



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
INSTITUTO DE BIOLOGIA

FÁBIO TADEU ARROJO MARTINS

**SEQUENCIAMENTO PARALELO MASSIVO NA IDENTIFICAÇÃO E
CARACTERIZAÇÃO DE GENES RELACIONADOS À PERDA AUDITIVA**

CAMPINAS
2017

FÁBIO TADEU ARROJO MARTINS

**SEQUENCIAMENTO PARALELO MASSIVO NA IDENTIFICAÇÃO E
CARACTERIZAÇÃO DE GENES RELACIONADOS À PERDA AUDITIVA**

Tese apresentada ao Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas como parte dos requisitos exigidos para a obtenção do título de Doutor em Genética e Biologia Molecular, na Área de Genética Animal e Evolução.

Orientadora: Dra. Edi Lúcia Sartorato

ESTE ARQUIVO DIGITAL CORRESPONDE À VERSÃO FINAL DA TESE DEFENDIDA PELO ALUNO FÁBIO TADEU ARROJO MARTINS E ORIENTADO PELA EDI LÚCIA SARTORATO.

CAMPINAS

2017

Agência(s) de fomento e nº(s) de processo(s): FAPESP, 2013/05823-5; FAPESP, 2013/22538-2

ORCID: <http://orcid.org/0000-0002-3489-4095>

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca do Instituto de Biologia
Mara Janaina de Oliveira - CRB 8/6972

M366s Martins, Fábio Tadeu Arrojo, 1989-
Sequenciamento paralelo massivo na identificação e caracterização de genes relacionados à perda auditiva / Fábio Tadeu Arrojo Martins. – Campinas, SP : [s.n.], 2017.

Orientador: Edi Lúcia Sartorato.

Coorientador: Karen Bouskela Avraham.

Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.

1. Perda auditiva. 2. Surdez. 3. Genética. 4. Sequenciamento de nucleotídeos em larga escala. 5. Sequenciamento completo do exoma. I. Sartorato, Edi Lúcia, 1962-. II. Avraham, Karen. III. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. IV. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Massive parallel sequencing for identification and characterization of genes related to hearing loss

Palavras-chave em inglês:

Hearing loss

Deafness

Genetics

High-throughput nucleotide sequencing

Whole exome sequencing

Área de concentração: Genética Animal e Evolução

Titulação: Doutor em Genética e Biologia Molecular

Banca examinadora:

Edi Lúcia Sartorato [Orientador]

Cláudia Vianna Maurer Morelli

José Andrés Yunes

Mauricio Kurc

Victor Evangelista de Faria Ferraz

Data de defesa: 28-08-2017

Programa de Pós-Graduação: Genética e Biologia Molecular

Campinas, 28 de agosto de 2017.

COMISSÃO EXAMINADORA

Dra. Edi Lúcia Sartorato (orientadora)

Dra. Cláudia Vianna Maurer Morelli

Dr. José Andrés Yunes

Dr. Mauricio Kurc

Dr. Victor Evangelista de Faria Ferraz

Os membros da Comissão Examinadora acima assinaram a Ata de defesa, que se encontra no processo de vida acadêmica do aluno.

“The greatest enemy of knowledge is not ignorance, it is the illusion of knowledge.”

(Daniel J. Boorstin)

Dedico este trabalho aos meus pais, à minha avó Irene, à minha bela Käthe e ao meu avô Toninho (*In memoriam*), amados que acompanharam de perto minhas conquistas.

Agradecimentos

Aos meus pais, Rita e Tadeu, e minha avó, Irene, que sempre estiveram presentes, servindo como minha base e meu refúgio. Vocês, que dedicaram a vida para criar seus filhos/netos, ensinando que a vida é passageira e o que define uma pessoa são seus atos de bondade. Vocês, que também ensinaram que nada é impossível, e todo objetivo é atingido por meio de trabalho duro e honestidade. Vocês que sacrificaram cada minuto das suas vidas, possibilitando a conquista dos nossos objetivos. Vocês, que foram minha inspiração e modelo. Vocês, que são os melhores pais e avó do mundo. Vocês que amo incondicionalmente!

Ao meu irmão Renato, uma pessoa incrível, por todos os momentos de brincadeira e alegria.

To my beloved Käthe, an angel with blue eyes that I fell in love since the first moment. The one that was together with me during all this period. This amazing woman that could read me, giving me strenght everytime when I was tired. For all the sacrifice you have done, as well as all the patience and love. Jag älskar dig mickettão!

À professora Dra. Edi Lúcia Sartorato, que possibilitou a realização de diversos sonhos. Grato por toda oportunidade, desde o início até os dias atuais. Foi uma honra tê-la como minha orientadora durante esta caminhada. Grato por confiar no meu trabalho e me incentivar a desbravar novas possibilidades. De mim sempre terá a eterna admiração e gratidão.

To professor Karen B. Avraham, my co-supervisor, thank you for accepting me as part of your team, and treating me as a family member. I had such great time under you supervision, welcoming me with open arms and making me feel at home since the first moment in Tel Aviv. Thank you for all the exponential learning! From me you will always have the eternal admiration and gratitude.

Aos professores que aceitaram participar, como membros titulares e suplentes, desta banca examinadora: Dra. Cláudia Vianna Maurer Morelli, Dr. José Andrés Yunes, Dr. Maurício Kurc, Dr. Victor Evangelista de Faria Ferraz, Dra. Carmen Sílvia Bertuzzo, Dr. Edmilson Ricardo Goncalves e Dra. Maricilda Palandi de Mello. Agradeço a disponibilidade e contribuições para o enriquecimento do trabalho.

A todos meus colegas e amigos do Laboratório de Genética Molecular Humana, que estavam sempre presentes, em momentos de risadas, tristezas, ajudas, e crescimento, inclusive durante as adversidades.

A todos professores, funcionários e colegas do Centro de Biologia Molecular e Engenharia Genética da UNICAMP, que sempre contribuíram para um ambiente harmonioso e positivo.

Aos funcionários do Instituto de Biologia, e do Programa de Pós-Graduação da Genética e Biologia Molecular.

To my family at Karen B. Avraham laboratory. Thank you very much for everything, the laughs, the jokes, the teaching and help. You are in my heart, and I will always carry all of you with a lot of affection! You are amazing guys! Love all of you!

To all the people from the Human Molecular Genetics and Biochemistry department, at Sackler Med School (Tel Aviv University, Israel).

A todos meus amigos que fiz durante minha estada em Israel.

Aos pacientes, famílias e profissionais que participaram deste trabalho.

Aos meus amigos Marcelino, Marcelo e Fábio Sunica e às minhas amigas Denise, Lilian e Evelyne, por sempre estarem por perto para desabafos, brincadeiras e momentos marcantes que permitiram a vida fluir com mais alegria!

À família Taekwondo Unicamp. Em especial agradeço aos meus queridos professores Malu, Fábio e Gusta, por sempre despejarem adrenalina em suas palavras, acreditando que todos podemos ir mais longe.

Aos meus amigos de moradia da Rep ViraCopos, Rep LáEle/Titanic e Rep Biruleybi.

A todos professores e colegas que estiveram presentes durante minha caminhada, desde a formação básica até hoje.

Aos meus demais familiares.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pelas bolsas e auxílios concedidos (doutorado 2013/05823-5 e BEPE 2013/22538-2), fundamentais para minha formação profissional.

Enfim, a todos que, em algum momento de minha vida, estiveram presentes!

Muito grato, תודה תודה!

A perda auditiva é a deficiência sensorial mais frequente em humanos, afetando aproximadamente 5% da população mundial. Em países desenvolvidos, a cada mil nascimentos, um indivíduo apresenta perda auditiva neurossensorial bilateral profunda para severa. Dentre as causas, 50-60% dos casos congênitos estão associados à fatores genéticos, distribuídos em mais de 100 genes envolvidos tanto com a perda auditiva sindrômica quanto não-sindrômica. Porém, estima-se que este número seja superior a 300 genes, o equivalente a 1% de todos os genes do genoma humano. Tendo conhecimento da heterogeneidade da perda auditiva, genética e clinicamente, assim como das limitações das tecnologias convencionais de diagnóstico molecular, novas estratégias tiveram de ser desenvolvidas para o melhor entendimento dos mecanismos relacionados ao processo da audição. Dentre tais tecnologias, o sequenciamento paralelo massivo mostrou-se uma eficiente ferramenta, permitindo identificar e associar mais de 40 genes à perda auditiva em pouco menos de sete anos.

Assim sendo, para este estudo envolvendo indivíduos afetados com perda auditiva, foram utilizadas tecnologias baseadas no sequenciamento paralelo massivo para a identificação e caracterização de variantes genéticas que pudessem esclarecer o fenótipo observado. Das 25 famílias estudadas, 20 eram provenientes do Oriente Médio e foram analisadas pelo painel de captura *HEar-Seq v3*, contendo 284 genes associados à perda auditiva em humanos e camundongos. As cinco famílias restantes, provenientes do Brasil, foram analisadas por meio do sequenciamento completo do exoma. A identificação de novos genes e variantes candidatas relacionadas à perda auditiva nas famílias foram analisadas, tendo seu efeito patogênico caracterizado por estudos *in silico* e *in vitro*.

O uso do painel de captura e do sequenciamento completo do exoma permitiu elucidar a causa molecular da perda auditiva em 12 dos 25 casos estudados, correspondendo a 48% dos casos. Variantes novas e conhecidas foram identificadas nos genes *SLC26A4*, *USH2A*, *GATA3*, *OTOF*, *MYO6*, *STRC*, *CEACAM16*, *COL11A2* e *MYH9*, esclarecendo a etiologia da perda auditiva nas famílias estudadas. Além disso, este trabalho permitiu a associação de um novo gene, *SLC12A6*, com a perda auditiva em humanos. Tais resultados demonstram o poder do sequenciamento paralelo massivo no estudo de desordens genéticas, principalmente em casos complexos e heterogêneos. Adicionalmente, as análises contribuíram para o diagnóstico conclusivo da perda auditiva, permitindo o aconselhamento genético e prognóstico adequado para estas famílias.

Abstract

Hearing loss is the most common sensory deficit in humans, affecting approximately 5 % of the world population. In developed countries, one in every thousand newborns presents severe to profound bilateral sensorineural hearing loss. Of the congenital cases, 50-60 % are associated with genetic factors, which affect more than 100 genes involved in both syndromic and non-syndromic hearing loss. However, this number is estimated to be over 300 genes, *i.e.* 1 % of all genes in the human genome. Due to the genetic and clinical heterogeneity of hearing loss, as well as the limitations of conventional molecular diagnostic technologies, new strategies are constantly being developed for better understanding of the mechanisms of hearing. Among these, massive parallel sequencing has proven to be efficient, enabling the identification and association of more than 40 genes to hearing loss in seven years.

Therefore, in this study with deaf individuals, massive parallel sequencing based technologies were used to identify and characterize genetic variants that could clarify the observed phenotype in individuals with hearing loss. Of the 25 families studied, 20 were from the Middle East. They were analyzed by the HEar-Seq v3 capture panel, containing 284 genes associated with hearing loss in humans and mice. The five remaining families were from Brazil and analyzed by complete exome sequencing. Novel candidate variants and their related genes causing the familial hearing loss were analyzed and their pathogenic effect was characterized *in silico* and *in vitro*.

With the use of the capture panel and complete exome sequencing, the molecular cause of the hearing loss in 12 of the 25 studied cases (48 % of the cases) was elucidated. Novel, as well as known variants, were identified in the SLC26A4, USH2A, GATA3, OTOF, MYO6, STRC, CEACAM16, COL11A2 and MYH9 genes, thereby clarifying the etiology of the hearing loss in the studied families. Moreover, this work identified a new gene, SLC12A6, as related to hearing loss in humans. These results demonstrate the power of massive parallel sequencing for studying genetic disorders, especially in complex and heterogeneous cases. Additionally, the analyzes aided a conclusive diagnosis of the hearing loss, which enabled adequate genetic counseling and prognosis for the affected families.

Lista de figuras

FIGURA 1. REPRESENTAÇÃO DA ANATOMIA DA ORELHA	22
FIGURA 2. REPRESENTAÇÃO DA SECÇÃO INTERNA DA ORELHA	24
FIGURA 3. ESQUEMATIZAÇÃO DA CÓCLEA "ALONGADA" E DAS COMPARTIMENTALIZAÇÕES DA CÓCLEA	25
FIGURA 4. REPRESENTAÇÃO DO ÓRGÃO DE CORTI E ESTEREOCÍLIOS DA CÉLULAS CILIADAS EXTERNAS	26
FIGURA 5. REPRESENTAÇÃO DO FENÔMENO DE MECANOTRANSDUÇÃO NAS CÉLULAS CILIADAS INTERNAS. ...	28
FIGURA 6. ESQUEMATIZAÇÃO DO DNA MITOCONDRIAL HUMANO.....	43
FIGURA 7. REPRESENTAÇÃO DOS PRINCIPAIS MICRORNAs EXPRESSOS NA CÓCLEA.....	47
FIGURA 8. REPRESENTAÇÃO DAS CONEXINAS, CONEXONS E CANAIS INTERCELULARES.....	49
FIGURA 9. ESTRUTURA E EXPRESSÃO DA CONEXINA 26 NA ORELHA INTERNA.....	50
FIGURA 10. REPRESENTAÇÃO GRÁFICA DAS QUATRO GRANDES DELEÇÕES ENVOLVENDO O GENE <i>GJB6</i> E POSSÍVEL REGIÃO REGULATÓRIA.	53
FIGURA 11. ESQUEMATIZAÇÃO DAS PROTEÍNAS ENVOLVIDAS NAS CONEXÕES APICAIS, LATERAIS E BASAIS. ...	56
FIGURA 12. ESQUEMATIZAÇÃO SUMARIZADA DO PREPARO DE BIBLIOTECAS GENÔMICAS.....	62
FIGURA 13. REPRESENTAÇÃO GRÁFICA DOS MÉTODOS DE SEQUENCIAMENTO <i>SINGLE-END</i> E <i>PAIRED-END</i>	63
FIGURA 14. ILUSTRAÇÃO REPRESENTATIVA DOS CONCEITOS DE PROFUNDIDADE E ABRANGÊNCIA DE COBERTURA DE ACORDO COM O SEQUENCIAMENTO PARALELO MASSIVO.	64
FIGURA 15. REPRESENTAÇÃO DE UM SEQUENCIAMENTO MASSIVO REALIZADO PELO MÉTODO DE LIGAÇÃO POR SONDA.....	65
FIGURA 16. REPRESENTAÇÃO DO MÉTODO DE SEQUENCIAMENTO MASSIVO POR SÍNTESE E TERMINAÇÃO REVERSÍVEL CÍCLICA.....	67
FIGURA 17. REPRESENTAÇÃO DE SEQUENCIAMENTO MASSIVO UTILIZANDO A TECNOLOGIA <i>ION TORRENT</i>	68
FIGURA 18. ILUSTRAÇÃO DO SEQUENCIAMENTO UTILIZANDO A METODOLOGIA <i>PACBIO</i>	69
FIGURA 19. REPRESENTAÇÃO DO SEQUENCIAMENTO POR MEIO DA TECNOLOGIA <i>NANOPORE</i>	70
FIGURA 20. COMPARATIVO ENTRE PLATAFORMAS DE SEQUENCIAMENTO PARALELO MASSIVO, TAMANHO DOS READS E QUANTIDADE DE DADOS GERADOS	70
FIGURA 21. ESQUEMATIZAÇÃO DOS GENES RELACIONADOS À PERDA AUDITIVA NÃO-SINDRÔMICA E A PRIMEIRA VEZ QUE ESTE EM QUE FOI RELATADO NA LITERATURA.	74
FIGURA 22. REPRESENTAÇÃO DA ETAPA DE CAPTURA E ENRIQUECIMENTO DOS FRAGMENTOS UTILIZANDO <i>KIT AGILENT SURESELECT</i>	84
FIGURA 23. REPRESENTAÇÃO GRÁFICA DO PREPARO E ENRIQUECIMENTO DA BIBLIOTECA GENÔMICA UTILIZANDO O <i>KIT NEXTERA RAPID CAPTURA EXPANDED EXOME</i>	90
FIGURA 24. REPRESENTAÇÃO DO PLASMÍDEO <i>PEGFP-C1</i> E SUAS REGIÕES.....	96
FIGURA 25. REPRESENTAÇÃO DOS PRIMERS UTILIZADOS PARA INSERIR A VARIANTE C.C349T NO GENE <i>SLC24A6</i> POR MEIO DE MUTAGÊNESE SÍTIO DIRIGIDA.....	97
FIGURA 26. ESQUEMATIZAÇÃO DO PLASMÍDEO <i>PX459</i> E SUAS REGIÕES	105
FIGURA 27. FRAGMENTO DE 200 PB DO GENE <i>MYO6</i> (HOMO SAPIENS) INDICANDO A REGIÃO COM A VARIANTE CANDIDATA (REGIÃO ALVO).	106

