises, resultados mostraram que a variante polimórfica

rs2288904 parecia estar em desequilíbrio de ligação com um segundo polimorfismo, rs3087969, uma variante sinônima, e ambas possuíam a mesma distribuição alélica, com exceção de um paciente. A relação entre esses dois polimorfismos não havia sido descrita até então (THANKAM *et al.*, 2016).

Outro resultado importante de ser apontado do estudo citado é que entre os pacientes tratados cirurgicamente, 43% possuíam a variante rs2288904 em heterozigose, enquanto os que respondiam ao tratamento medicamentoso apresentaram a mesma variante em heterozigose em 27% dos casos. No grupo controle, a variante foi encontrada em 31% e corresponde à distribuição esperada. Com isso, esse grupo concluiu que as proteínas produzidas pelos dois alelos da variante rs2288904 interagem de forma a aumentar o risco de desenvolver vertigem e outros sintomas graves que precisam de intervenção cirúrgica. Além disso, desequilíbrio de ligação entre as duas variantes, rs2288904 e rs3087969, interferem na homeostase do ouvido interno, sugerindo uma maior predisposição à forma grave da DM.

Sete pacientes deste presente estudo apresentaram ambas variantes em heterozigose, como mostra a Tabela 8.

Tabela 8. Pacientes com as variantes no gene *SLC44A2* encontradas em heterozigose

Paciente	Éxon 07		Éxon 04	
	Alteração	Genótipo	Alteração	Genótipo
2	rs2288904	A/G	rs3087969	C/T
7	rs2288904	A/G	rs3087969	C/T
10	rs2288904	A/G	rs3087969	C/T
15	rs2288904	A/G	rs3087969	C/T
21	rs2288904	A/G	rs3087969	C/T
23	rs2288904	A/G	rs3087969	C/T

Entretanto, análises de prontuários destes pacientes não corroboram a relação das variantes rs2288904 e rs3087969 com a forma grave da DM. Apesar de apenas ter sido possível acompanhar a evolução da DM em quatro dos sete pacientes devido ao não retorno dos outros pacientes às consultas ambulatoriais desde 2014, dois dos pacientes mantiveram os sintomas estáveis

respondendo ao tratamento, e dois tiveram uma melhora significativa dos sintomas após o tratamento, os quais não necessitaram mais uso dos medicamentos e os sintomas não reapareceram desde então. Esses achados contradizem com os achados de Thankam e colaboradores e não suportam a teoria de que as duas variantes em heterozigose estariam associadas ao quadro mais grave da DM.

4.6 Variante intergênica rs4947296

Recentemente, Frejo e colaboradores associaram a alteração rs4947296 com a DM bilateral em um estudo funcional, onde as implicações fenotípicas dessa variante puderam ser elucidadas (FREJO *et al.*, 2017).

Em estudo funcional realizado por esse grupo, foi possível demonstrar que a variante rs4947296 regula a expressão gênica nas vias TWEAK/Fn14. A variante está localizada na região 6p21.33, que é um *trans-expression quantitative locus* (trans-eQTL) em células mononucleares do sangue periférico (PBMCs) e em linhagens de células linfoides (LCLs), e regula a tradução *Nuclear factor kappa B* (NF-κB) nas LCLs, que, por sua vez, regula as respostas imunes e inflamatórias no corpo. O experimento demonstrou que o TWEAK induz uma segregação significativa das LCLs nos pacientes com a variante (FREJO *et al.*, 2017).

Diante disso, outro estudo realizado por Gallego-Matínez e colaboradores (2018) também estabeleceu relação entre a variante e a DM bilateral, e em pacientes com DM e doenças autoimunes.

A alteração não foi encontrada em nenhum dos indivíduos estudados, sugerindo que nenhum deles possui uma etiologia autoimune da DM.

4.7 Propostas

Na tentativa de facilitar a identificação de alterações moleculares para um melhor prognóstico molecular da DM e, com isso, um tratamento personalizado, Gallego-Martinez e colaboradores (2018) sugeriu um possível algoritmo para a análise molecular dos pacientes (Figura 28).

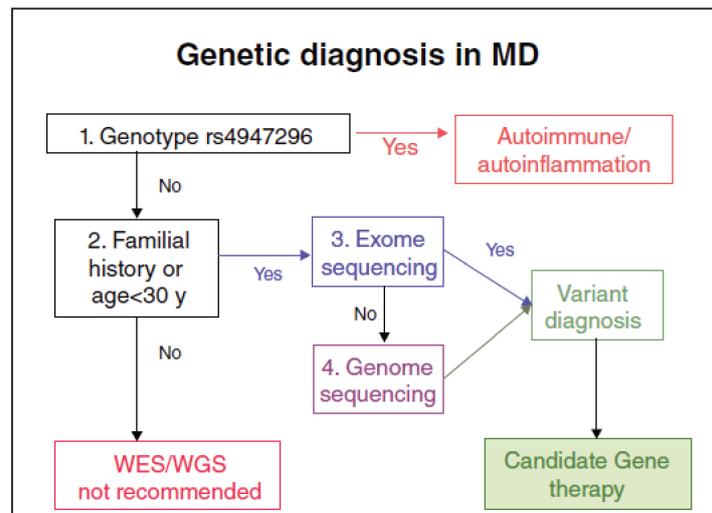


Figura 28. Algoritmo proposto por Gallego-Martines (2018) para o diagnóstico molecular da DM.

Tendo em vista as situações socioeconômicas do nosso país, onde um *Whole Exome Sequencing* ou um *Whole Genome Sequencing* não são testes passíveis de serem feitos em todos os estudos devido ao alto custo, este presente estudo sugere um algoritmo adaptado, que também facilitaria e agilizariam o estudo molecular da DM, num custo relativamente baixo comparado aos custos de testes NGS (*Next Generation Sequencing*). Tal algoritmo está representado na Figura 29.

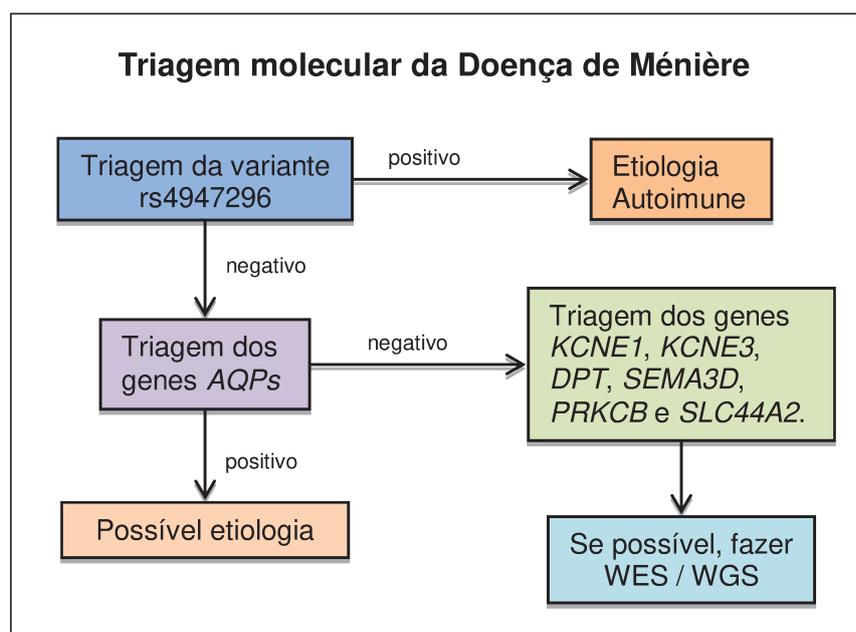


Figura 29. Algoritmo proposto neste estudo para o diagnóstico molecular da DM.