FIGURA 28. ESQUEMATIZAÇÃO DOS PRIMERS (5'>3') UTILIZADOS PARA EXPERIMENTO PARA ANÁLISE DO TRANSCRITO DE MIOSINA 6.....	110
FIGURA 29. INFORMAÇÕES REFERENTES À FAMÍLIA <i>ISR01</i>	112
FIGURA 30. RESULTADOS DOS SEQUENCIAMENTOS REFERENTES ÀS VARIANTES CANDIDATAS NO GENE <i>SLC26A4</i>	114
FIGURA 31. RESULTADOS DE SEGREGAÇÃO DAS VARIANTES CANDIDATAS NA FAMÍLIA <i>ISR01</i>	115
FIGURA 32. GEL DE AGAROSE 3% APÓS <i>RFLP-PCR</i> UTILIZANDO ENDONUCLEASE <i>EAM1104I</i>	115
FIGURA 33. RESULTADOS DO EXPERIMENTOS DE CO-LOCALIZAÇÃO DA PROTEÍNA PENDRINA NORMAL E COM A VARIANTE C.349C>T (P.LEU117PHE).....	117
FIGURA 34. HEREDOGRAMA DA FAMÍLIA <i>ISR02</i>	118
FIGURA 35. ESQUEMATIZAÇÃO DO TRANSCRITO DO GENE <i>USH2A</i> E A VARIANTE IDENTIFICADA NA FAMÍLIA <i>ISR02</i> , ASSIM COMO SUA PROTEÍNA CANÔNICA.	119
FIGURA 36. RESULTADOS DA ANÁLISE DE SEGREGAÇÃO DA VARIANTE NA FAMÍLIA <i>ISR02</i>	120
FIGURA 37. RESULTADOS DO <i>RFLP-PCR</i> PARA A ANÁLISE DE FREQUÊNCIA DA VARIANTE CANDIDATA NA FAMÍLIA <i>ISR02</i>	121
FIGURA 38. INFORMAÇÕES SOBRE A FAMÍLIA <i>ISR03</i>	122
FIGURA 39. ESQUEMATIZAÇÃO DO TRANSCRITO DO GENE <i>GATA3</i> E A VARIANTE IDENTIFICADA NA FAMÍLIA <i>ISR03</i> , ASSIM COMO SUA PROTEÍNA CANÔNICA.	123
FIGURA 40. HEREDOGRAMA CONTENDO OS RESULTADOS DA ANÁLISE DO GENE <i>GATA3</i> NA FAMÍLIA <i>ISR03</i> . .	124
FIGURA 41. GEL DE AGAROSE 2% CORADO COM BROMETO DE ETÍDEO REFERENTE AO ESTUDO DA FREQUÊNCIA DA VARIANTE C.681_682INSACCACCCCATCAGCACTCACCCGCCCTACGTGCC DO GENE <i>GATA3</i>	125
FIGURA 42. HEREDOGRAMA DA FAMÍLIA <i>ISR04</i>	126
FIGURA 43. RESULTADOS DA ANÁLISE DE SEGREGAÇÃO DA VARIANTE NA FAMÍLIA <i>ISR04</i>	127
FIGURA 44. REPRESENTAÇÃO DA POSSÍVEL EXCLUSÃO DO SÍTIO DOADOR DE SPLICING CAUSADO PELA VARIANTE CANDIDATA NA FAMÍLIA <i>ISR04</i>	129
FIGURA 45. ESQUEMATIZAÇÃO DO POSSÍVEL EFEITO DA VARIANTE C.139+1G>A NO GENE <i>SLC12A6</i>	130
FIGURA 46. ANÁLISE DO FRAGMENTO DE CDNA DA FAMÍLIA <i>ISR04</i> PARA DETECÇÃO DA AUSÊNCIA DO ÉXON 3 NO TRANSCRITO DO GENE <i>SLC12A4</i>	131
FIGURA 47. MICROSCOPIA CONFOCAL DE CÉLULAS <i>COS7</i>	132
FIGURA 48. ANÁLISE ELETROFISIOLÓGICA DA PROTEÍNA <i>SLC12A6</i> NORMAL E CONTENDO A VARIANTE C.139+1G>A.	133
FIGURA 49. INFORMAÇÕES SOBRE A FAMÍLIA <i>ISR05</i>	135
FIGURA 50. ESQUEMATIZAÇÃO DAS VARIANTES CANDIDATAS DA FAMÍLIA <i>ISR05</i> NA OTOFERLINA.....	136
FIGURA 51. REPRESENTAÇÃO DA PREDIÇÃO DE EXCLUSÃO DO SÍTIO ACCEPTOR DE SPLICING CAUSADO PELA VARIANTE C.5193-1G>A NA FAMÍLIA <i>ISR05</i>	137
FIGURA 52. ESQUEMATIZAÇÃO DO POSSÍVEL EFEITO DA VARIANTE C.5193-1G>A NO GENE <i>OTOF</i>	138
FIGURA 53. REPRESENTAÇÃO DA PREDIÇÃO DE EXCLUSÃO DO SÍTIO ACCEPTOR DE SPLICING CAUSADO PELA VARIANTE C.4227+1G>T NA FAMÍLIA <i>ISR05</i>	139

FIGURA 54. ESQUEMATIZAÇÃO DO POSSÍVEL EFEITO DA VARIANTE C.4227+1G>T NO GENE <i>OTOF</i>	139
FIGURA 55. RESULTADOS DE SEGREGAÇÃO DAS VARIANTES CANDIDATAS NO GENE <i>OTOF</i> NA FAMÍLIA <i>ISR05</i>	140
FIGURA 56. RESULTADOS DO <i>RFLP-PCR</i> PARA CHECAGEM DA FREQUÊNCIA DA VARIANTE C.4227+1G>T DO GENE <i>OTOF</i>	142
FIGURA 57. INFORMAÇÕES SOBRE A FAMÍLIA <i>ISR06</i>	143
FIGURA 58. RESULTADOS DE VALIDAÇÃO E SEGREGAÇÃO DA VARIANTE C.1473_1473+2DELGGTINSC NO GENE <i>MYO6</i>	144
FIGURA 59. REPRESENTAÇÃO DA PROTEÍNA MIOSINA VI E SUAS REGIÕES.	145
FIGURA 60. DIMERIZAÇÃO DA MIOSINA VI.	146
FIGURA 61. REPRESENTAÇÃO DA PREDIÇÃO DE EXCLUSÃO DO SÍTIO DOADOR DE SPLICING CAUSADO PELA VARIANTE CANDIDATA NA FAMÍLIA <i>ISR06</i>	148
FIGURA 62. ESQUEMATIZAÇÃO DO POSSÍVEL EFEITO DA VARIANTE C.1473_1473+2DELGGTINSC NO GENE <i>MYO6</i>	149
FIGURA 63. VISUALIZAÇÃO DOS RESULTADOS DE <i>RFLP-PCR</i> DA VARIANTE CANDIDATA DA FAMÍLIA <i>ISR06</i> . .	151
FIGURA 64. INFORMAÇÕES DAS FAMÍLIAS <i>ISR08</i> E <i>ISR09</i>	153
FIGURA 65. BANDA 15Q15.3, INDICANDO A REGIÃO EXCLUÍDA (EM VERMELHO) PELA DELEÇÃO DE 0,1 MB IDENTIFICADA EM HETEROZIGOSE TANTO NA FAMÍLIA <i>ISR08</i> QUANTO <i>ISR09</i>	154
FIGURA 66. RESULTADOS MOLECULARES DAS FAMÍLIAS <i>ISR08</i> E <i>ISR09</i>	155
FIGURA 67. INFORMAÇÕES SOBRE A FAMÍLIA <i>ISR15</i>	156
FIGURA 68. RESULTADOS DA ANÁLISE DA VARIANTE CANDIDATA NA FAMÍLIA <i>ISR15</i>	158
FIGURA 69. INFORMAÇÕES SOBRE A FAMÍLIA <i>ISR19</i>	160
FIGURA 70. REPRESENTAÇÃO DA PROTEÍNA CODIFICADA PELO GENE <i>COL11A2</i> E SUAS REGIÕES.	161
FIGURA 71. ELETROFEROGRAMAS DAS VARIANTES C.3385G>A E C.966_967INSC, INDICANDO AMBAS VARIANTES EM HETEROZIGOSE NO GENE <i>COL11A2</i> DO INDIVÍDUO III:3.	162
FIGURA 72. REPRESENTAÇÃO DA VARIANTE P.GLY1129ARG, ALTERANDO O PRIMEIRO RESÍDUO DO <i>MOTIF</i> CONSERVADO DO GENE <i>COL11A2</i>	162
FIGURA 73. RESULTADOS DE VALIDAÇÃO E SEGREGAÇÃO DAS VARIANTES CANDIDATAS NO GENE <i>COL11A2</i> NA FAMÍLIA <i>ISR19</i>	163
FIGURA 74. INFORMAÇÕES REFERENTES À FAMÍLIA <i>BRA01</i>	164
FIGURA 75. ESQUEMATIZAÇÃO DA MUTAÇÃO P.ARG705HIS NA MIOSINA NÃO-MUSCULAR DE CADEIA PESADA A (<i>NMHC-IIA</i>)	165
FIGURA 76. RESULTADOS DOS ESTUDOS ENVOLVENDO A FAMÍLIA <i>BRA01</i>	168
FIGURA 77. INFORMAÇÕES REFERENTES À FAMÍLIA <i>BRA02</i>	168
FIGURA 78. REPRESENTAÇÃO DA ESTRUTURA DA PROTEÍNA <i>GATA3</i> , INDICANDO O LOCAL DA MUTAÇÃO P.ARG367*	171
FIGURA 79. RESULTADOS DO SEQUENCIAMENTO DE SANGER DA MUTAÇÃO C.1099C>T NO GENE <i>GATA3</i> , INDICANDO POSSÍVEL CASO DE MUTAÇÃO <i>DE NOVO</i>	172
FIGURA 80. AUDIOMETRIAS ATUAIS DOS INDIVÍDUOS I:1, II:2 E III:2	175

FIGURA 81. SEGREGAÇÃO DA MUTAÇÃO C.1099C>T NO GENE <i>GATA3</i> NA FAMÍLIA <i>BRA02</i>	176
FIGURA 82. INFORMAÇÕES REFERENTES À FAMÍLIA <i>ISR07</i>	177
FIGURA 83. SEGREGAÇÃO DA VARIANTE CANDIDATA C.3914C>T NO GENE <i>USH2A</i> NA FAMÍLIA <i>ISR07</i>	178
FIGURA 84. INFORMAÇÕES REFERENTES À FAMÍLIA <i>ISR10</i>	179
FIGURA 85. HEREDOGRAMA DA FAMÍLIA <i>ISR11</i> ..	180
FIGURA 86. INFORMAÇÕES SOBRE A FAMÍLIA <i>ISR12</i>	181
FIGURA 87. INFORMAÇÕES SOBRE A FAMÍLIA <i>ISR13</i>	182
FIGURA 88. SEGREGAÇÃO DAS VARIANTES CANDIDATAS NO GENE <i>CDH23</i> NA FAMÍLIA <i>ISR13</i>	183
FIGURA 89. INFORMAÇÕES SOBRE A FAMÍLIA <i>ISR14</i>	184
FIGURA 90. SEGREGAÇÃO DAS VARIANTES CANDIDATAS DA FAMÍLIA <i>ISR14</i>	185
FIGURA 91. HEREDOGRAMA DA FAMÍLIA <i>ISR16</i> ..	186
FIGURA 92. HEREDOGRAMA DA FAMÍLIA <i>ISR17</i> ..	187
FIGURA 93. HEREDOGRAMA DA FAMÍLIA <i>ISR18</i> ..	188
FIGURA 94. INFORMAÇÕES SOBRE A FAMÍLIA <i>ISR20</i>	190
FIGURA 95. INFORMAÇÕES DA FAMÍLIA <i>BRA03</i>	192
FIGURA 96. HEREDOGRAMA DA FAMÍLIA <i>BRA04</i>	192
FIGURA 97. INFORMAÇÕES REFERENTES À FAMÍLIA <i>BRA05</i>	193

Lista de fluxogramas

FLUXOGRAMA 1. RESUMO DA ANÁLISE BIOINFORMÁTICA DO SEQUENCIAMENTO PARALELO MASSIVO.....	74
---	----

Lista de gráficos

GRÁFICO 1. FREQUÊNCIA DE INDIVÍDUOS AFETADOS COM PERDA AUDITIVA DE ACORDO COM DADOS DA OMS (WORLD HEALTH ORGANIZATION 2017).....	30
GRÁFICO 2. RESULTADOS DE EXPRESSÃO GÊNICA DO TRANSCRITO MIOSINA VI.....	150