Além do algoritmo citado, neste estudo também sugerimos outra forma de agilizar, melhorar e diminuir possíveis custos com o rastreio de variantes candidatas na DM.

O Projeto *Genomics England* (<https://www.genomicsengland.co.uk>) desenhou painéis para o diagnóstico de várias doenças, incluindo a doença de Ménière Familiar, que ainda está em estágio inicial de desenvolvimento (<https://panelapp.genomicsengland.co.uk/panels/394/>). Para a elaboração deste projeto são validadas as variações gênicas encontradas nos genes estudados de acordo com as possíveis fisiopatologias da doença, isto baseado nos estudos genéticos de sequenciamento de genes existentes na literatura internacional.

O painel gênico com o objetivo de identificar marcadores genéticos para locação do paciente em um determinado grupo genotípico é um exemplo da aplicação futura da medicina personalizada para os pacientes com doença de Ménière. A identificação do seu subgrupo fenotípico pode determinar o seu tratamento específico em termos da melhor escolha da classe medicamentosa e posologia. A realização do painel genético também possibilitará o diagnóstico precoce de pacientes que apresentem quadro clínico incompleto. O tratamento específico e diagnóstico precoce contribuirão para o controle da evolução natural da doença, cujo objetivo principal é evitar a progressão da deterioração das funções labiríntica e auditiva nestes pacientes e minimizar o impacto na qualidade de vida do paciente.

O painel proposto no Projeto *Genomics England* não inclui todos os genes triados neste estudo, e a maior parte dos genes propostos no projeto não foram aprovados. Diante disso, este estudo propõe a criação de um painel gênico que inclua os genes *AQPs*, *KCNE1*, *KCNE3*, *DPT*, *SEMA3D*, *PRKCB* e *SLC44A2*, e a variante intergênica rs4947296.

5. CONCLUSÃO

Dos 30 pacientes analisados, foram encontradas as variantes de interesse em 13:

- ✓ No gene KCNE3 foi encontrada a variante rs2270676 em heterozigose em 6 pacientes sem histórico familiar, porém não há como estabelecer relação com a DM;

- ✓ No gene SLC44A2, foi encontrada a variante rs3087969 em todos os pacientes e a variante rs2288904 em 24 pacientes:

- ✓ Em sete deles, sem histórico familiar, foi detectada a associação de ambas as variantes em heterozigose;

- ✓ Não foi possível corroborar a relação dessas duas variantes com a DM grave;

- ✓ Não foram encontradas alterações associadas à DM nos genes DPT, SEMA3D e PRKCB;

- ✓ Não foram encontradas alterações na variante intergênica rs4947296 nos pacientes analisados;

- ✓ Foram encontradas outras quatro variantes no gene DPT em todos os pacientes, mas não têm correlação com a DM;

- ✓ O algoritmo de diagnóstico da DM e o painel gênico são um próximo passo em direção à medicina personalizada na DM.

6. REFERÊNCIAS

Adamov, Nadya Soares de Macedo. Estudo molecular de pacientes com neuropatia auditiva [dissertação]. Campinas: Universidade Estadual de Campinas; 2017.

Andrews JC. Intralabyrinthine fluid dynamics: Meniere disease. *Curr Opin Otolaryngol Head Neck Surg* 2004; 12: 408-12.

Angeli, S.; Lin, X.; Liu, X. Z. Genetics of hearing and deafness. *The Anatomical record*, v. 295, p. 1812–1829, nov. 2012.

Aoki M, Ando K, Mizuta K, Hayashi T, Ito Y. The association of antidiuretic hormone levels with an attack of Meniere's disease. *Clin Otolaryngol* 2005; 30: 521-5.

Arweiler D.J., Jahnke K. & Grosse-Wilde H. Ménière disease as autosome dominant hereditary disease. *Laryngorhinootologie*, 1995; 74(8), 512-515.

Beitz E, Kumagami H, Krippeit-Drews P, Ruppertsberg JP, Schultz JE. Expression pattern of aquaporin water channel in the inner ear of the rat. *Hear Res* 1999; 132:76-84.

Beitz E, Zenner HP, Schultz JE. Aquaporin-Mediated Fluid Regulation in the Inner Ear. *Cel Mol Neurobiol* 2003; 23(3): 315-29.

Benoudiba, F.; Toulgoat, F.; Sarrazin, J. L. The vestibulocochlear nerve (VIII). *Diagnostic and Interventional Imaging*, v. 94, n. 10, p. 1043–1050, 2013.

Campbell C.A., Della Santina C.C., Meyer N.C., Smith N.B., Myrie O.A. *et al.* Polymorphisms in *KCNE1* or *KCNE3* are not associated with Ménière disease in the Caucasian population. *Am J Med Genet A*, 2010; 152A(1), 67–74 .

Candreia C, Schumuziger N, Gurtler N. Molecular Analysis of Aquaporin Genes 1 to 4 in Patients with Ménière's Disease. *Cell Physiol Biochem* 2010; 26:787-92.

Carmen Martín-Sierra, Teresa Requena, Lidia Frejo, Steven D. Price, Alvaro Gallego-Martinez, Angel Batuecas-Caletrio, Sofía Santos-Pérez, Andrés Soto-Varela, Anna Lysakowski and Jose A. Lopez-Escamez. A novel missense variant in *PRKCB* segregates low-frequency hearing loss in an

autosomal dominant family with Meniere's disease. *Human Molecular Genetics*, 2016, Vol. 25, No. 16.

Carmen Martín-Sierra, Alvaro Gallego-Martinez, Teresa Requena, Lidia Frejo, Angel Batuecas-Caletrío and Jose A Lopez-Escamez. Variable expressivity and genetic heterogeneity involving *DPT* and *SEMA3D* genes in autosomal dominant familial Meniere's disease. *European Journal of Human Genetics* (2017) 25, 200–207.

Costa, Sueli Martins da Silva. Estudo molecular em indivíduos surdos com diagnóstico genético indefinido [tese]. Campinas: Universidade Estadual de Campinas; 2013

Do R, Kathiresan S, Abecasis GR. Exome sequencing and complex disease: practical aspects of rare variant association studies. *Hum Mol Genet*. 2012;21(Review Issue 1):R1-R9.

Doi K., Sato T., Kuramasu T., Hibino H., Kitahara T. Ménière's disease is associated with single nucleotide polymorphisms in the human potassium channel genes, *KCNE1* and *KCNE3*. *ORL J Otorhinolaryngol Relat Spec*, 2005; 67(5), 289–293.