Lista de tabelas

TABELA 1. CLASSIFICAÇÃO DO GRAU DE PERDA AUDITIVA DE ACORDO COM SILMAN & SILVERMAN (1997)...	31
TABELA 2. PRINCIPAIS CAUSAS DE PERDA AUDITIVA.....	32
TABELA 3. PRINCIPAIS SÍNDROMES QUE APRESENTAM PERDA AUDITIVA COMO MANIFESTAÇÃO CLÍNICA.....	34
TABELA 4. LOCI E GENES RELACIONADOS À PERDA AUDITIVA SINDRÔMICA MITOCONDRIAL.....	36
TABELA 5. LOCI E GENES RELACIONADOS À PERDA AUDITIVA NÃO-SINDRÔMICA AUTOSSÔMICA DOMINANTE (DFNA).....	38
TABELA 6. LOCI E GENES RELACIONADOS À PERDA AUDITIVA NÃO-SINDRÔMICA AUTOSSÔMICA RECESSIVA (DFNB).....	40
TABELA 7. LOCI E GENES RELACIONADOS À PERDA AUDITIVA NÃO-SINDRÔMICA LIGADA AO CROMOSSOMO X (DFNX).....	43
TABELA 8. LOCI E GENES RELACIONADOS À PERDA AUDITIVA NÃO-SINDRÔMICA MITOCONDRIAL.....	45
TABELA 9. PRINCIPAIS FERRAMENTAS DE PREDIÇÃO <i>IN SILICO</i> E SUAS RESPECTIVAS CLASSIFICAÇÕES.....	73
TABELA 10. FAMÍLIAS DO ORIENTE MÉDIO ESTUDADAS POR MEIO DO PAINEL DE CAPTURA <i>HEAR-SEQ V3</i>	80
TABELA 11. GENES PRESENTES NO PAINEL DE CAPTURA <i>HEAR-SEQ V3</i>	81
TABELA 12. <i>PRIMERS</i> UTILIZADOS PARA VALIDAR/CONFIRMAR VARIANTES CANDIDATAS IDENTIFICADAS COM O PAINEL <i>HEAR-SEQ V3</i> EM FAMÍLIAS DO ORIENTE MÉDIO.....	86
TABELA 13. <i>PRIMERS</i> UTILIZADOS PARA VALIDAR/CONFIRMAR VARIANTES CANDIDATAS IDENTIFICADAS COM O SEQUENCIAMENTO COMPLETO DO EXOMA EM FAMÍLIAS BRASILEIRAS.....	92
TABELA 14. ENDONUCLEASES UTILIZADAS PARA ANÁLISE EM LARGA ESCALA DA FREQUÊNCIA DA VARIANTE CANDIDATA.....	94
TABELA 15. MARCADORES POLIMÓRFICOS (<i>STR</i>) E SEUS RESPECTIVOS <i>PRIMERS</i> UTILIZADOS PARA ANALISAR PATERNIDADE.....	95
TABELA 16. <i>PRIMERS</i> UTILIZADOS PARA EXCLUSÃO DE <i>OTS</i>	109
TABELA 17. VARIANTES CANDIDATAS IDENTIFICADAS NA FAMÍLIA <i>ISR01</i> E PRINCIPAIS RESULTADOS DAS ANÁLISES DE PREDIÇÃO <i>IN SILICO</i>	112
TABELA 18. VARIANTES CANDIDATAS IDENTIFICADAS NA FAMÍLIA <i>ISR02</i> E PRINCIPAIS RESULTADOS DAS ANÁLISES DE PREDIÇÃO <i>IN SILICO</i>	118
TABELA 19. VARIANTES CANDIDATAS IDENTIFICADAS NA FAMÍLIA <i>ISR04</i> E PRINCIPAIS RESULTADOS DAS ANÁLISES DE PREDIÇÃO <i>IN SILICO</i>	126
TABELA 20. VARIANTES CANDIDATAS IDENTIFICADAS NA FAMÍLIA <i>ISR05</i> E PRINCIPAIS RESULTADOS DAS ANÁLISES DE PREDIÇÃO <i>IN SILICO</i>	135
TABELA 21. VARIANTES CANDIDATAS IDENTIFICADAS NA FAMÍLIA <i>ISR06</i> E PRINCIPAIS RESULTADOS DAS ANÁLISES DE PREDIÇÃO <i>IN SILICO</i>	143
TABELA 22. MUTAÇÕES NO GENE <i>MYO6</i> RELACIONADOS À PERDA AUDITIVA EM HUMANOS.....	147
TABELA 23. VARIANTE CANDIDATA IDENTIFICADA NA FAMÍLIA <i>BRA01</i> E PRINCIPAIS RESULTADOS DAS ANÁLISES DE PREDIÇÃO <i>IN SILICO</i>	165
TABELA 24. VARIANTE CANDIDATA IDENTIFICADA NA FAMÍLIA <i>BRA02</i> E PRINCIPAIS RESULTADOS DAS ANÁLISES DE PREDIÇÃO <i>IN SILICO</i>	169

TABELA 25. RESULTADOS PRÉVIOS ENVOLVENDO A MUTAÇÃO P.ARG367* E SÍNDROME <i>HDR</i>	172
TABELA 26. RESULTADOS DA ANÁLISE DE PATERNIDADE NA FAMÍLIA <i>BRA02</i>	173
TABELA 27. VARIANTE CANDIDATA DA FAMÍLIA <i>ISR07</i> E PRINCIPAIS RESULTADOS DAS ANÁLISES DE PREDIÇÃO <i>IN SILICO</i>	178
TABELA 28. VARIANTE CANDIDATA DA FAMÍLIA <i>ISR11</i> E PRINCIPAIS RESULTADOS DAS ANÁLISES DE PREDIÇÃO <i>IN SILICO</i>	180
TABELA 29. VARIANTES CANDIDATAS DA FAMÍLIA <i>ISR13</i> E PRINCIPAIS RESULTADOS DAS ANÁLISES DE PREDIÇÃO <i>IN SILICO</i>	183
TABELA 30. VARIANTE CANDIDATA DA FAMÍLIA <i>ISR17</i> E PRINCIPAIS RESULTADOS DAS ANÁLISES DE PREDIÇÃO <i>IN SILICO</i>	187
TABELA 31. VARIANTE CANDIDATA DA FAMÍLIA <i>ISR20</i> E PRINCIPAIS RESULTADOS DAS ANÁLISES DE PREDIÇÃO <i>IN SILICO</i>	190

Lista de abreviaturas e siglas

ABraOM	Arquivo Brasileiro Online de Mutações
ASCII	<i>American Standard Code for Information Interchange</i>
ATP	Adenosina Trifosfato (do inglês <i>Adenosine triphosphate</i>)
AVA	Aqueduto Vestibular Alargado
BAM	<i>Binary Alignment Map</i>
BIPMed	<i>Brazilian Initiative on Precision Medicine</i>
BS	<i>Branch site</i>
BWA	<i>Burrows-Wheeler Aligner</i>
BWT	<i>Burrows-Wheeler transform</i>
Cas9	<i>CRISPR-associated protein-9 nuclease</i>
CBD	<i>Cargo-Binding Domain</i>
CCD	<i>Charge Coupled Device</i>
CCE	Células Ciliadas Externas
CCI	Células Ciliadas Internas
CCS	<i>Circular Consensus Sequencing</i>
cDNA	DNA complementar
CHO	<i>Chinese hamster ovary</i>
CNV	<i>Copy number Variation</i>
CODIS	<i>Combined DNA Index System</i>
CRISPR	<i>Clustered regularly interspaced short palindromic repeats</i>
cRNA	RNA complementar
CRT	<i>cyclic reversible termination</i>
dBs	Decibéis
ddNTP	<i>Dideoxynucleotide triphosphate</i>
DFNA	Perda auditiva autossômica dominante
DFNB	Perda auditiva autossômica recessiva
DFNX	Perda auditiva ligada ao cromossomo X
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>
DMSO	<i>Dimethyl sulfoxide</i>
DNA	Ácido Desoxirribonucléico (do inglês <i>deoxyribonucleic acid</i>)
dNTP	<i>Deoxyribonucleotide triphosphate</i>
ESE	<i>exonic splicing enhancer</i>
FOG	<i>Friends of GATA</i>
FT	Fator de transcrição
gDNA	DNA genômico
GFP	<i>Green Fluorescent Protein</i>
GRCh38	<i>Genome Reference Consortium Human genome build 38</i>
HDR	<i>Hypoparathyroidism, Deafness and Renal disease</i>
Hz	Hertz
kb	Kilobase
KHz	KiloHertz
LAE	<i>Lever Arm Extension</i>
miRNA	microRNA
MPS	<i>Massive Parallel Sequencing</i>
mRNA	RNA mensageiro
ncRNA	RNA não codificante (do inglês <i>non-coding RNA</i>)
NGS	<i>Next Generation Sequencing</i>
NSHL	Perda auditiva não-sindrômica (do inglês <i>Non-Syndromic Hearing Loss</i>)
OMIM	<i>Online Mendelian Inheritance in Man</i>
OMS	Organização Mundial da Saúde
ORF	<i>Open Reading Frames</i>
OTS	<i>Off-Target Sites</i>
PAM	<i>Protospacer adjacent motif</i>
pbs	Par de base
PBS	<i>Phosphate-buffered saline</i>
PCR	Reação em Cadeia de Polimerase (do inglês <i>Polymerase chain reaction</i>)
PFA	Paraformaldeído

pH	Potencial hidrogeniônico (do inglês potential of hydrogen)
PTH	<i>Parathyroid hormone</i>
QC	<i>Quality Control</i>
qPCR	<i>quantitative polymerase chain reaction</i>
RFLP-PCR	<i>Restriction Fragment Length Polymorphism PCR</i>
RNA	Ácido Ribonucleico (do inglês <i>ribonucleic acid</i>)
rRNA	RNA ribossomal
SAH	<i>single alpha-helix</i>
SAM	<i>Sequence Alignment Map</i>
SBL	<i>Sequencing by ligation</i>
SBS	<i>Sequencing by synthesis</i>
sgRNA	<i>single-guide RNA</i>
SHL	Perda auditiva sindrômica (do inglês <i>Syndromic Hearing Loss</i>)
SNA	<i>single-nucleotide addition</i>
SS	<i>Sítio de splicing (do inglês Splicing Site)</i>
ssDNA	DNA fita simples (do inglês <i>single-stranded DNA</i>)
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
TGC	<i>Targeted Genomic Capture</i>
TIFF	<i>Tagged Image File Format</i>
tRNA	RNA transportador
UFC	Unidades Formadoras de Colônia
UTR	Região não traduzida (do inglês <i>UnTranslated Region</i>)
VCF	<i>Variant Call Format</i>
WES	<i>Whole Exome Sequencing</i>
WGS	<i>Whole Genome Sequencing</i>
ZnF	<i>Zinc Finger</i>

1. INTRODUÇÃO	22
1.1. AUDIÇÃO	22
1.1.1. Anatomia da orelha	22
1.1.1.1. Orelha externa	23
1.1.1.2. Orelha média	23
1.1.1.3. Orelha interna	23
1.1.2. O som	27
1.1.3. Fisiologia da audição	27
1.2. PERDA AUDITIVA	28
1.2.1. Classificação das perdas auditivas	31
1.2.2. Etiologia da perda auditiva	32
1.2.2.1. Perda auditiva de origem genética	33
1.2.2.1.1. Perda auditiva síndrômica (SHL)	34
1.2.2.1.2. Perda auditiva não-síndrômica (NSHL)	36
1.2.2.1.2.1. Perda auditiva não-síndrômica autossômica dominante (DFNA)	37
1.2.2.1.2.2. Perda auditiva não-síndrômica autossômica recessiva (DFNB)	39
1.2.2.1.2.3. Perda auditiva não-síndrômica ligada ao cromossomo X (DFNX)	42
1.2.2.1.2.4. Perda auditiva não-síndrômica mitocondrial	43
1.2.2.2. Perda auditiva de origem ambiental	33
1.3. A ORQUESTRA DE GENES	46
1.3.1. Regulação gênica	46
1.3.2. Comunicação celular	48
1.3.3. Estrutura da orelha interna	54
1.4. DIAGNÓSTICO DA PERDA AUDITIVA	57
1.4.1. Diagnóstico molecular da perda auditiva	58
1.4.1.1. Sequenciamento paralelo massivo	60
1.4.1.1.1. Preparo da biblioteca genômica	62
1.4.1.1.2. Sequenciamento	63
1.4.1.1.2.1. Sequenciamento de fragmentos curtos por ligação	64
1.4.1.1.2.2. Sequenciamento de fragmentos curtos por síntese	65
1.4.1.1.2.3. Sequenciamento massivo de fragmentos longos	68
1.4.1.1.3. Análise bioinformática	71
1.4.2. Sequenciamento paralelo massivo e perda auditiva	74
1.5. JUSTIFICATIVA DO TRABALHO	76
1.6. HIPÓTESE DA TESE	77
2. OBJETIVOS	78
3. CASUÍSTICA E MÉTODOS	79
3.1. CASUÍSTICA	79
3.2. ANÁLISE DE FAMÍLIAS DO ORIENTE MÉDIO	80
3.2.1. Triagem inicial da perda auditiva	80
3.2.2. Painel de captura HEar-Seq v3	81

3.2.3.	<i>Preparo de biblioteca enriquecida e sequenciamento massivo utilizando HEar-Seq v3 ...</i>	82
3.2.4.	<i>Análise bioinformática</i>	84
3.2.5.	<i>Priorização das variantes.....</i>	85
3.2.6.	<i>Validação das variantes candidatas.....</i>	85
3.3.	ANÁLISE DE FAMÍLIAS BRASILEIRAS	88
3.3.1.	<i>Coleta e extração de material genético.....</i>	88
3.3.2.	<i>Qualidade e concentração de DNA extraído.....</i>	88
3.3.3.	<i>Triagem primária para perda auditiva</i>	88
3.3.4.	<i>Preparo de biblioteca enriquecida e sequenciamento completo do exoma (WES)</i>	89
3.3.5.	<i>Análise bioinformática</i>	91
3.3.6.	<i>Priorização das variantes.....</i>	91
3.3.7.	<i>Validação das variantes candidatas.....</i>	92
3.4.	ANÁLISE DE SEGREGAÇÃO FAMILIAL DAS VARIANTES CANDIDATAS	93
3.5.	ANÁLISE DE FREQUÊNCIA DA VARIANTE NA POPULAÇÃO	93
3.6.	TESTE DE PATERNIDADE	94
3.7.	ESTUDOS FUNCIONAIS E VALIDAÇÕES DE PATOGENICIDADE DAS VARIANTES CANDIDATAS.....	95
3.7.1.	<i>Estudos de co-localização de proteína</i>	95
3.7.1.1.	Família <i>Isr01</i>	95
3.7.1.1.1.	Mutagênese sitio dirigida	96
3.7.1.1.2.	Transformação de células competentes	97
3.7.1.1.3.	Preparo de <i>MiniPrep</i>	98
3.7.1.1.4.	Preparo de <i>MidiPrep</i>	98
3.7.1.1.5.	Cultura celular com células animais.....	99
3.7.1.1.6.	Descongelando as células animais.....	99
3.7.1.1.7.	Repique de células animais	99
3.7.1.1.8.	Transfecção	100
3.7.1.1.9.	Imunocitoquímica para experimentos de co-localização	100
3.7.1.1.9.1.	Fixação das células animais.....	100
3.7.1.1.9.2.	Coloração das células animais e captura de imagens por microscopia confocal	101
3.7.1.2.	Família <i>Isr04</i>	102
3.7.1.2.1.	Transfecção	103
3.7.1.2.2.	Imunocitoquímica para experimentos de co-localização	103
3.7.1.2.2.1.	Coloração das células animais e captura de imagens por microscopia confocal	103
3.7.1.2.3.	Testes eletrofisiológicos.....	104
3.7.2.	<i>Estudo funcional da proteína com a variante utilizando a técnica CRISPR/Cas9</i>	105
3.7.2.1.	Família <i>Isr06</i>	105
3.7.2.1.1.	Construção do plasmídeo de expressão <i>CRISPR/Cas9</i> e desenho do <i>sgRNA</i>	105
3.7.2.1.2.	Construção da molécula <i>ssDNA Donor</i>	107
3.7.2.1.3.	Cultura de células e transfecção.....	108
3.7.2.1.4.	Confirmação de células imortalizadas contendo o gene <i>MYO6</i> endógeno com a variante c.1473_1473+2delGGTinsC.....	108