Dror, A. A; Avraham, K. B. Hearing impairment: a panoply of genes and functions. *Neuron*, v. 68, n. 2, p. 293–308, 2010.

Dror, A. A; Avraham, K. B. Hearing loss: mechanisms revealed by genetics and cell biology. *Annual Review of Genetics*, v. 43, p. 411–437, 2009.

Eckharda A, Gleiser C, Arnolda H, Rask-Andersenc H, Kumagami H, Müller M, Hirt B, Löwenheima H. Water channel proteins in the inner ear and their link to hearing impairment and deafness. *Molecular Aspects of Medicine* 33, 2012; 612–637.

Engel A, Fujiyoshi Y, Agre P. The importance of aquaporin water channel protein structures. *The EMBO Journal* 2000; 19(5): 800-6.

Frejo L, Giegling I, Teggi R, Lopez-Escamez JA, Rujescu D. Genetics of vestibular disorders: pathophysiological insights. *J Neurol*. 2016;263(Suppl 1):S45-53.

Frejo L, Martín-Sanz E, Teggi R, Trinidad G, Soto-Varela A, Santos-Perez S et al. Extended phenotype and clinical subgroups in unilateral Meniere disease: a cross-sectional study with cluster analysis. *Clin Otolaryngol*. 2017;42(6):1172-80.

Frejo L, Requena T, Okawa S, Gallego-Martinez A, Martinez-Bueno M, Aran I *et al.* Regulation of Fn14 Receptor and NF- κ B underlies inflammation in Meniere's disease. *Front Immunol.* 2017;13(8):1739.

Frejo L, Requena T, Okawa S, Gallego-Martinez A, Martinez-Bueno M, Aran I *et al.* Regulation of Fn14 Receptor and NF- κ B underlies inflammation in Meniere's disease. *Front Immunol.* 2017;13(8):1739.

Frejo L, Soto-Varela A, Santos-Perez S, Aran I, Batuecas-Caletrio A, Perez-Guillen V *et al.* Clinical Subgroups in Bilateral Meniere Disease. *Front Neurol.* 2016;24(7):182.

Gallego-Martinez A, Espinosa-Sanchez JM, Lopez-Escamez JA. Genetic contribution to vestibular diseases. *J Neurol.* 2018;265(Suppl1):29-34.

Gallego-Martinez A, Espinosa-Sanchez JM, Lopez-Escamez JA. Genetic contribution to vestibular diseases. *J Neurol.* 2018;265(Suppl1):29-34.

Gibson WPR. Hypothetical mechanism for vertigo in Meniere's disease. *Otolaryngol Clin North Am.* 2010 Oct;43(5):1019-27.

Gutman GA, Chandy KG, Grissmer S, Lazdunski M, McKinnon D, Pardo LA, *et al.* International Union of Pharmacology. LIII. Nomenclature and molecular relationships of voltage-gated potassium channels. *Pharmacol Rev.* 2005;57(4):473- 508.

Hietikko E, Kotimäki J, Okuloff A, Sorri M, Männikkö M. A replication study on proposed candidate genes in Ménière's disease, and a review of the current status of genetic studies. *Int J Audiol.* 2012; Nov;51(11):841-5.

Hietikko, Mathre AN, Jero J, Chiappini I, Bolasco G, Barbara M, Lalwani AK. Aquaporin-2 expression in the mammalian cochlea and investigation of its role in Meniere's disease. *Hear Res* 2002; 170:59-69.

Horner KC. Auditory and vestibular function in experimental hydrops. *Otolaryngol Head Neck Surg* 1995; 112: 84-9.

Hosmer DW, Lemeshow S: *Applied logistic regression.* New York: John Wiley & Sons, 2000.

Hott ME, Graham M, Bonassar LJ, Megerian CA. Correlation Between Hearing Loss and Scala Media Area in Guinea Pigs with Long-standing Endolymphatic Hydrops. *Otol Neurotol* 2003; 24: 64-72.

Ishiyama G, López IA, Ishiyama A. Aquaporins and Meniere's disease. *Curr Opin Otolaryngol Head Neck Surg* 2006; 14: 332-6.

Ito T, Noguchi Y, Yashima T, Ohno K, Kitamura K. Hereditary hearing loss and deafness genes in Japan. *J Med Dent Sci*. 2010

Jeffrey T. Vrabec, MD. Genetic Investigations of Meniere's Disease *Otolaryngologic Clinics of North America* Volume 43, Issue 5, October 2010, Pages 1121–1132

Johnson RA, Wichern DW: *Applied Multivariate Statistical Analysis*. Upper Saddle River: Prentice-Hall; 2002.

Jose Antonio Lopez-Escamez, Angel Batuecas-Caletrio, Alexandre Bisdorff. Towards personalized medicine in Ménière's disease. *F1000Research* 2018, 7(F1000 Faculty Rev):1295.

Keating M T, Sanguinetti M C. Molecular and Cellular Mechanisms of Cardiac Arrhythmias. *Cell* Volume 104, Issue 4, 23 February 2001; Pages 569–580

Kitano H, Takeda T, Takeda S *et al*. Endolymphatic Hydrops by Administration of Vasopressin in the Rat. *Acta Histochem Cytochem* 2001; 34(4): 229-33.

Kumagami H, Loewenheim H, Beitz E, Wild K, Schwartz H, Yamashita K, *et al*. The effect of anti-diuretic hormone on the endolymphatic sac of the inner ear. *Eur J physiol* 1998; 436: 970-5.

Lopes KC, Sartorato EL, Silva-Costa SM, Adamov NSM, Ganança FF. Ménière's disease: Molecular Analysis of Aquaporins 2, 3 and Potassium Channel KCNE1 Genes in Brazilian patients. *Otol & Neurotol*. 2016;37:1117-21.

Lopes, Karen de Carvalho. Estudo molecular na doença de Ménière: genes AQP2, AQP3, KCNE1, GJB2 e GJB6 [Tese]. Universidade Federal de São Paulo, São Paulo, 2015.

Lopez-Escamez JA, Batuecas-Caletrio A, Bisdorff A. Towards personalized medicine in Ménière's disease. *F1000Research*. 2018;15(7) pii:F1000Faculty Rev-1295.

Lopez-Escamez JA, Batuecas-Caletrio A, Bisdorff A. Towards personalized medicine in Ménière's disease. *F1000Research*. 2018;15(7) pii:F1000Faculty Rev-1295.

Lopez-Escamez JA, Carey J, Wong-Ho C, Goebel JA, Magnusson M, Mandalá M, *et al*. Diagnostic criteria for Ménière's disease. *J Vestib Res*. 2015 Jan;25(1):1–7.

Lopez-Escamez JA, Carey J, Wong-Ho C, Goebel JA, Magnusson M, Mandalá M, et al. Diagnostic criteria for Menière's disease. *J Vestib Res.* 2015 Jan;25(1):1–7.

Martins, Fabio Tadeu Arrojo. Sequenciamento paralelo massivo na identificação e caracterização de genes relacionados à perda auditiva [tese]. Campinas: Universidade Estadual de Campinas; 2017.

Martín-Sierra C, Gallego-Martinez A, Requena T, Frejo L, Batuecas-Caletrío, Lopez-Escamez JA. Variable expressivity and genetic heterogeneity involving *DPT* and *SEMA3D* genes in autosomal dominant familial Meniere's disease. *Eur J Hum Genet.* 2017;25(2):200-7.

Megerian CA, Semaan MT, Aftab S, Kisley LB, Zheng QY, Pawlowski KS, Wright CG, Alagramam KN. A mouse model with postnatal endolymphatic hydrops and hearing loss. *Hear Res* 2008; 237: 90-105.

Merchant SN, Adams JC, Nadol JB. Pathophysiology of Meniere's syndrome: are symptoms caused by endolymphatic hydrops? *Otol Neurotol.* 2005;26:74–81.

Merves M, Bobbitt B, Parker K, Kishore BK, Choo D. Developmental Expression of Aquaporin 2 in the Mouse Inner Ear. *Laryngoscope* 2000; 110: 1925-30.

Mhatre AN, Jero J, Chiappini I, Bolasco G, Barbara M, Lalwani AK. Aquaporin- 2 expression in the mammalian cochlea and investigation of its role in Meniere's disease. *Hear Res.* 2002; Aug;170(1-2):59-69.

Morrison A.W. & Johnson K.J. Genetics (molecular biology) and Ménière's disease. *Otolaryngol Clin North Am*, 2002; 35(3) , 497 – 516 .

Morrison A.W., Bailey M.E. & Morrison G.A. . Familial Ménière's disease: Clinical and genetic aspects. *J Laryngol Otol*, 2009; 123(1) , 29 – 37 .

Nishioka R, Takeda T, Kakigi A *et al.* Expression of aquaporins and vasopressin type 2 receptor in the stria vascularis of the cochlea. *Hear Res* 2010; 260: 11-19.

Petit, C. Genes responsible for human hereditary deafness: symphony of a thousand. *Nature Genetics*, v. 14, n. 3, p. 353–356, 1996.

Price, A.L et al . Pooled Association Tests for Rare Variants in Exon-Resequencing Studies. *The American Journal of Human Genetics* 86, 832–838, 2010.

Pupo, A. C. et al. Retrospective study of hearing impaired children and teenager: characterizing the etiologies and audiological aspects. *Revista CEFAC*, v. 10, n. 1, p. 84–91, 2008.

R Development Core Team. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical, 2010. Computing, Vienna, Austria. ISBN 3-900051-07-0, <http://cran.r-project.org/doc/manuals/R-intro.pdf>

Rabionet R, Zelante L, López-Bigas N, D'Agruma L, Melchionda S, Restagno G, *et al.* Molecular basis of childhood deafness resulting from mutations in the GJB2 (connexin 26) gene. *Hum Genet.* 2000

Ramos, Priscila Zonzini. Estudo da etiologia da perda auditiva em amostra de indivíduos brasileiros: Diretrizes para protocolo de conduta clínica [dissertação]. Campinas: Universidade Estadual de Campinas; 2012.

Raviv, D.; Dror, A. A; Avraham, K. B. Hearing loss: a common disorder caused by many rare alleles. *Annals of the New York Academy of Sciences*, v.1214, p. 168–179, 2010.

Richardson, G. P.; De Monvel, J. B.; Petit, C. How the genetics of deafness illuminates auditory physiology. *Annual Review of Physiology*, v. 73, p. 311–334, 17 mar. 2011.

Roman-Naranjo P, Gallego-Martinez A, Lopez-Escamez JA. Genetics of vestibular syndromes. *Curr Opin Neurol.* 2018;31(1):105-10.

Schwander, M.; Kachar, B.; Muller, U. The cell biology of hearing. *The Journal of Cell Biology*, v. 190, p. 9–20, 2010.

Schwander, M.; Kachar, B.; Muller, U. The cell biology of hearing. *The Journal of Cell Biology*, v. 190, p. 9–20, 2010.

Schwartz PJ, Spazzolini C, Crotti L, Bathen J, Amlie JP, Timothy K, *et al.* The Jervell and Lange Nielsen syndrome: natural history, molecular basis, and clinical outcome. *Circulation.* 2006;113(6):783-90.

Semaan MT, Alagramam KN, Megerian CA. The basic science of Meniere's disease and endolymphatic hydrops. *Curr Opin Otolaryngol Head Neck Surg* 2005; 13: 301-7.

Semaan MT, Alagramam KN, Megerian CA. The basic science of Meniere's disease and endolymphatic hydrops. *Curr Opin Otolaryngol Head Neck Surg.* 2005;13:301–7

Svidnicki, Maria Carolina Costa Melo. Desenvolvimento de painel diagnóstico para rastreamento simultâneo das principais mutações envolvidas na perda auditiva [tese]. Campinas: Universidade Estadual de Campinas; 2015.

Takeda T, Kakigi A, Saito H. Antidiuretic Hormone (ADH) and Endolymphatic Hydrops. *Acta Otolaryngol (Stockh)* 1995; 519: 219-22.

Takeda T, Sawada S, Takeda S, Kitano H, Suzuki M, Kakigi A, Takeuchi S. The effects of V2 antagonist (OPC-31260) on endolymphatic hydrops. *Hear Res* 2003; 182: 9-18.

Takeda T, Takeda S, kakigi A, Okada T *et al.* Hormonal Aspects of Ménière's Disease on the Basis of Clinical and Experimental Studies. *ORL* 2009; 71(Suppl1): 1-9.

Takeda T, Takeda S, Kitano H, Okada T, Kakigi A. Endolymphatic hydrops induced by chronic administration of vasopressin. *Hear Res* 2000; 140: 1-6.

Tomblin, J. B. et al. The influence of hearing aids on the speech and language development of children with hearing loss. *JAMA otolaryngology-head & neck surgery*, v. 140, p. 403–409, 2014.

Van Camp, G.; Smith, R. J. H. Hereditary Hearing Loss Homepage. Disponível em: <<http://hereditaryhearingloss.org>>. Acesso em: 20 jan. 2018.

Van Laer L, Carlsson PI, Ottschytsch N, Bondeson ML, Konings A, Vandeveldel A, Dieltjens N, Franssen E, Snyders D, Borg E, Raes A, Van Camp G. The contribution of genes involved in potassium-recycling in the inner ear to noise- induced hearing loss. *Hum Mutat.* 2006; Aug;27(8):786-95.

Vatta M, Towbin JA. Mutations in KCNE1 in long QT syndrome (LQTS): insights into mechanism of LQTS and drug sensitivity? *Heart Rhythm.* 2006; Sep;3(9):1041-2.

Vrabec J.T. Genetic investigations of Ménière's disease. *Otolaryngol Clin North Am*, 2010; 43(5) , 1121 – 1132 .