3.7.2.1.5.	Análise de <i>Off-Target Sites</i>	109
3.7.2.1.6.	Extração de mRNA e análise de transcrito por <i>PCR</i> em tempo real	109
4.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	111
4.1.	ESTUDO CONCLUÍDOS COM O USO DO SEQUENCIAMENTO PARALELO MASSIVO	111
4.1.1.	Família <i>Isr01</i>	111
4.1.2.	Família <i>Isr02</i>	118
4.1.3.	Família <i>Isr03</i>	122
4.1.4.	Família <i>Isr04</i>	126
4.1.5.	Família <i>Isr05</i>	134
4.1.6.	Família <i>Isr06</i>	142
4.1.7.	Família <i>Isr08</i> e <i>Isr09</i>	152
4.1.8.	Família <i>Isr15</i>	155
4.1.9.	Família <i>Isr19</i>	160
4.1.10.	Família <i>Bra01</i>	163
4.1.11.	Família <i>Bra02</i>	168
4.2.	ESTUDO DE FAMÍLIAS NÃO CONCLUÍDOS COM O USO DE SEQUENCIAMENTO PARALELO MASSIVO	176
4.2.1.	Casos inconclusivos utilizando o painel <i>HEar-Seq v3</i>	177
4.2.1.1.	Família <i>Isr07</i>	177
4.2.1.2.	Família <i>Isr10</i>	179
4.2.1.3.	Família <i>Isr11</i>	179
4.2.1.4.	Família <i>Isr12</i>	181
4.2.1.5.	Família <i>Isr13</i>	182
4.2.1.6.	Família <i>Isr14</i>	184
4.2.1.7.	Família <i>Isr16</i>	185
4.2.1.8.	Família <i>Isr17</i>	186
4.2.1.9.	Família <i>Isr18</i>	188
4.2.1.10.	Família <i>Isr20</i>	189
4.2.2.	Casos inconclusivos utilizando o <i>WES</i>	191
4.2.2.1.	Família <i>Bra03</i>	191
4.2.2.2.	Família <i>Bra04</i>	192
4.2.2.3.	Família <i>Bra05</i>	193
4.3.	SEQUENCIAMENTO PARALELO MASSIVO E PERDA AUDITIVA	194
5.	CONCLUSÕES	199
6.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	205
ANEXOS	235

1. INTRODUÇÃO

1.1. Audição

1.1.1. Anatomia da orelha

A audição é um dos sistemas mais complexos dos humanos, sendo a orelha o órgão responsável pela captação, condução e mecanotransdução das ondas sonoras em impulsos nervosos, além do balanço e equilíbrio. Este órgão vestibulococlear é altamente sensível às ondas sonoras do ambiente, sendo capaz de interpretar as sons variando entre 20 Hz e 20 KHz, amplificando os sinais mais de 100 vezes (SCHWANDER; KACHAR; MÜLLER, 2010). O desenvolvimento da orelha ocorre a partir do placóide ótico aproximadamente 22 dias após a fecundação, atingindo sua diferenciação morfológica com seis meses de gestação (PETIT, 1996). Anatomicamente ela é compartimentalizada em três porções: orelha externa, média e interna (figura 1).

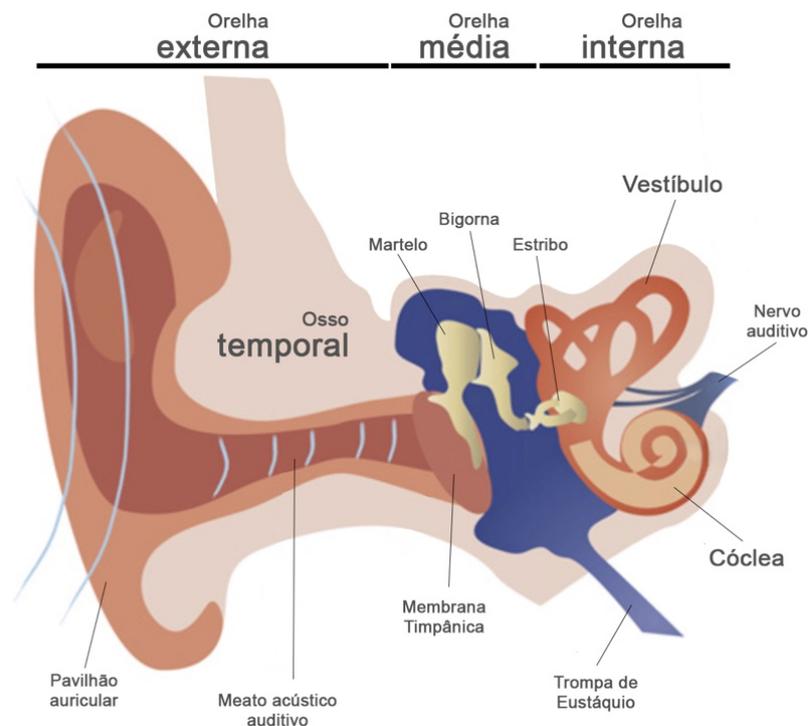


Figura 1. Representação da anatomia da orelha (Modificado de DROR; AVRAHAM, 2010).

1.1.1.1. Orelha externa

A orelha externa conduz as ondas sonoras até a membrana timpânica. Além disso, é responsável pela proteção contra agentes infecciosos. Estruturalmente, ela é composta pelo pavilhão auricular, apêndice cartilaginoso localizado lateralmente à cabeça, e pelo meato acústico externo, um canal envolto em cartilagem que conduz as vibrações até a orelha média (figura 1) (DROR; AVRAHAM, 2010).

1.1.1.2. Orelha média

A porção média da orelha é uma cavidade preenchida por ar e composta pela tuba auditiva (trompa de Eustáquio), pela membrana timpânica e três ossículos: martelo, bigorna e estribo. As vibrações da membrana timpânica (fases de compressão e de rarefação) são transmitidas para o martelo, que transfere estas vibrações para a bigorna, que por sua vez repassa para o estribo, em um movimento semelhante ao de um pistão, atingindo a orelha interna pela janela oval. A tuba auditiva tem a função exclusiva de manter a pressão adequada nesta porção da orelha, fundamental para a vibrações da membrana timpânica e dos ossículos (figura 1) (DROR; AVRAHAM, 2010).

1.1.1.3. Orelha interna

A orelha interna é composta pelo labirinto anterior (cóclea), responsável pela decodificação das ondas sonoras, e pelo labirinto posterior (vestíbulo e canais semicirculares), responsável pela orientação tridimensional e percepção da gravidade (figura 2) (DROR; AVRAHAM, 2010).

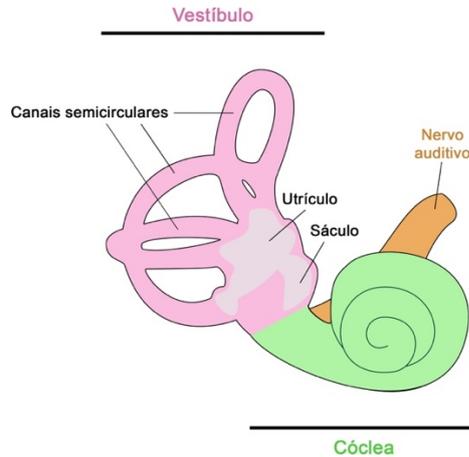


Figura 2. Representação da secção interna da orelha (Elaborado pelo autor).

A cóclea é o órgão que realiza a tradução das ondas sonoras em impulsos nervosos, fenômeno denominado mecanotransdução. Tem estrutura cônica espiralada com aproximadamente 9 mm de diâmetro e parede extremamente delgada, realizando duas voltas e meia ao redor do modíolo. O canal coclear é compartimentalizado em três diferentes escalas: vestibular, média e timpânica. Tanto a escala vestibular quanto a timpânica são preenchidas com Perlinfa, fluido rico em sódio, porém pobre em potássio e cálcio. A janela oval, região de contato com o estribo, está presente na escala vestibular. Já a outra janela da cóclea, denominada redonda, se encontra na escala timpânica. No meio destas duas escalas encontra-se a escala média, sendo esta preenchida pela Endolinfa, fluido rico em potássio oriundo da estria vascular e fundamental para o processo auditivo (figura 3) (DROR; AVRAHAM, 2010; PETIT, 1996).

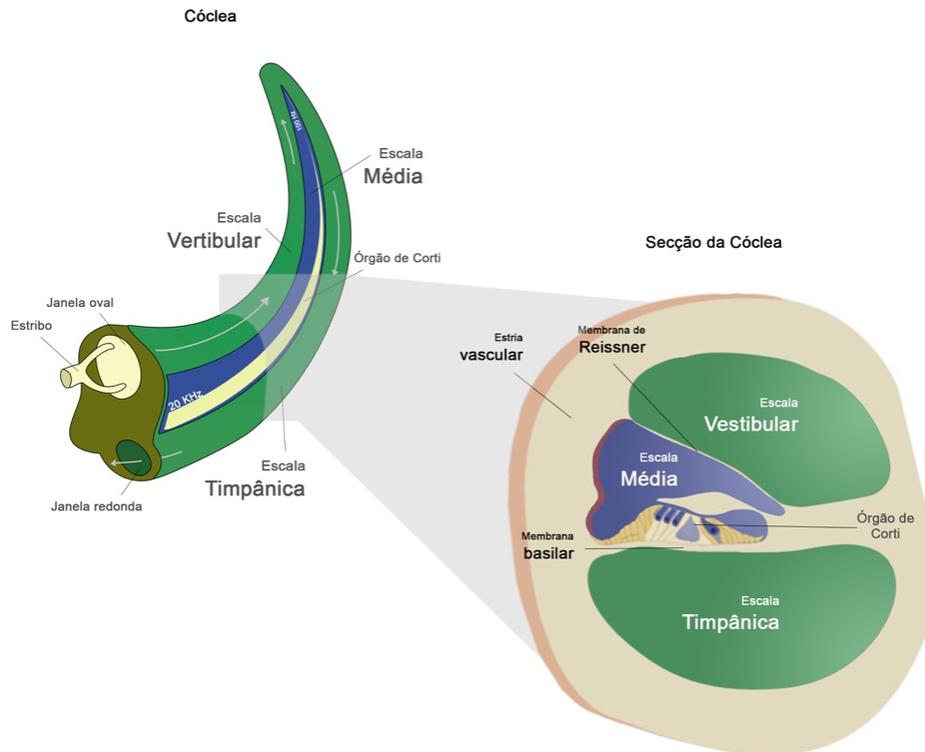


Figura 3. Esquematização da cóclea "alongada" e das compartimentalizações da cóclea (Modificado de DROR; AVRAHAM, 2010).

A delgada membrana que se encontra entre a escala vestibular e média é denominada membrana de *Reissner* ou vestibular. A membrana entre a escala média e timpânica recebe o nome de membrana basilar, local onde encontra-se o epitélio sensorial do sistema auditivo denominado Órgão de Corti ou Órgão Espiral (figura 3) (DROR; AVRAHAM, 2009).

O Órgão de Corti é a principal estrutura sensorial da audição, sendo composto por, aproximadamente, 16.000 células ciliadas agrupadas em uma fileira de Células Ciliadas Internas (CCI) e três fileiras de Células Ciliadas Externas (CCE), além de uma ampla variedade de células de suporte (células de *Deiters*, *Hensen* e *Claudius*) (figura 4) (DROR; AVRAHAM, 2010; PETIT, 1996; SCHWANDER; KACHAR; MÜLLER, 2010).

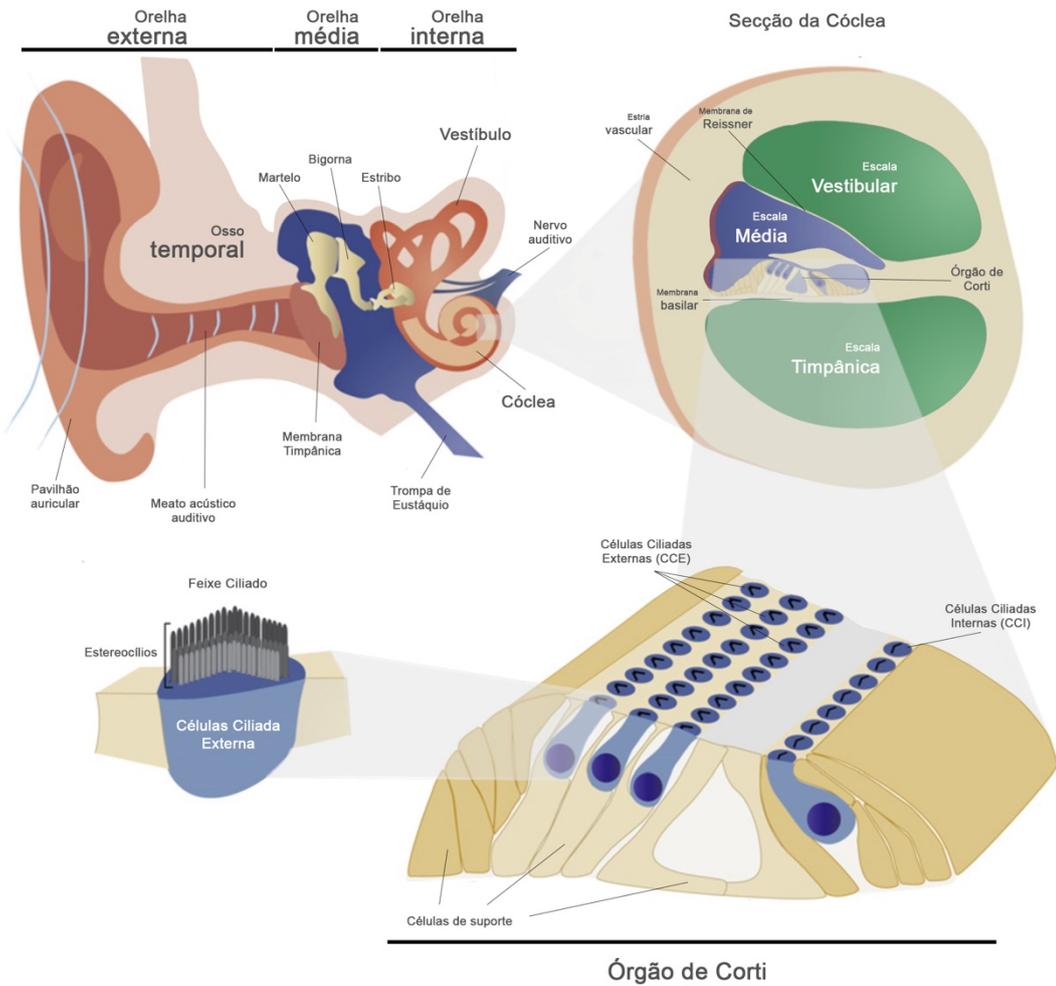


Figura 4. Representação do Órgão de Corti e estereocílios da Células Ciliadas Externas (Modificado de DROR; AVRAHAM, 2010).

A porção apical das células ciliadas contém projeções ricas em actina, denominadas estereocílios, estando interconectados através de proteínas formando o feixe ciliado. Este é disposto em fileiras de tamanhos decrescentes, obedecendo a disposição em “V” ou “W” invertido, orientada no desenvolvimento celular pelos cinocílios. Acima das células ciliadas do Órgão de Corti encontra-se a membrana tectorial, uma estrutura rica em colágeno que contribui para a deflexão e hiperflexão dos feixes ciliados das células ciliadas (DROR; AVRAHAM, 2009; RICHARDSON; DE MONVEL; PETIT, 2011; SCHWANDER; KACHAR; MÜLLER, 2010).

Além das células ciliadas e de suporte, o órgão de Corti possui entre 30.000 e 50.000 neurônios aferentes, sendo 90% neurônios do tipo I que realizam sinapses com as CCI, que por sua vez apresenta mais de 15 neurônios aferentes cada. Os

demais neurônios são do tipo II e inervam as CCE. A captação dos impulsos nervosos gerados nas células ciliadas internas do órgão de Corti, assim como a sua transmissão para o córtex auditivo, no lobo temporal cerebral, se dão pelo VIII par de nervos craniano, também conhecido como nervo vestibulococlear ou auditivo (BENOUDIBA; TOULGOAT; SARRAZIN, 2013; DROR; AVRAHAM, 2010).

1.1.2. O som

O som é o resultado da perturbação física de um meio causado pelas ondas sonoras. Estas são ondas longitudinais de compressão que se propagam pelo meio físico como a água, ar, metal, etc. A propagação dessas ondas permite o aumento da frequência e intensidade das partículas do meio, causando a colisão entre elas. Este processo é então captado pela orelha externa, sendo conduzida para a orelha interna através da orelha média, onde ocorre a tradução do estímulo mecânico em sinal elétrico (mecanotransdução) (DROR; AVRAHAM, 2010; MEDEIROS, 2002).

1.1.3. Fisiologia da audição

O sistema auditivo tem função de coletar as ondas sonoras presentes no ambiente e conduzi-las para a orelha interna, onde serão decodificadas em impulsos elétricos. Estes impulsos são enviados ao cérebro através de neurônios aferentes, permitindo então a compreensão do som ambiente (DROR; AVRAHAM, 2010; MEDEIROS, 2002).

As ondas sonoras são conduzidas por meio do meato acústico externo da orelha externa para a orelha média, mais precisamente para a membrana timpânica. Esta, por sua vez, sofre o processo de compressão e rarefação, vibrando conforme o estímulo recebido. Os três ossículos, conectados em uma extremidade na membrana timpânica e a outra na janela oval da cóclea, realizam a transferência das vibrações em um movimento similar a de um pistão. O estribo, conectado com a janela oval da cóclea, então transfere as vibrações pelo meio líquido (perilínfa), que percorre toda escala vestibular até a perilínfa da escala timpânica. Ao percorrer todo o trajeto até a janela redonda, a movimentação da perilínfa estimula a movimentação da membrana basilar, onde encontra-se o órgão de Corti. Este estímulo permite que as CCE e CCI

entrem em contato com a membrana tectorial, ativando a amplificação das ondas sonoras pelas CCE. Esta amplificação de sinal permite maior contato entre a membrana tectorial e o feixe ciliado das CCI, que sofrem a despolarização/hiperpolarização celular. Este fenômeno, causado pela deflexão dos estereocílios das CCI, permite a entrada de potássio e cálcio endolinfático no meio intracelular, estimulando a liberação de neurotransmissores que são convertidas em impulsos elétricos (figura 5). Estes impulsos são encaminhados para o córtex auditivo, no lobo temporal, através do VIII par de nervo, onde ocorrerá a percepção e compreensão do som em tempo real (DROR; AVRAHAM, 2009, 2010; PETIT, 1996; RICHARDSON; DE MONVEL; PETIT, 2011).

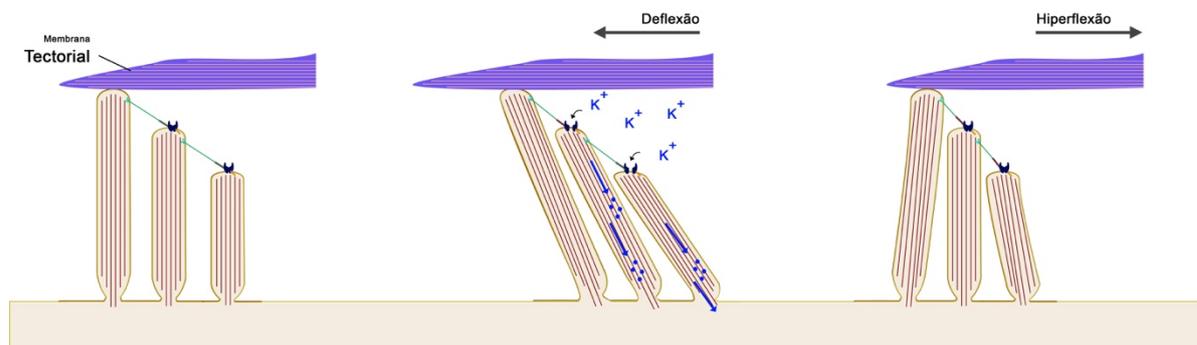


Figura 5. Representação do fenômeno de mecanotransdução nas Células Ciliadas Internas (Elaborado pelo autor).

1.2. Perda auditiva

O termo perda auditiva refere-se à perda completa ou parcial da audição, afetando uma ou ambas orelhas. Dentre esta classificação, indivíduos com certa dificuldade na audição apresentam perda auditiva leve a severa, podendo obter melhora da audição com o uso de aparelhos auditivos ou implante coclear. Já o termo surdez é empregado para indivíduos com perda auditiva profunda, ou seja, sem condições de desenvolver a linguagem falada, realizando a mesma pela linguagem de sinas (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2017). Para evitar complicações no entendimento, para toda esta tese o termo a ser empregado será perda auditiva, uma vez que esta representa qualquer nível de perda.

A perda auditiva é o déficit sensorial mais frequente nos humanos, restringindo assim a comunicação falada do indivíduo afetado. Esta restrição acaba

por afetar não apenas a comunicação, mas também o desenvolvimento cognitivo e psicológico devido a interferência na vida social e econômica dos indivíduos afetados, assim como suas famílias. Em crianças afetadas, a perda auditiva pode causar o retardo no desenvolvimento cognitivo e linguístico, atrapalhando no desempenho da aprendizagem. Já em adultos, a perda auditiva pode acarretar em barreiras na obtenção e manutenção da sua vida profissional, além de restringir o seu campo de atuação. Além destes pontos, indivíduos com perda auditiva optam por se isolar em grupo de indivíduos com as mesmas características, ou seja, outros indivíduos com algum tipo de perda auditiva, onde acabam por não se sentirem excluídos ou subvalorizados (DROR; AVRAHAM, 2009; TOMBLIN et al., 2014; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2017).

De acordo com o levantamento realizado pela Organização Mundial da Saúde (OMS) em 2012, 15% da população mundial adulta apresenta algum tipo de perda auditiva e aproximadamente 5% da população mundial apresenta algum tipo de perda auditiva superior a 41 dBs na melhor orelha em adultos e superior a 31 dBs em crianças. Destes 360 milhões de indivíduos afetados, 328 milhões são adultos (183 milhões do sexo masculino e 145 milhões do sexo feminino) e 32 milhões crianças, sendo que a maioria destes casos ocorrem em países em desenvolvimento e subdesenvolvidos (Gráfico 1). Aproximadamente um terço de indivíduos acima de 65 anos de idade apresentam perda auditiva superior a 41 dBs na melhor orelha (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2017). Preocupantemente, devido ao envelhecimento da população, estima-se que em 2020 o número de indivíduos com mais de 60 anos afetados por algum tipo de perda auditiva seja superior a um bilhão de indivíduos (VAN EYKEN; VAN CAMP; VAN LAER, 2007).

Uma a cada mil crianças apresenta perda auditiva severa desde o nascimento ou durante o início da sua infância, antes de adquirir alguma linguagem falada. Em casos mais graves, de 0,8 a 1 de mil recém-nascidos apresentam perda auditiva profunda. Nos casos pós-linguais, um a cada mil indivíduos torna-se completamente surdo antes da vida adulta. Entre os 30 e 50 anos de idade, 0,3% dos indivíduos apresentam perda auditiva superior a 65 dBs. Já entre 60 e 70 anos de idade este número sobe para 2,3% (NANCE, 2003; PETIT, 1996).

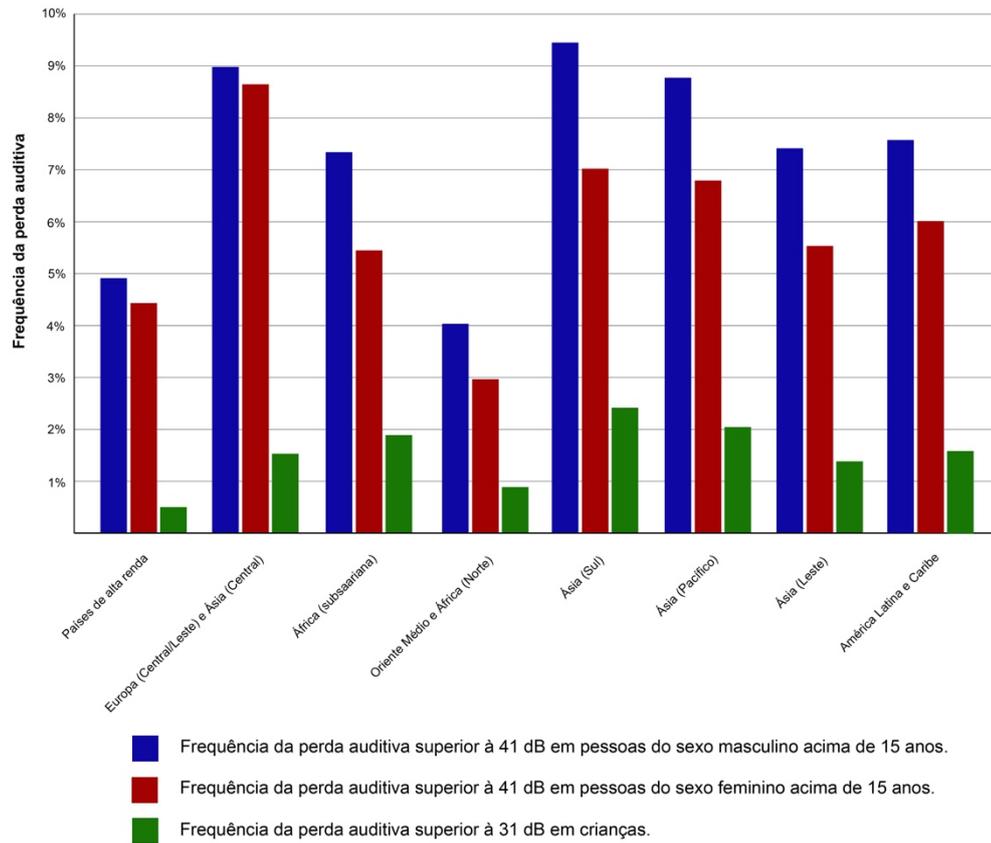


Gráfico 1. Frequência de indivíduos afetados com perda auditiva de acordo com dados da OMS (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2017).

Na Inglaterra, a perda auditiva bilateral acima de 40 dBs durante a infância afeta cerca de 1,33 a cada 1000 recém-nascidos. Nos Estados Unidos da América, indivíduos com perda auditiva acima de 35 dBs, sendo 30-40% dos casos ocorrendo em apenas uma orelha (unilateral), representam 1,86 a cada 1000 recém-nascidos. Estas frequências continuam a aumentar durante a infância, atingindo 2,7 a cada 1.000 crianças antes dos cinco anos de idade e 3,5 a cada 1000 durante a adolescência. Estima-se também que, para cada 10 recém-nascidos com perda auditiva, outras cinco a 10 crianças terão perdas auditivas similares até os nove anos de idade (FORTNUM et al., 2001; KENNEDY; MCCANN, 2004; NAARDEN; DECOUFLE; CALDWELL, 1999; NANCE; LIM; DODSON, 2006).

No último Censo realizado pelo Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, em 2012, cerca de 5,1% da população brasileira apresentava perda auditiva (1,12% com perda auditiva severa), o que representa, aproximadamente, dez milhões de indivíduos (SNPD, 2012).

1.2.1. Classificação das perdas auditivas

A perda auditiva pode ser classificada de diversas formas, variando desde a região da orelha afetada até o grau de perda. De acordo com a região afetada, ela pode ser classificada em: condutiva, neurossensorial ou mista. Nos referimos à perda auditiva condutiva quando há problemas na condução das ondas sonoras até a orelha interna. A obstrução do meato acústico externo, assim como a sua má-formação, e o rompimento da membrana timpânica por algum objeto são típicos exemplos de perda auditiva condutiva. A perda auditiva neurossensorial está relacionada à problemas na orelha interna e na geração de impulsos elétricos pelo órgão de Corti, assim como problemas relacionados a porção neurológica da audição, impossibilitando o envio dos sinais mecanotraduzidos para o cérebro. Ao tratarmos de perda auditiva mista, nos referimos à presença tanto de problemas condutivos quanto neurossensoriais citados acima (HILGERT; SMITH; VAN CAMP, 2009; KOCHHAR; HILDEBRAND; SMITH, 2007; WILLEMS, 2004).

A perda auditiva pode ser considerada uni ou bilateral (simétrica ou assimétrica), quando ocorre em apenas uma orelha ou em ambas, respectivamente. Além disso, pode ser considerada pré-lingual (ocorrendo antes da aquisição de uma linguagem falada) ou pós-lingual (ocorrendo tardiamente, após o desenvolvimento de uma linguagem falada) (ANGELI; LIN; LIU, 2012; DROR; AVRAHAM, 2010; HILGERT; SMITH; VAN CAMP, 2009; KOCHHAR; HILDEBRAND; SMITH, 2007).

Ao tratarmos do grau de perda auditiva, nos referimos à perda em decibel (dB) de acordo com a frequência observada em Hertz (Hz) (tabela 1) (SILMAN; SILVERMAN, 1997).

Tabela 1. Classificação do grau de perda auditiva de acordo com Silman & Silverman (1997).

Média tonal	Denominação	Habilidade para ouvir e falar
≤ 25 dB	Audição normal	Sem dificuldades.
26-40 dB	Perda auditiva de grau leve	Problemas na identificação de sons fracos e distantes.
41-55 dB	Perda auditiva de grau moderado	Dificuldades em compreender uma conversação.
56-70 dB	Perda auditiva de grau moderadamente severo	A fala deve ser forte. Apresenta dificuldades para conversações em grupo.

71-90 dB	Perda auditiva de grau severo	Compreende apenas fala gritada ou amplificada.
≥ 91 dB	Perda auditiva de grau profundo	Pode não compreender fala gritada. Depende de leitura labial.

Além das classificações acima, a perda auditiva pode ser congênita ou adquirida. Dentre os principais fatores congênitos está a hereditariedade, responsável por mais da metade dos casos. Já nos casos adquiridos estão as lesões causadas ao longo da vida de um indivíduo (HILGERT; SMITH; VAN CAMP, 2009).

1.2.2. Etiologia da perda auditiva

A perda auditiva é causada por diversos fatores, tanto genéticos quanto ambientais (tabela 2). Destes casos, aproximadamente 40-50% são atribuídos a fatores ambientais, tais como: exposição frequente a sons de alta intensidade, trauma acústico, infecções virais e uso de drogas ototóxicas. Dentre os fatores genéticos (50-60% dos casos), estão as mutações em diferentes genes ou elementos regulatórios envolvidos no desenvolvimento adequado da estrutura e função da orelha. Mesmo assim, o limite entre fatores genéticos e ambientais nem sempre é claro. Outro fator importante é a esperada queda na proporção de fatores ambientais como causadores da perda auditiva devido à melhora nos sistemas de saúde, além do melhor entendimento dos mecanismos genéticos relacionados a perda auditiva (DROR; AVRAHAM 2009; RAVIV; DROR; AVRAHAM, 2010; ANGELI et al. 2012).

Tabela 2. Principais causas de perda auditiva.

Causas de perda auditiva		
Ambiental (Congênito ou adquirido)	Pré-Natal	Infecções congênitas (rubéola, citomegalovírus, toxoplasmose, sífilis, herpes)
		Utilização de drogas ototóxicas
		Irradiação durante a gestação
	Perinatal	Icterícia grave
		Trauma de parto
		Anóxia
	Pós-Natal	Otites
		Meningite
		Sarampo
		Caxumba

		Traumatismos
		Exposição frequente a sons de alta intensidade
Genética (Congênito)	Síndrômico	Autossômico dominante
		Autossômico recessivo
		Ligada ao X
		Mitocondrial
	Não-Síndrômico	Autossômico dominante
		Autossômico recessivo
		Ligada ao X
		Mitocondrial

(BITNER-GLINDZICZ, 2002; MARTINS et al., 2013).