Warth R, Barhanin J. The multifaceted phenotype of the knockout mouse for the KCNE1 potassium channel gene. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2002; Mar;282(3):R639-48. Review.

Zhong SX, Liu ZH. Expression of Aquaporins in the Cochlea and Endolymphatic Sac of Guinea Pig. *ORL* 2003; 65: 284-9.

7. ANEXOS

7.1 Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa da FCM/UNICAMP.



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: ESTUDO DE VARIANTES ASSOCIADAS À DOENÇA DE MÉNIÈRE

Pesquisador: Giselle Bianco Bortoletto

Área Temática: Genética Humana:

(Trata-se de pesquisa envolvendo Genética Humana que não necessita de análise ética por parte da CONEP;);

Versão: 3

CAAE: 09012719.6.0000.5404

Instituição Proponente: Centro de Biologia Molecular e Engenharia Genética

Patrocinador Principal: FUNDACAO DE AMPARO A PESQUISA DO ESTADO DE SAO PAULO

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 3.271.159

Apresentação do Projeto:

Introdução:

O sistema auditivo é um dos mais complexos e sofisticados mecanismos dos seres vivos. A audição é o sentido responsável pela captação das ondas sonoras presentes no ambiente e sua codificação em impulsos nervosos através de percepção e interpretação do som.

A cóclea é a estrutura da orelha interna responsável pela transformação das ondas sonoras – energia mecânica – em sinal elétrico: princípio básico da audição. Esse mecanismo é altamente dependente da homeostase; portanto qualquer alteração pode resultar em um processo auditivo deficiente.

O grande número de genes expressos na cóclea reflete a complexidade dos mecanismos moleculares envolvidos na audição.

A perda auditiva é o déficit sensorial mais frequente nos humanos. Esta condição restringe a expressão oral, interfere na vida social e econômica e pode levar a alterações no desenvolvimento cognitivo e psicológico do indivíduo afetado.

Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), cerca de 466 milhões de pessoas são afetadas no mundo, sendo 34 milhões de crianças.

Endereço: Rua Tessália Vieira de Camargo, 126
Bairro: Barão Geraldo **CEP:** 13.083-887
UF: SP **Município:** CAMPINAS
Telefone: (19)3521-8936 **Fax:** (19)3521-7187 **E-mail:** cep@fcm.unicamp.br



Continuação do Parecer: 3.271.159

Em países desenvolvidos, um a cada 1000 recém-nascidos apresentam perda auditiva. No Brasil a estimativa geral é de quatro a cada 1000 nascimentos, podendo variar de acordo com a região estudada de 2 a 7 para cada 1000 nascimentos.

Os casos de perda auditiva devido a fatores ambientais no Brasil ainda são predominantes (66% dos casos), com outros 19% de etiologia desconhecida e 15% de herança genética. Mais de 103 genes distribuídos em 150 loci já foram associados a perdas auditivas de origem genética. Dentre esses genes, há predominância da relação entre as perdas auditivas com mutações no gene GJB2. Ele foi o primeiro gene a ser relatado na perda auditiva sensorioneural não-sindrômica, presente em aproximadamente 80% dos casos autossômicos recessivos.

Já foram descritas na literatura mais de 400 síndromes que possuem a perda auditiva como sintoma. Essas síndromes compreendem um conjunto vasto de doenças hereditárias no qual a perda auditiva pode estar associada a diversos distúrbios do sistema nervoso, endócrino, cardiovascular, musculoesquelético entre outros.

Uma das condições clínicas que compreende um caso sindrômico é a Doença de Ménière (DM): um distúrbio que ocorre no ouvido interno cujos sintomas são associados à hidropsia endolinfática (vertigem, perda auditiva sensorioneural, zumbido e pressão).

Em 1861, Prosper Ménière descreveu a clássica tríade de vertigem episódica, perda de audição neurossensorial flutuante e zumbido.

Atualmente, a DM continua sendo um dos maiores enigmas da dinâmica dos fluidos na orelha interna.

É amplo o campo de estudo sobre essa doença, uma vez que entender e controlar a doença de Ménière é entender e controlar a dinâmica dos fluidos labirínticos.

A DM pode ocorrer em qualquer idade, sendo mais frequente em adultos entre 30-50 anos e menos comum em crianças e adultos jovens.

A incidência varia dependendo da região geográfica e grupo étnico, contudo, parece ser mais frequente em caucasianos.

Em 2010, o Instituto Nacional de Surdez e Outros Distúrbios de Comunicação (NIDCD) estimou que 615.000 indivíduos nos Estados Unidos apresentavam a doença de Ménière, com mais de 45 mil

Endereço: Rua Tessália Vieira de Camargo, 126
Bairro: Barão Geraldo **CEP:** 13.083-887
UF: SP **Município:** CAMPINAS
Telefone: (19)3521-8936 **Fax:** (19)3521-7187 **E-mail:** cep@fcm.unicamp.br



Continuação do Parecer: 3.271.159

novos casos diagnosticados a cada ano.

No Brasil, um estudo relata que a DM pode ser considerada a segunda labirintopatia mais prevalente na clínica.

A causa da DM ainda é desconhecida, provavelmente resulte de uma combinação de fatores ambientais e genéticos (multifatorial).

Alguns possíveis fatores de risco que predisõem à doença incluem infecções virais, trauma na orelha interna, poluição sonora, alergias, respostas anormais do sistema imunológico, e enxaquecas.

Embora a maioria dos casos seja esporádico, o que significa que eles ocorrem em pessoas sem histórico da doença na família, casos onde se observa herança genética tem sido relatados. Nesses casos, estudos tem estimado uma prevalência entre 5 a 15%.

Quando a doença é familiar, padrões de herança autossômica dominante e recessivo já foram descritos.

Uma vez que sintomas de DM são causados por hidropisia endolinfática (HE) da orelha interna, genes envolvidos na regulação da homeostase tem sido considerados genes candidatos associados à DM. Alguns destes genes estão envolvidos com o transporte de água da orelha interna, e outros regulam a composição iônica da endolinfa.

Estudos têm focado principalmente nos genes Aquaporin - AQP1-4, KCNE1 e KCNE3, ADD1 regulador de atividade da bomba de Na⁺ e K⁺, COCH (coagulation factor C homolog) entre outros.

As aquaporinas (AQP) são poros celulares, ou canais de água responsáveis pelo movimento hídrico para dentro e para fora das células.

Esse processo regulatório exige uma quantidade mínima de energia porque o fluxo da água segue o gradiente osmótico existente.

Nos mamíferos existem 12 AQPs identificadas, cada uma com diferente localização tissular e diferentes propriedades regulatórias e de permeabilidade.

Entre as AQPs, principalmente as isoformas 1-5 tem sido associadas à patologia e fisiologia da DM.

A AQP2 tem despertado especial interesse com relação a DM. A expressão da AQP2 na orelha

Endereço: Rua Tessália Vieira de Camargo, 126
Bairro: Barão Geraldo **CEP:** 13.083-887
UF: SP **Município:** CAMPINAS
Telefone: (19)3521-8936 **Fax:** (19)3521-7187 **E-mail:** cep@fcm.unicamp.br



Continuação do Parecer: 3.271.159

interna tem sido investigada em vários estudos com resultados contraditórios.

Alguns autores relatam a presença exclusiva da AQP2 no saco endolinfático. Outros a identificaram apenas na membrana de Reissner, em particular nas estruturas que margeiam a endolinfa e nos giros da cóclea, com predomínio nos giros médio e apical.

As evidências da biologia molecular conduzem para uma nova visão de que a homeostase hídrica da orelha interna é regulada em parte via sistema vasopressina- Aquaporina 2 (VP-AQP2) e que a hidropisia endolinfática, característica morfológica da DM, reflete a má regulação deste sistema no fluido da orelha interna.

Essa suposição é sustentada por evidências clínica e experimental: níveis plasmáticos da VP estão elevados nos pacientes com DM ; aplicação aguda e crônica de VP produz hidropisia endolinfática em cobaias e em ratos.

Além da AQP2, estudos apontam que na orelha interna a AQP5 também desempenha uma provável função na regulação do volume de endolinfa por "secreção e reabsorção de água".

Neste papel, AQP5 e AQP2 podem mediar o fluxo de água bidirecionalmente entre a perilinfa e endolinfa, que depende do gradiente de pressão osmótica e hidrostática entre os dois compartimentos de fluido da orelha interna.

Portanto, disfunções das AQP5 e AQP2 podem estar potencialmente envolvidas em doenças da orelha interna relacionadas com alteração da regulação do volume da endolinfa como ocorre nos casos de DM.

Estudos de expressão e função apontam um claro envolvimento dos genes das AQPs na homeostase da orelha interna. Contudo, apenas nos últimos anos estudos associando mutações nestes genes e DM tem sido realizados.

Dessa forma, ainda há poucas informações sobre a real relevância dessas alterações na etiologia da doença.

Os canais de potássio são a maior e mais complexa família de canais iônicos, representada por pelo menos 70 locus do genoma humano.

Na orelha interna canais compostos por proteínas KCNE/KCNQ estão presentes na membrana celular apical das células marginais, na estria vascular, onde desempenham a importante função de assegurar a homeostasia do K⁺.

Endereço: Rua Tessália Vieira de Camargo, 126
 Bairro: Barão Geraldo CEP: 13.083-887
 UF: SP Município: CAMPINAS
 Telefone: (19)3521-8936 Fax: (19)3521-7187 E-mail: cep@fcm.unicamp.br



Continuação do Parecer: 3.271.159

A perda da funcionalidade destes canais leva a uma redução do potencial da endolinfa, o que pode causar perda auditiva.

Qualquer redução no gradiente de concentração de K⁺ leva a uma redução do potencial de endolinfa, e isto pode reduzir a sensibilidade a estímulos auditivos).

Acredita-se que um processo semelhante ocorra nas células do epitélio marginal vestibular.

A família do gene KCNE foi originalmente sugerida como candidata à DM, uma vez que foi reportada uma representação aumentada do alelo A no SNP rs1805127, no gene KCNE1, e do alelo C no SNP rs2270676 no gene KCNE3 em pacientes japoneses com DM, o que poderia indicar um aumento da suscetibilidade a DM nesses casos.

No entanto, outros pesquisadores não encontraram relação entre KCNE1 e DM, embora o número de pacientes com DM estudado tenha sido consideravelmente grande (180).

Um estudo recente incluiu mutações já reportadas em seis genes candidatos à DM, sendo eles, AQP2, KCNE1, KCNE3, HCFC1, COCH e ADD1.

Os indivíduos estudados eram finlandeses, com DM, sendo 38 casos esporádicos e 21 casos com história familiar.

Em tal estudo apenas a variação rs1805127 no gene KCNE1 foi identificada indicando, portanto, um possível envolvimento dessa variação com DM.

Devido à dificuldade de se diagnosticar molecularmente a DM, novos genes tem sido buscados na literatura na tentativa de se estabelecer uma correlação entre alterações nestes genes e à DM.

Um destes genes é o DPT, que codifica a proteína Dermatopontina, localizada na matriz extracelular. O gene DPT está localizado no cromossomo 1 e contém 4 éxons, sendo que apenas a parte inicial do quarto éxon é codificante.

A Dermatopontina, codificada pelo gene DPT, é uma proteína de 201 aminoácidos e interage com proteínas da superfície celular e com proteoglicanos.

Essa proteína é expressa em fibroblastos e interage com colágenos tipos I e II, além de manter a homeostase vascular.

Em um dado estudo, duas variantes em heterozigose nos genes DPT (éxon 4) e SEMA3D (éxon 15) segregando juntamente com o fenótipo em três indivíduos de uma mesma geração em uma família com expressividade variável de DM.

Endereço: Rua Tessália Vieira de Camargo, 126
 Bairro: Barão Geraldo CEP: 13.083-887
 UF: SP Município: CAMPINAS
 Telefone: (19)3521-8936 Fax: (19)3521-7187 E-mail: cep@fcm.unicamp.br

7.2 Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa da FCM/UNICAMP do projeto anterior.

COMITÊ DE ÉTICA EM
PESQUISA DA UNICAMP -
CAMPUS CAMPINAS



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Estudo Molecular da Síndrome de Ménière

Pesquisador: Nadya Soares de Macedo Adamov

Área Temática: Genética Humana:

(Trata-se de pesquisa envolvendo Genética Humana que não necessita de análise ética por parte da CONEP.);

Versão: 2

CAAE: 37346114.1.0000.5404

Instituição Proponente: Centro de Biologia Molecular e Engenharia Genética

Patrocinador Principal: FUNDAÇÃO DE AMPARO A PESQUISA DO ESTADO DE SÃO PAULO

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 895.074

Data da Relatoria: 30/11/2014

7.3 TCLE de Reconsentimento

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

“Estudo de variantes associadas à Doença de Ménière”

Giselle Bianco Bortoletto

Número do CAAE: 09012719.6.0000.5404

Você está sendo convidado a participar de uma pesquisa. Este documento, chamado Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, visa assegurar seus direitos como participante da pesquisa e é elaborado em duas vias, assinadas e rubricadas pelo pesquisador e pelo participante/responsável legal, sendo que uma via deverá ficar com você e outra com o pesquisador.

Por favor, leia com atenção e calma, aproveitando para esclarecer suas dúvidas. Se houver perguntas antes ou mesmo depois de assiná-lo, você poderá esclarecê-las com o pesquisador. Se preferir, pode levar este Termo para casa e consultar seus familiares ou outras pessoas antes de decidir participar. Não haverá nenhum tipo de penalização ou prejuízo se você não aceitar participar ou retirar sua autorização em qualquer momento.