1.2.2.1. Perda auditiva de origem genética

Os casos de perda auditiva congênita podem ser divididos em genéticos, adquiridos e de etiologia desconhecida, sendo as frações 60%, 30% e 10%, respectivamente (BITNER-GLINDZICZ, 2002). Estudos epidemiológicos em países desenvolvidos sugerem que aproximadamente 50% dos casos de perda auditiva na infância são associados com causas genéticas, sendo 2/3 dos casos pré-linguais (MORTON, 1991; VAN LAER et al., 2003). No Brasil, em um estudo realizado por Simões & Maciel-Guerra (1992), aproximadamente 66,67% das perdas auditivas tinham como etiologia principal os fatores ambientais (sendo a rubéola congênita e a anóxia neonatal responsáveis por 1/3 das etiologias), sendo outros 18,52% de etiologia desconhecida e 14,81% de herança genética (SIMÕES; MACIEL-GUERRA, 1992). Porém, acredita-se que estes valores podem estar mais próximos dos estudos epidemiológicos dos países desenvolvidos devido à melhora no sistema público de saúde e o estudo genético mais aprofundado na população (GODINHO; KEOGH; EAVEY, 2003; PUPO et al., 2008; RUSSO, 2000).

A maioria dos casos de perda auditiva congênita relacionados às causas genéticas correspondem ao padrão mendeliano de herança (HILGERT; SMITH; VAN CAMP, 2009; MORTON, 1991; RAVIV; DROR; AVRAHAM, 2010). Destes, aproximadamente 70% dos casos ocorrem de forma isolada, sendo este o único sintoma observado no indivíduo afetado, classificado como perda auditiva não-sindrômica (*NSHL*, do inglês *Non-Syndromic Hearing Loss*). Os 30% restantes representam as perdas auditivas síndrômicas (*SHL*, do inglês *Syndromic Hearing Loss*), no qual os indivíduos afetados apresentam outras manifestações clínicas além

da perda auditiva, tais como más-formações, problemas de visão, problemas renais, entre outros (BITNER-GLINDZICZ, 2002; RAVIV; DROR; AVRAHAM, 2010).

Distribuídos em mais de 170 *loci*, atualmente há o conhecimento de mais de 100 genes relacionados à perda auditiva, tanto síndrômica quanto não-síndrômica. Porém, estima-se que este número possa chegar a 300 genes, equivalente a 1% de todos os genes do genoma humano (NANCE, 2003; VAN CAMP; SMITH, 2017).

As perdas auditivas genéticas são subdivididas, de uma forma geral, de acordo com seu padrão de herança, sendo estes: autossômico dominante (10-15%), autossômico recessivo (75-80%), ligado ao sexo (menor que 1%) e mitocondrial (menor de 1%) (BITNER-GLINDZICZ, 2002; CRYNS et al., 2004; MORTON, 1991).

1.2.2.1.1. Perda auditiva síndrômica (*SHL*)

As perdas auditivas síndrômicas representam aproximadamente 30% das perdas auditivas de origem genética. Os principais genes associados às síndromes geralmente estão relacionados à codificação de enzimas, fatores de transcrição, componentes da matriz extracelular e do citoesqueleto, importantes para o desenvolvimento do embrião (BITNER-GLINDZICZ, 2002; PETIT, 1996).

Importante ressaltar que algumas síndromes apresentam ampla heterogeneidade clínica, podendo variar de acordo com a mutação existente (ANGELI; LIN; LIU, 2012).

A síndrome mais prevalente envolvendo perda auditiva é denominada síndrome de *Pendred* (perda auditiva neurosensorial, bócio e aqueduto vestibular alargado), porém mais de 400 síndromes já foram relatadas, tendo a perda auditiva como uma das manifestações clínicas. As principais síndromes estão descritas na tabela 3 (SMITH; JR; WHITE, 2005; TORIELLO; SMITH, 2004).

Tabela 3. Principais síndromes que apresentam perda auditiva como manifestação clínica.

Síndrome	OMIM	Lócus	Genes	Posição genômica	Referência
Alport	301050	-	<i>COL4A5</i>	Xq22	(BARKER et al., 1990)
	203780	-	<i>COL4A3</i> <i>COL4A4</i>	2q36-q37	(MOCHIZUKI et al., 1994)
	113650	BOR1	<i>EYA1</i>	8q13.3	(ABDELHAK et al., 1997)

Branchio-Oto-Renal	610896	BOR2	<i>SIX5</i>	19q13.3	(HOSKINS et al., 2007)
	-	-	Desconhecido	1q31	(KUMAR et al., 2000)
	608389	BOS3	<i>SIX1</i>	14q21.3-q.24.3	(RUF et al., 2003) (RUF et al., 2004)
Jervell & Lange-Nielsen	192500	JLNS1	<i>KCNQ1</i>	11p15.5	(NEYROUD et al., 1997)
	176261	JLNS2	<i>KCNE1</i>	21q22.1-q.22.2	(TYSON et al., 1997) (SCHULZE-BAHR et al., 1997)
CHARGE	214800	-	<i>SEMA3E</i>	7q21.11	(LALANI et al., 2004)
		-	<i>CHD7</i>	19q13.3	(VISSERS et al., 2004)
Norrie	310600	NDP	<i>NDP</i>	Xp11.3	(CHEN et al., 1992) (BERGER et al., 1992)
Pendred	274600	PDS	<i>SLC26A4</i>	7q21-q34	(EVERETT et al., 1997)
			<i>FOXI1</i>	5q35.1	(YANG et al., 2007)
	-		<i>KCNJ10</i>	1q23.2	(YANG et al., 2009)
Stickler	108300	STL1	<i>COL2A1</i>	12q13.11-q13.2	(AHMAD et al., 1991)
	604841	STL2	<i>COL11A1</i>	1p21	(RICHARDS et al., 1996)
	184840	STL3	<i>COL11A2</i>	6p21.3	(VIKKULA et al., 1995)
	-	-	<i>COL9A1</i>	6q13	(VAN CAMP et al., 2006)
	-	-	<i>COL9A2</i>	1p34.2	(BAKER et al., 2011)
Treacher Collins	154500	TCOF1	<i>TCOF1</i>	5q32-q33.1	(DIXON et al., 1996)
	613717	POLR1D	<i>POLR1D</i>	13q12.2	(DAUWERSE et al., 2011)
	248390	POLR1C	<i>POLR1C</i>	6p21.1	(DAUWERSE et al., 2011)
Perrault	233400	-	<i>HSD17B4</i>	5q23.1	(PIERCE et al., 2010)
		-	<i>HARS2</i>	5q31.3	(PIERCE et al., 2011)
	614926	DFNB81	<i>CLPP</i>	19p13.3	(JENKINSON et al., 2013)
		-	<i>LARS2</i>	3p21.31	(PIERCE et al., 2013)
Waardenburg	193500	WS1	<i>PAX3</i>	2q35	(TASSABEHJI et al., 1992)
	193510	WS2A	<i>MITF</i>	3p14.1-p13.3	(TASSABEHJI; NEWTON; READ, 1994)
	600193	WS2B	Desconhecido	1p21-p13.3	(WELL et al., 1995)
	606662	WS2C	Desconhecido	8p23	(SELICORNI et al., 2002)
	608890	WS2D	<i>SNAI2</i>	8q11	(SANCHEZ-MARTIN et al., 2002)
	148820	WS3	<i>PAX3</i>	2q35	(HOTH et al., 1993)
	131244	WS4	<i>EDNRB</i>	13q22	(ATTIÉ et al., 1995)
	131242	WS4	<i>EDN3</i>	20q13.2-q13.3	(EDERY et al., 1996)
	602229	WS4	<i>SOX10</i>	22q13	(PINGAULT et al., 1998)
Usher	276900	USH1A	-	14q32	(KAPLAN et al., 1992) (GERBER et al., 2006)
	276903	USH1B	<i>MYO7A</i>	11q13.5	(WELL et al., 1995)
	276904	USH1C	<i>USH1C</i>	11p15.1	(SMITH et al., 1992) (VERPY et al., 2000) (BITNER-GLINDZICZ et al.,
					(WAYNE et al., 1996) (BORK et al., 2001) (BOLZ et al., 2001)
	601067	USH1D	<i>CDH23</i>	10q22.1	(WAYNE et al., 1996) (BORK et al., 2001) (BOLZ et al., 2001)
	602097	USH1E	Desconhecido	21q21	(CHÄÏB et al., 1997)

602083	USH1F	<i>PCDH15</i>	10q21-22	(AHMED et al., 2001) (ALAGRAMAM et al., 2001)
606943	USH1G	<i>SANS</i>	17q24-25	(WEIL et al., 2003) (MUSTAPHA et al., 2002)
612632	USH1H	Desconhecido	15q22-23	(AHMED et al., 2009)
614869	USH1J	<i>CIB2</i>	15q23-q25.1	(RIAZUDDIN et al., 2012)
614990	USH1K	Desconhecido	10p11.21- q21.1	(JAWOREK et al., 2012)
276901	USH2A	<i>USH2A</i>	1q41	(KIMBERLING et al., 1990) (EUDY et al., 1998)
-	USH2B	Desconhecido	3p23-24.2	(HMANI et al., 1999)
605472	USH2C	<i>VLGR1</i>	5q14.3-q21.3	(PIEKE-DAHL et al., 2000) (WESTON et al., 2004)
611383	USH2D	<i>WHRN</i>	9q32	(EBERMANN et al., 2007)
276902 606397	USH3	<i>CLRN1</i>	3q21-q25	(SANKILA et al., 1995) (JOENSUU et al., 2001)
614504	USH3B	<i>HARS</i>	5q31.3	(PUFFENBERGER et al., 2012)
-	-	<i>PDZD7</i>	10q24.31	(EBERMANN et al., 2010)

(Modificado de VAN CAMP; SMITH, 2017).

Mutações no DNA mitocondrial também são responsáveis por quadros sindrômicos de perda auditiva (tabela 4), embora o número de genes seja inferior quando comparado aos casos autossômicos.

Tabela 4. Loci e genes relacionados à perda auditiva sindrômica mitocondrial.

Gene	OMIM	Mutação	Fenótipo	Referência
MTTL1	540000	m.3243A>G	MELAS	(GOTO; NONAKA; HORAI, 1990)
	590050		Diabetes/Perda auditiva (MIDD)	(VAN DEN OUWELAND et al., 1992)
MTTK	545000	m.8344A>G	Epilepsia mioclônica com fibras rotas vermelhas (MERRF)	(SHOFFNER et al., 1990)
		m.8356T>C		(ZEVIANI et al., 1993)
	590060	m.8296A>G	Diabetes/Surdez (MIDD)	(KAMEOKA et al., 1998)
MTTS1	590080	m.7512T>C	Epilepsia mioclônica progressiva, ataxia e perda auditiva	(JAKSCH et al., 1998A)
MTTE	590025	m.14709T>C	Diabetes/Surdez (MIDD)	(HAO et al., 1995)

(Modificado de VAN CAMP; SMITH, 2017).

1.2.2.1.2. Perda auditiva não-sindrômica (*NSHL*)

As perdas auditivas não-sindrômicas correspondem a 70% dos casos relacionados à genética. Estima-se que o principal padrão de herança seja

autossômico recessivo, contando com 80% dos casos, seguidos da herança autossômica dominante, responsável por aproximadamente 20% dos casos. A herança ligada ao cromossomo X e DNA mitocondrial correspondem a 1-2% dos casos não-sindrômicos de perda auditiva (BITNER-GLINDZICZ, 2002; GODINHO; KEOGH; EAVEY, 2003; HILGERT; SMITH; VAN CAMP, 2009; VAN LAER et al., 2003).

Quase 100 genes descritos em mais de 110 *loci* estão associados à perda auditiva não-sindrômica, tornando-a geneticamente heterogênea. O gene *GJB2*, codificador da proteína Conexina 26, merece destaque por estar associado a mais de 50% dos casos genéticos de perda auditiva em países europeus e EUA, sendo também responsável por 20% dos casos pré-linguais de perda auditiva em países desenvolvidos. Em países latino-americanos, asiáticos e africanos, esta frequência não obedece ao mesmo padrão, uma vez que a maioria dos casos de perda auditiva se dão por fatores ambientais. Porém, com novos levantamentos epidemiológicos, tais países podem apresentar uma similaridade na frequência dos casos envolvendo o gene *GJB2* (RAVIV; DROR; AVRAHAM, 2010; SMITH; JR; WHITE, 2005; VAN CAMP; SMITH, 2017).

Para melhor classificar os casos não-sindrômicos de perda auditiva, foram adotadas siglas para representar cada locus e gene. Utiliza-se o radical *DFN*, do inglês *deafness*, seguido do sufixo "A", "B" ou "X" para indicar os casos de herança autossômica dominante, recessiva e ligado ao cromossomo X, respectivamente. Todos os loci são acompanhados de uma numeração crescente, de acordo com a ordem de descoberta do locus. Além disto, alguns genes podem estar associados tanto ao padrão de herança autossômico dominante, quanto ao recessivo, como é o caso do gene *MYO7A* (DFNA11 e DFNB2), *GJB2* (DFNA3A e DFNB1A), entre outros (KOCHHAR; HILDEBRAND; SMITH, 2007; VAN LAER et al., 2003).

1.2.2.1.2.1. Perda auditiva não-sindrômica autossômica dominante (*DFNA*)

A herança autossômica dominante (*DFNA*) representa, aproximadamente, 20% dos casos de perda auditiva não-sindrômica (CRYNS; VAN CAMP, 2004). Perda auditiva associada a este padrão de herança tem como principal característica a perda auditiva pós-lingual progressiva, tendo início, na maioria dos casos, durante a segunda ou terceira década de vida. Até o presente, foram identificados 36 genes

distribuídos em 37 loci (tabela 5) identificados e relacionados à DFNA (KOCHHAR; HILDEBRAND; SMITH, 2007; MORTON, 1991; VAN CAMP; SMITH, 2017; VAN LAER et al., 2003). O primeiro gene associado à perda auditiva de padrão autossômico dominante foi o *DIAPH1*, presente no cromossomo 5, região q31 (DFNA1). Este locus foi identificado primeiramente em uma ampla família da Costa Rica, na qual os indivíduos apresentavam perda auditiva em baixas frequências iniciada aos dez anos de idades, progredindo para casos bilaterais profundos de perda auditiva. Gene humano homólogo ao gene *diaphanous* em *Drosophila*, pertencente à família das forminhas, este gene está envolvido na organização do citoesqueleto, consequentemente regulando a morfologia das células ciliadas presentes na cóclea (LEON et al., 1992; LYNCH et al., 1997).

Os principais genes associados a DFNA são: *TETCA*, *WFS1*, *KCNQ4*, *COCH* e *GJB2*. Alguns destes genes estão associados tanto ao padrão autossômico dominante quanto recessivo (*TECTA* e *GJB2*), sendo o gene *WFS1* também associado aos casos síndrômicos de perda auditiva autossômica recessiva (Síndrome de Wolfram 1). Embora demais estudos sejam necessários para esclarecer os mecanismos de ação, nenhum destes genes representam um número expressivo de casos de perda auditiva (BESPALOVA et al., 2001; HILGERT; SMITH; VAN CAMP, 2009; SILVA-COSTA et al., 2017; VERHOEVEN et al., 1998; YOUNG et al., 2001).

Tabela 5. Loci e genes relacionados à perda auditiva não-sindrômica autossômica dominante (DFNA).