Justificativa e objetivos:

A Doença de Ménière (DM) pode ocorrer em qualquer idade, sendo mais frequente em adultos entre 30-50 anos e menos comum em crianças e adultos jovens. Em 2010, o Instituto Nacional de Surdez e Outros Distúrbios de Comunicação (NIDCD) estimou que 615.000 indivíduos nos Estados Unidos apresentavam a doença de Ménière, com mais de 45 mil novos casos diagnosticados a cada ano. No Brasil, um estudo relata que a DM pode ser considerada a segunda labirintopatia mais prevalente na clínica, possuindo ainda vários sintomas como vertigem, perda auditiva, zumbido e pressão no ouvido que podem variar de casos mais leves a mais graves. Com isso, e conhecendo o impacto da sua repercussão clínica na qualidade de vida dos pacientes, estudos que visem maiores esclarecimentos sobre a doença são de extrema importância, uma vez que aumentam o leque de possibilidades terapêuticas, auxiliando na cura e/ou controle dessa enfermidade. A vantagem da associação de testes genéticos às avaliações clínicas já existentes nos pacientes com a Doença de Ménière é a possibilidade de se conhecer melhor a magnitude deste problema e dar um passo de alerta à população, aos profissionais da saúde e às autoridades locais.

Uma vez que os sintomas da Doença de Ménière são causados por um acúmulo de líquido (endolinfa) dentro do ouvido interno, genes envolvidos na regulação do estado de equilíbrio do corpo (homeostase) têm sido considerados genes candidatos associados à DM. Alguns destes genes estão envolvidos com a regulação da composição de elementos químicos no ouvido (composição iônica), outros estão associados à estrutura das proteínas que tem função no mecanismo da audição. Portanto, como objetivo deste trabalho, temos a análise de genes candidatos e a avaliação das alterações encontradas em relação à Doença de Ménière.

Procedimentos:

Participando do estudo você está sendo convidado a: ceder sua amostra que já foi encaminhada e se encontra preservada no Centro de Biologia Molecular e Engenharia Genética (CBMEG) da UNICAMP, para pesquisa de novos genes associados à Doença de Ménière.

Desconfortos e riscos:

Não existem riscos previsíveis ao paciente.

Você **não** deve participar deste estudo se não se sentir confortável com o procedimento, ou se não quiser. A participação é totalmente voluntária e o consentimento pode ser retirado a qualquer momento.

Rubrica do pesquisador: _____

Rubrica do participante: _____

Benefícios:

Não haverá benefícios diretos aos participantes, mas espera-se contribuir para o diagnóstico precoce da doença e, por consequência, para o tratamento adequado.

Acompanhamento e assistência:

Você tem o direito à assistência integral e gratuita devido a danos diretos e indiretos, imediatos e tardios, pelo tempo que for necessário. Em caso de dano pessoal, diretamente causado pelos procedimentos neste estudo (nexo causal comprovado), o participante tem direito a tratamento médico, bem como às indenizações legalmente estabelecidas.

É garantida, aos pacientes e responsáveis, respostas a quaisquer perguntas que possam ocorrer em qualquer momento da pesquisa, e esclarecimento de qualquer dúvida acerca dos assuntos relacionados com esta pesquisa.

Sigilo e privacidade:

Você tem a garantia de que sua identidade será mantida em sigilo e nenhuma informação será dada a outras pessoas que não façam parte da equipe de pesquisadores. Na divulgação dos resultados desse estudo, seu nome não será citado.

Os seus dados genéticos são confidenciais e não serão repassados a terceiros (como, por exemplo: seguradoras, empregadores, supervisores hierárquicos, entre outros). Seus dados genéticos estão protegidos, pois ficam armazenados em banco de dados interno do laboratório, onde apenas a equipe de pesquisadores tem acesso.

Ressarcimento e Indenização:

Não há despesas pessoais para o participante, incluindo exames e consultas. Também não há compensação financeira relacionada à sua participação.

Você terá a garantia ao direito à indenização diante de eventuais danos decorrentes da pesquisa.

Aconselhamento genético:

Você tem o direito de ser mantido atualizado sobre os resultados parciais da pesquisa, quando em estudos abertos ou de resultados que sejam do conhecimento dos pesquisadores.

O Aconselhamento Genético, caso necessário, poderá ser realizado mediante encaminhamento do próprio médico a um geneticista habilitado.

Armazenamento de material:

A Doença de Ménière ainda necessita de muitos estudos moleculares, devido à quantidade de genes envolvidos na estrutura da orelha, e no mecanismo da audição, bem como a complexa interação destes genes. Por tanto, faz-se necessário, se possível, o armazenamento da amostra de DNA para pesquisas futuras envolvendo genes associados à Doença de Ménière. Porém, toda nova pesquisa a ser realizada com o material armazenado será submetida para aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) e, quando for o caso, da Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP);

Com isso, você pode escolher uma das opções abaixo, caso aceite fazer parte desta pesquisa:

() concordo em participar do presente estudo, porém NÃO AUTORIZO o armazenamento do meu material biológico, devendo o mesmo ser descartado ao final desta pesquisa.

() concordo em participar do presente estudo e AUTORIZO o armazenamento do meu material biológico, sendo necessário meu consentimento a cada nova pesquisa, que deverá ser aprovada pelo CEP institucional e, se for o caso, pela CONEP.

Rubrica do pesquisador: _____

Rubrica do participante: _____

O descarte do material armazenado será autorizado nas seguintes situações:

- o participante retirou o consentimento em participar da pesquisa;
- amostra degradada.

Em caso de falecimento ou condição incapacitante, os direitos sobre o material armazenado deverão ser dados a: _____.

Contato:

Em caso de dúvidas sobre a pesquisa, você poderá entrar em contato com a pesquisadora Giselle Bianco Bortoletto, situada à Avenida Cândido Rondon, nº400, Cidade Universitária, Campinas/SP, CEP 13083-875. A pesquisadora se encontra no Laboratório de Genética Humana do CBMEG, no térreo, telefone (19) 3521-1130; e-mail giselle.bianco@yahoo.com.br.

Em caso de denúncias ou reclamações sobre sua participação e sobre questões éticas do estudo, você poderá entrar em contato com a secretária do Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da UNICAMP das 08:00hs às 11:30hs e das 13:00hs as 17:30hs na Rua: Tessália Vieira de Camargo, 126; CEP 13083-887 Campinas – SP; telefone (19) 3521-8936 ou (19) 3521-7187; e-mail: cep@fcm.unicamp.br.

O Comitê de Ética em Pesquisa (CEP).

O papel do CEP é avaliar e acompanhar os aspectos éticos de todas as pesquisas envolvendo seres humanos. A Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP) tem por objetivo desenvolver a regulamentação sobre proteção dos seres humanos envolvidos nas pesquisas. Desempenha um papel coordenador da rede de Comitês de Ética em Pesquisa (CEPs) das instituições, além de assumir a função de órgão consultor na área de ética em pesquisas

Consentimento livre e esclarecido:

Após ter recebido esclarecimentos sobre a natureza da pesquisa, seus objetivos, métodos, benefícios previstos, potenciais riscos e o incômodo que esta possa acarretar, aceito participar:

Nome do (a) participante da pesquisa:

_____ Data: ____/____/____.
(Assinatura do participante da pesquisa ou nome e assinatura do seu RESPONSÁVEL LEGAL)

Responsabilidade do Pesquisador:

Asseguro ter cumprido as exigências da resolução 466/2012 CNS/MS e complementares na elaboração do protocolo e na obtenção deste Termo de Consentimento Livre e Esclarecido. Asseguro, também, ter explicado e fornecido uma via deste documento ao participante da pesquisa. Informo que o estudo foi aprovado pelo CEP perante o qual o projeto foi apresentado e pela CONEP, quando pertinente. Comprometo-me a utilizar o material e os dados obtidos nesta pesquisa exclusivamente para as finalidades previstas neste documento ou conforme o consentimento dado pelo participante da pesquisa.

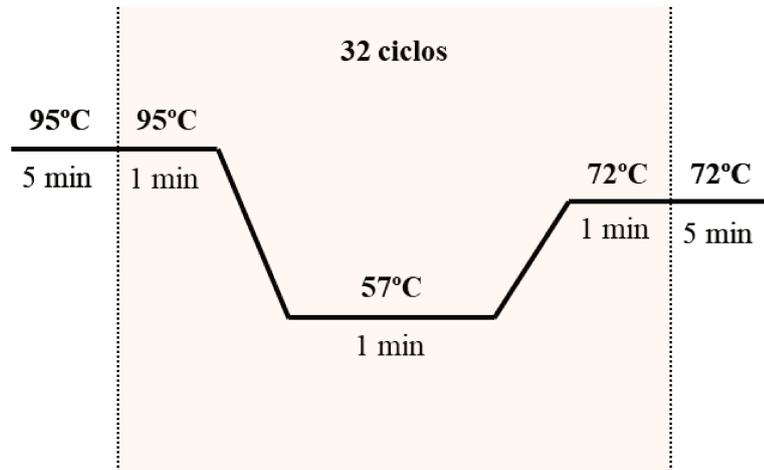
_____ Data: ____/____/____.
(Assinatura do pesquisador)

Rubrica do pesquisador: _____

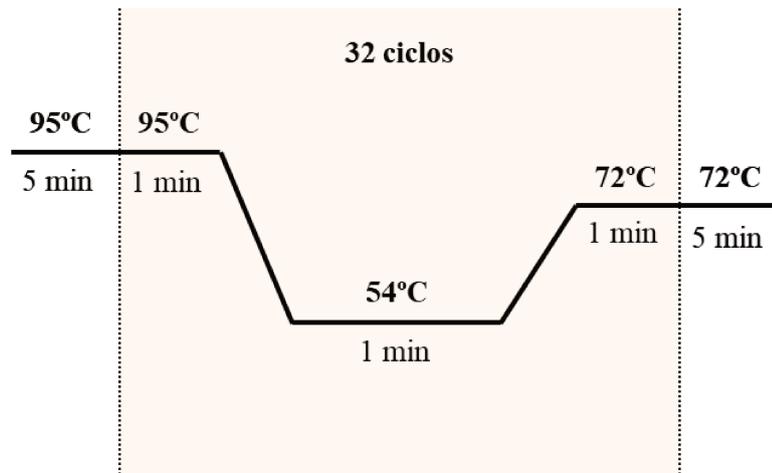
Rubrica do participante: _____

7.4 Ciclos das PCRs utilizadas neste trabalho.

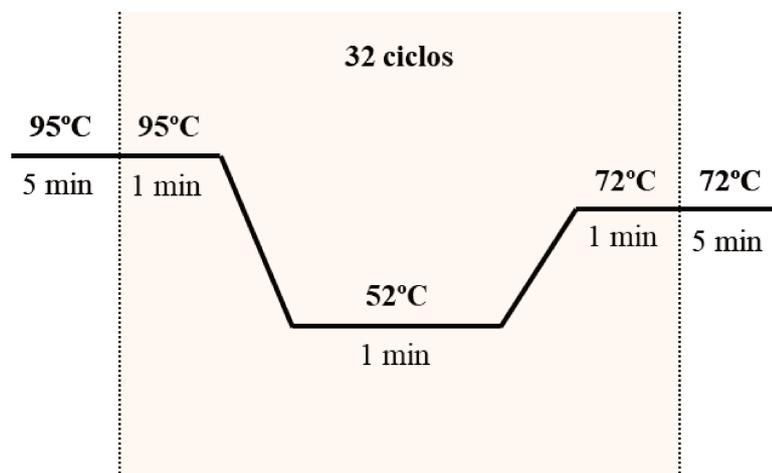
a. Gene *DPT*.



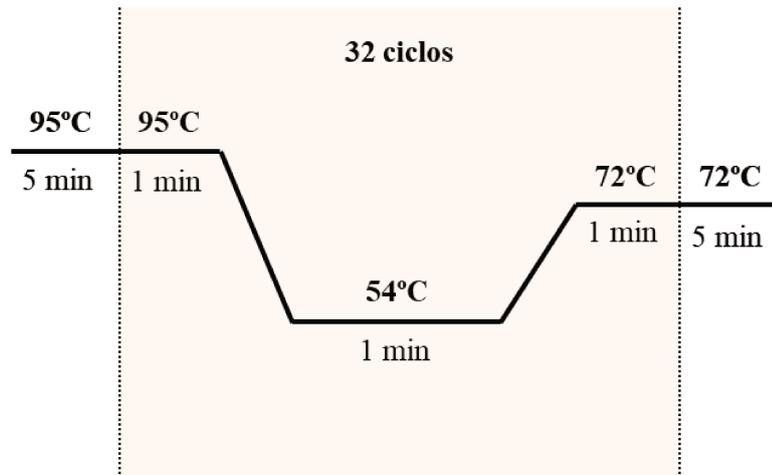
b. Gene *SEMA* – éxon 15.



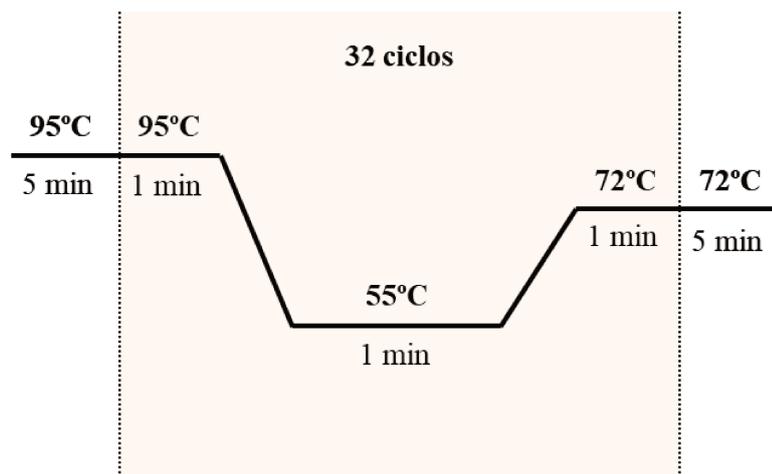
c. Gene *PRKCB* – éxon 3.



d. Gene *KCNE3*.



e. Gene *SLC44A2* – éxons 4 e 7.



f. Variante rs4947296.