Locus	Gene	OMIM	Referência
-	<i>CRYM</i>	616357	(ABE et al., 2003)
DFNA1	<i>DIAPH1</i>	124900	(LYNCH et al., 1997)
DFNA2A	<i>KCNQ4</i>	600101	(KUBISCH et al., 1999)
DFNA2B	<i>GJB3</i>	612644	(XIA et al., 1998)
DFNA3A	<i>GJB2</i>	601544	(KELSELL et al., 1997)
DFNA3B	<i>GJB6</i>	612643	(GRIFA et al., 1999)
DFNA4	<i>MYH14</i>	600652	(DONAUDY et al., 2004)
-	<i>CEACAM16</i>	-	(ZHENG et al., 2011)
DFNA5	<i>DFNA5</i>	600994	(VAN LAER et al., 1998)
DFNA6/14/38	<i>WFS1</i>	600695	(BESPALOVA et al., 2001) (YOUNG et al., 2001)
DFNA8/12	<i>TECTA</i>	601543	(VERHOEVEN et al., 1998)
DFNA9	<i>COCH</i>	601369	(ROBERTSON et al., 1998)
DFNA10	<i>EYA4</i>	601316	(WAYNE et al., 2001)

DFNA11	<i>MYO7A</i>	601317	(LIU et al. 1997)
DFNA13	<i>COL11A2</i>	601868	(MCGUIRT et al., 1999)
DFNA15	<i>POU4F3</i>	602459	(VAHAVA et al., 1998)
DFNA17	<i>MYH9</i>	603622	(LALWANI et al., 2000)
DFNA20/26	<i>ACTG1</i>	604717	(ZHU et al., 2003) (VAN WIJK et al., 2003)
DFNA22	<i>MYO6</i>	606346	(MELCHIONDA et al., 2001)
DFNA23	<i>SIX1</i>	605192	(MOSRATI et al., 2011)
DFNA25	<i>SLC17A8</i>	605583	(RUEL et al., 2008)
DFNA28	<i>GRHL2/TFCP2L3</i>	608641	(PETERS et al., 2002)
DFNA36	<i>TMC1</i>	606705	(KURIMA et al., 2002)
DFNA41	<i>P2RX2</i>	608224	(YAN et al., 2013A)
DFNA44	<i>CCDC50</i>	607453	(MODAMIO-HØYBJØR et al., 2007)
DFNA50	<i>MIRN96</i>	613074	(MENCÍA et al., 2009)
DFNA51	<i>TJP2</i>	613558	(WALSH et al., 2010A)
DFNA56	<i>TNC</i>	615629	(ZHAO et al., 2013)
DFNA64	<i>SMAC/DIABLO</i>	614152	(CHENG et al., 2011)
DFNA65	<i>TBC1D24</i>	616044	(AZAIEZ et al., 2014) (ZHANG et al., 2014)
DFNA66	<i>CD164</i>	616969	(NYEGAARD et al., 2015)
DFNA67	<i>OSBPL2</i>	616340	(XING et al., 2015) (THOENES et al., 2015)
DFNA68	<i>HOMER2</i>	616707	(AZAIEZ et al., 2015)
DFNA69	<i>KITLG</i>	616697	(SECO et al., 2015)
DFNA70	<i>MCM2</i>	616968	(GAO et al., 2015)
-	<i>DMXL2</i>	-	(CHEN et al., 2017)

(Modificado de VAN CAMP; SMITH, 2017)

1.2.2.1.2.2. Perda auditiva não-sindrômica autossômica recessiva (*DFNB*)

A herança autossômica recessiva (*DFNB*) representa, aproximadamente, 80% dos casos de perda auditiva não-sindrômica (*CRYNS*; VAN CAMP, 2004). A perda auditiva associada a este padrão de herança tem como principal característica a perda auditiva neurosensorial bilateral severa/profunda congênita (MORTON, 1991; VAN LAER et al., 2003).

O número de genes associados a *DFNB* chega a 66 genes distribuídos em 68 loci numerados crescentemente de acordo com a ordem de descoberta (tabela 6) (VAN CAMP; SMITH, 2017).

Tabela 6. Loci e genes relacionados à perda auditiva não-sindrômica autossômica recessiva (DFNB).

Lócus	Gene	OMIM	Referência
DFNB1A	<i>GJB2</i>	220290	(KELSELL et al., 1997)
DFNB1B	<i>GJB6</i>	220290	(DEL CASTILLO et al., 2002)
DFNB2	<i>MYO7A</i>	600060	(LIU et al. 1997) (WEIL et al., 1997)
DFNB3	<i>MYO15A</i>	600316	(WANG et al., 1998)
DFNB4	<i>SLC26A4</i>	600791	(LI et al., 1998)
DFNB6	<i>TMIE</i>	600971	(NAZ et al., 2002)
DFNB7/11	<i>TMC1</i>	600974	(KURIMA et al., 2002)
DFNB8/10	<i>TMPRSS3</i>	601072	(SCOTT et al., 2001)
DFNB9	<i>OTOF</i>	601071	(YASUNAGA et al., 1999)
DFNB12	<i>CDH23</i>	601386	(BORK et al., 2001)
DFNB15/72/95	<i>GIPC3</i>	601869	(AIN et al., 2007) (CHARIZOPOULOU et al., 2011) (REHMAN et al., 2011)
DFNB16	<i>STRC</i>	603720	(VERPY et al., 2001)
DFNB18A	<i>USH1C</i>	602092	(AHMED et al., 2002) (OUYANG et al., 2002)
DFNB18B	<i>OTOG</i>	614945	(SCHRADERS et al., 2012)
DFNB21	<i>TECTA</i>	603629	(MUSTAPHA et al., 1999)
DFNB22	<i>OTOA</i>	607039	(ZWAENEPOEL et al., 2002)
DFNB23	<i>PCDH15</i>	609533	(AHMED et al., 2003A)
DFNB24	<i>RDX</i>	611022	(KHAN et al., 2007)
DFNB25	<i>GRXCR1</i>	613285	(SCHRADERS et al., 2010A)
DFNB28	<i>TRIOBP</i>	609823	(SHAHIN et al., 2006) (RIAZUDDIN et al., 2006A)
DFNB29	<i>CLDN14</i>	614035	(WILCOX et al., 2001)
DFNB30	<i>MYO3A</i>	607101	(WALSH et al., 2002)
DFNB31	<i>WHRN</i>	607084	(MBURU et al., 2003)
DFNB35	<i>ESRRB</i>	608565	(COLLIN et al., 2008)
DFNB36	<i>ESPN</i>	609006	(NAZ et al., 2004)
DFNB37	<i>MYO6</i>	607821	(AHMED et al., 2003B)
DFNB39	<i>HGF</i>	608265	(SCHULTZ et al., 2009)
DFNB42	<i>ILDR1</i>	609646	(BORCK et al., 2011)
DFNB44	<i>ADCY1</i>	610154	(SANTOS-CORTEZ et al., 2014)
DFNB48	<i>CIB2</i>	609439	(RIAZUDDIN et al., 2012)
DFNB49	<i>MARVELD2</i>	610153	(RIAZUDDIN et al. 2006)
DFNB49	<i>BDP1</i>	610153	(GIROTTO et al., 2013)
DFNB53	<i>COL11A2</i>	609706	(CHEN et al., 2005)
DFNB59	<i>PJVK</i>	610220	(DELMAGHANI et al., 2006)
DFNB60	<i>SLC22A4</i>	-	(BEN SAID et al., 2016)
DFNB61	<i>SLC26A5</i>	613865	(LIU et al., 2003)
DFNB63	<i>LRTOMT/COMT2</i>	611451	(AHMED et al., 2008)

			(DU et al., 2008)
DFNB66	<i>DCDC2</i>	610212	(GRATI et al., 2015)
DFNB66/67	<i>LHFPL5</i>	610265	(TLILI et al., 2005) (SHABBIR et al., 2006) (KALAY et al., 2006)
DFNB68	<i>S1PR2</i>	610419	(SANTOS-CORTEZ et al., 2016)
DFNB70	<i>PNPT1</i>	614934	(VON AMELN et al., 2012)
DFNB73	<i>BSND</i>	606412	(RIAZUDDIN et al., 2009)
DFNB74	<i>MSRB3</i>	613718	(WARYAH et al., 2009) (AHMED et al., 2011)
DFNB76	<i>SYNE4</i>	615540	(HORN et al., 2013)
DFNB77	<i>LOXHD1</i>	613079	(GRILLET et al., 2009)
DFNB79	<i>TPRN</i>	613307	(REHMAN et al., 2010) (LI et al., 2010)
DFNB82	<i>GPSM2</i>	609245	(WALSH et al. 2010)
DFNB84A	<i>PTPRQ</i>	613391	(SCHRADERS et al. 2010)
DFNB84B	<i>OTOGL</i>	614944	(YARIZ et al., 2012)
DFNB86	<i>TBC1D24</i>	614617	(REHMAN et al., 2014)
DFNB88	<i>ELMOD3</i>	615429	(JAWOREK et al., 2013)
DFNB89	<i>KARS</i>	613916	(SANTOS-CORTEZ et al., 2013)
DFNB91	<i>SERPINB6</i>	613453	(SIRMACI et al., 2010)
DFNB93	<i>CABP2</i>	614899	(SCHRAUWEN et al., 2012)
DFNB94	<i>NARS2</i>	612803	(SIMON et al., 2015)
DFNB97	<i>MET</i>	616705	(MUJTABA et al., 2015)
DFNB98	<i>TSPEAR</i>	614861	(DELMAGHANI et al., 2012)
DFNB99	<i>TMEM132E</i>	616178	(LI et al., 2015)
DFNB101	<i>GRXCR2</i>	615837	(IMTIAZ; KOHRMAN; NAZ, 2014)
DFNB102	<i>EPS8</i>	615974	(BEHLOULI et al., 2014)
DFNB103	<i>CLIC5</i>	616042	(SECO et al., 2015)
DFNB104	<i>FAM65B</i>	616515	(DIAZ-HORTA et al., 2014)
DFNB105	<i>CDC14A</i>	616958	(DELMAGHANI et al., 2016)
-	<i>EPS8L2</i>	614988	(DAHMANI et al., 2015)
-	<i>WBP2</i>	606962	(BUNIELLO et al., 2016)
-	<i>ROR1</i>	602336	(DIAZ-HORTA et al., 2016)

(Modificado de VAN CAMP; SMITH, 2017)

O primeiro locus associado à herança autossômica recessiva, DFNB1A, foi identificado em 1997, contendo o gene *GJB2*. Pertencente à família das Conexinas, este gene encontra-se no cromossomo 13q11, codificando a proteína Conexina 26. Este trabalho identificou a mutação p.Trp77* em homozigose em dois indivíduos paquistaneses. Outra mutação, p.Trp24*, também foi identificada em homozigose em outro indivíduo da mesma etnia. Ambas mutações não estiveram presentes em 80

cromossomos analisados. Atualmente, mais de 300 mutações estão associadas a este gene, mas é de notório saber que a principal causa de perda auditiva de origem genética está relacionada à deleção de uma guanina na posição 35 do transcrito (c.35delG). Responsável por mais de 50% dos casos de mutação no gene *GJB2* em caucasianos, esta deleção, em teoria, reduz para 12 aminoácidos a proteína que deveria ter 226 aminoácidos. Estudos funcionais comprovaram que, na prática, esta cadeia polipeptídica acaba por não ser sintetizada. Mutações neste gene estão relacionadas aos problemas na reciclagem de potássio na escala média, através da membrana basilar e estria vascular, processo fisiológico fundamental para a audição (GASPARINI et al., 2000; KELSELL et al., 1997).

Outros genes frequentemente associados à perda auditiva não-sindrômica autossômica recessiva incluem: *SLC26A4*, *MYO15A*, *OTOF*, *CDH23* e *TMC1* (ANGELI; LIN; LIU, 2012; CRYNS; VAN CAMP, 2004; HILGERT; SMITH; VAN CAMP, 2009).

1.2.2.1.2.3. Perda auditiva não-sindrômica ligada ao cromossomo X (*DFNX*)

A perda auditiva não-sindrômica associada ao cromossomo X (*DFNX*) são menos frequentes, representando 1-2% dos casos não-sindrômicos de perda auditiva, e estando relacionada, na maioria dos casos, ao fenótipo progressivo, pré ou pós-lingual, misto ou neurossensorial (RAVIV; DROR; AVRAHAM, 2010).

O primeiro gene associado a este padrão de herança foi identificado em 1995, no locus previamente denominado *DFN3* (reclassificado para *DFNX2*), contendo o gene *POU3F4*, presente na posição q21.1 do cromossomo X. Um dos indivíduos estudados apresentava perda auditiva mista progressiva devido à mutação p.Lys334Glu. Outros quatro indivíduos diagnosticados clinicamente com *DFNX2* também apresentaram mutações neste gene, sendo três casos de uma mutação sem sentido (p.Leu298*, p.Asp215* e p.Lys202*) e uma de sentido trocado não sinônima (p.Leu317Trp) (DE KOK et al., 1995).

Até o momento, cinco foram os genes identificados em cinco loci diferentes (tabela 7).

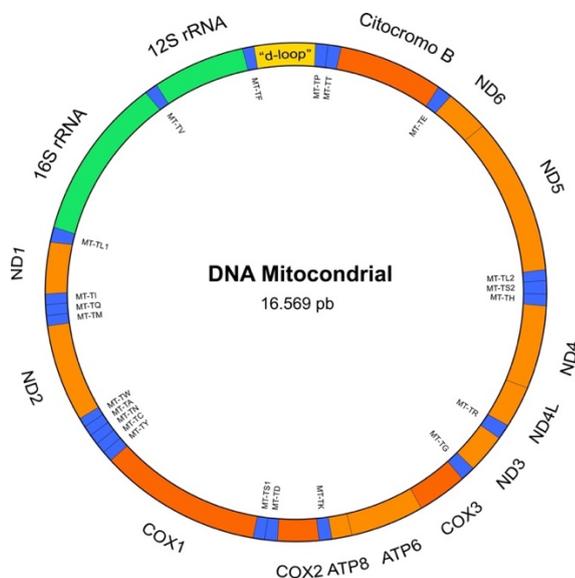
Tabela 7. Loci e genes relacionados à perda auditiva não-sindrômica ligada ao cromossomo X (DFNX).

Lócus	Gene	OMIM	Referência
DFNX1 (DFN2)	<i>PRPS1</i>	304500	(LIU et al., 2010)
DFNX2 (DFN3)	<i>POU3F4</i>	304400	(DE KOK et al., 1995)
DFNX4 (DFN6)	<i>SMPX</i>	300066	(SCHRADERS et al., 2011) (HUEBNER et al., 2011)
DFNX5	<i>AIFM1</i>	300614	(ZONG et al., 2015)
DFNX6	<i>COL4A6</i>	300914	(ROST et al., 2014)

(Modificado de VAN CAMP; SMITH, 2017)

1.2.2.1.2.4. Perda auditiva não-sindrômica mitocondrial

Com estrutura circular e 16.569 pares de base distribuídos em 37 genes (13 genes relacionados ao mRNA, dois ao rRNA e 22 ao tRNA), o DNA mitocondrial (figura 6) está contido dentro da organela denominada mitocôndria. Presente em grande quantidade em todas células dos seres humanos, esta organela apresenta várias funções, sendo a principal delas a transformação dos metabólitos em energia acessível para as células na forma de Trifosfato de Adenosina (*ATP*, do inglês *Adenosine TriPhosphate*). Além disso, ela é responsável pela codificação de componentes do complexo de síntese proteica, além de controlar a apoptose. O DNA mitocondrial (mDNA) possui seu próprio mecanismo de replicação, transcrição e tradução, porém é dependente de interações provenientes do DNA nuclear, sendo assim considerada uma estrutura semiautônoma (GUAN, 2004; LODISH, 2003).

**Figura 6.** Esquematisação do DNA mitocondrial humano (Elaborado pelo autor).

Devido à baixa atividade do sistema de reparo do DNA mitocondrial e à ausência de histonas, além da exposição constante aos radicais livres de oxigênio, mutações nesta molécula circular de DNA são mais comuns quando comparadas ao DNA nuclear. Estima-se que os genomas mitocondriais de dois indivíduos apresentem quatro nucleotídeos de diferença a cada mil pares de base. Além do mais, alterações no DNA mitocondrial não acarretam em problemas estruturais nas células afetadas, mas funcionais, principalmente em tecidos que demanda alta taxa de energia, como é o caso da orelha interna e o processo de mecanotransdução das ondas sonoras em impulsos elétricos (WALLACE, 1992).

Cada mitocôndria apresenta entre 10 e 100 cópias de mDNA. Devido à alta taxa de mutação, uma determinada quantidade de mDNA pode apresentar variações na sequência quando comparada ao mDNA normal. Este quadro é denominado heteroplasmia e pode resultar em patologias dependendo da quantidade de mDNA com a alteração em uma célula e tecido (GUAN, 2004; LODISH, 2003).

Outra exclusividade do mDNA está no fato deste ser transmitido apenas por herança materna, consequência do espermatozoide apenas transferir o material genético nuclear para o óvulo na fecundação (WALLACE, 1992).

Mutações no mDNA relacionados a casos genéticos são raras, representando aproximadamente 1-2% dos casos de perda auditiva não-sindrômica, com prevalência de casos pós-linguais progressivos (ANGELI; LIN; LIU, 2012; BITNER-GLINDZICZ, 2002).

A relação do DNA mitocondrial com a perda auditiva foi estabelecida em 1986 em um estudo envolvendo um indivíduo com miopatia mitocondrial e perda auditiva (PETTY; HARDING; MORGAN-HUGHES, 1986). Já o primeiro relato de perda auditiva não-sindrômica relacionada ao DNA mitocondrial envolveu o gene *MTRNR1*. Neste estudo, cinco gerações de uma família Israelense de etnia árabe apresentavam perda auditiva severa com início precoce. Como os indivíduos desta família ou eram normais ou apresentavam perda auditiva severa, sem fenótipo intermediário, uma das primeiras hipóteses criadas foi de herança autossômica recessiva ou mutação em homoplasmia do DNA mitocondrial (todas as moléculas de DNA mitocondrial apresentam a mesma sequência nucleotídica). Após exames bioquímicos e indícios de problemas oriundos da fosforilação da cadeia respiratória, a investigação nesta família voltou-se para uma possível herança relacionada ao DNA mitocondrial. Vinte e uma variantes no genoma mitocondrial foram detectadas em dois

indivíduos desta família apresentando perda auditiva após o uso de aminoglicosídeos. Todas as variantes detectadas nesta família foram triadas em outros casos de perda auditiva induzida pelo uso de aminoglicosídeos. Dentre estas, a mutação m.A1555G foi a única presente em outros três casos familiares de perda auditiva após o tratamento com estreptomicina, um antibiótico de pequeno espectro a base de aminoglicosídeos usado amplamente no tratamento de infecções do trato respiratório. Na análise de frequência, esta variante esteve ausente em 278 indivíduos controles triados. Além do mais, estudos funcionais indicaram que a mutação m.A1555G ocorria em uma região altamente conservada do gene *12S rRNA (MTRNR1)*, região conhecida por interagir com os aminoglicosídeos. Tais dados corroboraram para a confirmação da ototoxicidade dos aminoglicosídeos, assim como permitiram a identificação da primeira mutação causadora de perda auditiva não-sindrômica (PREZANT et al., 1993).

Assim como DFNX, as mutações mitocôndrias associadas à perda auditiva correspondem a uma ínfima porcentagem dos casos. As principais mutações relacionadas até o presente encontram-se na tabela 8.

Tabela 8. Loci e genes relacionados à perda auditiva não-sindrômica mitocondrial.

Gene	OMIM	Mutação	Referência
<i>MTRNR1</i>	561000	m.1555A>G	(PREZANT et al., 1993) (USAMI et al., 1997) (ESTIVILL et al., 1998)
		m.1494C>T	(ZHAO et al., 2004)
		m.T961 (diversas)	(BACINO et al., 1995) (CASANO et al., 1999)
<i>MTTS1</i>	590080	m.7445A>G	(REID; VERNHAM; JACOBS, 1994) (FISCHEL-GHODSIAN et al., 1995)
		m.7472insC	(TIRANTI et al., 1995) (JAKSCH et al., 1998B) (VERHOEVEN et al., 1999)
		m.7510T>C	(HUTCHIN et al., 2000)
		m.7511T>C	(FRIEDMAN et al., 1999) (SUE et al., 1999)

(Modificado de VAN CAMP; SMITH, 2017)

1.3. A orquestra de genes

Como apresentado acima, mais de 100 genes estão relacionados à perda auditiva, envolvidos desde a regulação gênica até a organização celular. Assim sendo, os genes podem ser divididos de acordo com suas características.

1.3.1. Regulação gênica

A regulação da expressão gênica é fundamental para o desenvolvimento correto do embrião, devido ao controle da proliferação celular, diferenciação e morfogênese, fenômeno variável de acordo com o tipo celular e tecido. Um dos principais grupos de proteínas regulatórias envolvem os fatores de transcrição (FT). Estas proteínas têm como principal função a interação com específicas sequências de DNA, regulando assim a transcrição do gene em moléculas de RNA, como o RNA mensageiro (mRNA) e os microRNAs (miRNA), durante a morfogênese e desenvolvimento embrionário. Relacionados à perda auditiva, os principais fatores de transcrição descritos são codificados pelos genes *POU3F4*, *POU4F3*, *EYA4*, *TFCP2L3* e *ESRRB* (DROR; AVRAHAM, 2010).

Tanto o gene *POU3F4* quanto *POU4F3* pertencem à família dos fatores trans-regulatórios com o domínio *POU*, uma região de interação com específicas sequências de DNA. O gene *POU3F4* está associado ao locus *DNFX2*, enquanto mutações no gene *POU4F3* estão associadas à perda auditiva não-sindrômica autossômica dominante progressiva (DFNA15). Em camundongos, mutações no gene *POU4F3* afetam o desenvolvimento do sistema auditivo, uma vez que este gene é altamente expresso no núcleo das células sensoriais do órgão de Corti, sendo indispensáveis também para a maturação e sobrevivência celular (DE KOK et al., 1995; DROR; AVRAHAM, 2010; VAHAVA et al., 1998; WEISS et al., 2003). O fator de transcrição codificado pelo gene *EYA4*, responsável pela DFNA10, é fundamental para a maturação do órgão de Corti (WAYNE et al., 2001). Já o gene *TFCP2L3*, expresso no epitélio sensorial, está associado com casos de presbiacusia (DROR; AVRAHAM, 2010; PETERS et al., 2002). O gene *ESRRB*, codificador do receptor beta relacionado ao estrogênio, está associado ao padrão autossômico recessivo de herança (DFNB35). Este receptor apresenta dois domínios funcionais, um relacionado à interação com o DNA e outro domínio para interação com outro agente ligante,

controlando a expressão de múltiplos canais iônicos essenciais para produção da endolinfa (COLLIN et al., 2008; DROR; AVRAHAM, 2010).

Outro grupo de reguladores da expressão gênica são os miRNAs. Estes atuam de forma diferenciada quando comparados aos fatores de transcrição, uma vez que são reguladores pós-transcricionais. Com, aproximadamente, 23 pb e pertencentes a família dos RNAs não codificantes (*ncRNA*), os miRNAs estão envolvidos com a regulação da expressão em células animais e vegetais. Dentre as funções dos miRNAs está a supressão da tradução do RNA mensageiro pela sua complementariedade com a região 3'UTR (3' *Untranslated Region*) do RNA mensageiro alvo. Este reconhecimento do alvo é feito através da região *seed* do miRNA maduro, e a sua interação entre mRNA e miRNA depende da complementariedade mínima de 6 a 8 pb desta região. Após o pareamento com a região alvo, há o bloqueio e término da tradução, resultando em um peptídeo não funcional e consequente clivagem do mRNA (DROR; AVRAHAM, 2009).

Embora o primeiro miRNA tenha sido descoberto em 1993, esta molécula tornou-se significativa após ser relatada em grandes quantidades de vertebrados e invertebrados. Até o momento, 1.881 precursores de miRNAs e 2.588 miRNAs maduros já foram relatados em humanos, sendo mais de 14 expressos na cóclea e possivelmente relacionados ao processo auditivo (figura 7) (GRIFFITHS-JONES, 2010; USHAKOV; RUDNICKI; AVRAHAM, 2013).

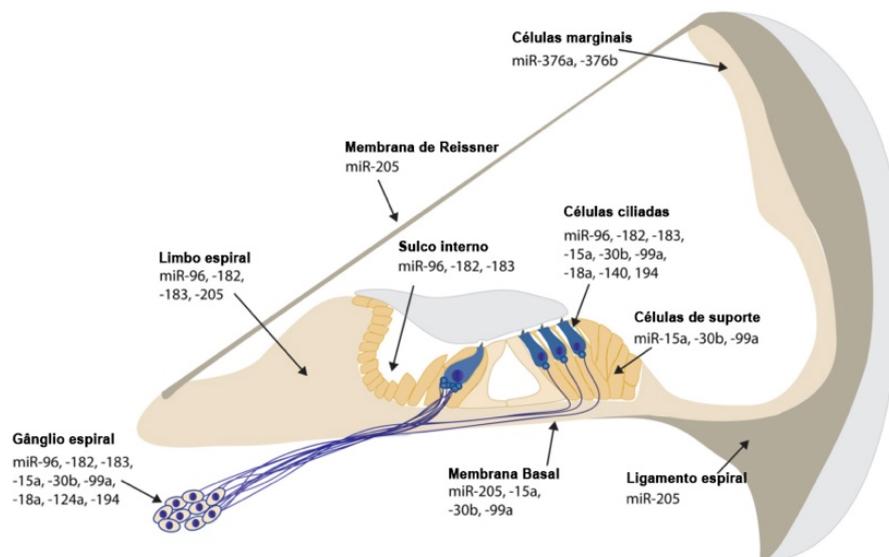


Figura 7. Representação dos principais miRNAs expressos na cóclea (Modificado de USHAKOV; RUDNICKI; AVRAHAM, 2013).

Os genes de miRNA podem estar isolados ou em *clusters*, podendo gerar transcritos policistrônicos. Este é o caso do *cluster miR183/96/182*, presente na região cromossômica 7q32.2 e considerado o principal *cluster* de miRNAs relacionados à perda auditiva. Dos genes desta região, o gene *miR96* foi o primeiro miRNA a ser associado com problemas auditivos. Com apenas um éxon de 78 pb de comprimento, este gene gera um *pri-miRNA*, sendo clivado até originar o *miRNA* maduro de 23 pb, denominado *hsa-mir-96*, ou simplesmente *miR96*. Este gene está presente nas células ciliadas da cóclea e vestíbulo logo após o nascimento, perdurando, sem alterações significativas nos níveis de expressão, até a idade adulta. Este fato sugere que este miRNA está associado à especificação e função das células mecanosensoriais da orelha interna (MENCÍA et al., 2009).

Em 2009, pesquisadores espanhóis relataram duas mutações, c.13G>A e c.14C>A, na conservada região *seed* do gene do *miR96* (OMIM 611606) de indivíduos com perda auditiva não-sindrômica progressiva de herança autossômica dominante (DFNA50). A análise *in silico* do mRNA alvo indicou os genes *AQP5*, *CELSR2*, *MYRIP*, *ODF2*, e *RYK* como os principais candidatos. Embora não tenha ocorrido a comprovação por estudos funcionais, acredita-se que o *hsa-mir-96* esteja afetando mais de um gene da orelha interna, resultando em perda auditiva (MENCÍA et al., 2009).

1.3.2. Comunicação celular

A orelha interna é um labirinto membranoso preenchido por dois tipos de fluídos necessários para o funcionamento correto, tanto do processo auditivo quanto da manutenção do equilíbrio. Por sua vez, a cóclea é composta por três cavidades denominadas escalas, sendo as escalas vestibular e timpânica preenchidas pela perilinfa e a escala média, onde encontra-se o órgão de Corti, pela endolinfa. Estes fluídos variam na sua composição, porém a homeostase iônica de toda orelha interna é fundamental para que haja o processo normal da audição. Este processo de harmonia entre meio extracelular e intracelular, assim como nas células entre si, é garantido por proteínas presentes na membrana plasmática, como as Conexinas (que formam os *Gap Junctions*) e proteínas de transporte (DROR; AVRAHAM, 2009).

As Conexinas (Cx) são proteínas de membrana que realizam a conexão direta entre o citoplasma de duas células adjacentes, permitindo a troca de íons,

moléculas e metabólitos entre as células, objetivando a comunicação intercelular. Dentre as proteínas relacionadas à perda auditiva, as Conexinas tem papel fundamental na audição e apresentam um número significativo de proteínas expressas na orelha interna (DROR; AVRAHAM, 2009).

As Conexinas são subunidades transmembranares. A interação de seis Conexinas forma um hexâmetro denominado *conéxon*, também conhecido como hemicanal. Estes podem ser compostos por Conexinas de apenas um tipo, sendo denominados *conéxons* homoméricos, ou por diferentes tipos de conexinas, sendo chamado de heteromérico. Cada *conéxon* interage com outro *conéxon* de uma célula adjacente, formando assim um canal intercelular ativo denominado *gap junction* ativo, que podem ser heterotípicos, quando formados por *conéxons* heteroméricos ou por dois *conéxons* homoméricos diferentes, ou podem ser homotípicos, quando ambos *conéxons* são idênticos (figura 8) (KUMAR; GILULA, 1996).

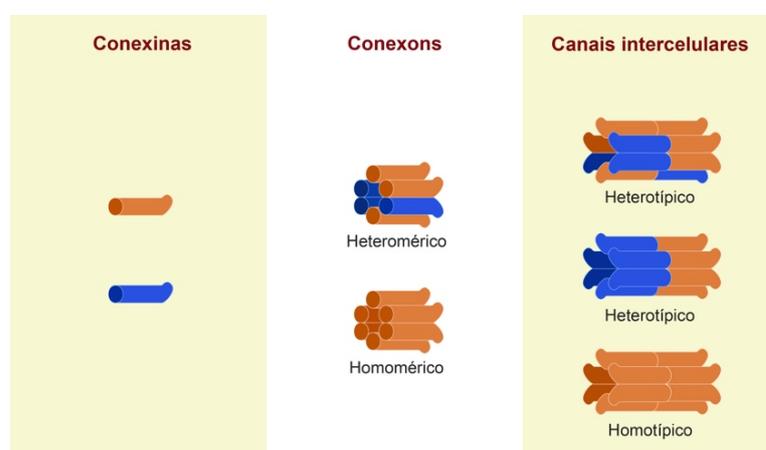


Figura 8. Representação das conexinas, conéxons e canais intercelulares.

O genoma humano apresenta 21 tipos de conexinas conhecidas, sendo cinco delas (Cx26, Cx30, Cx31, Cx32 e Cx43) associadas à perda auditiva em humanos. As duas principais são Cx26 e Cx30, sendo que mutações na primeira são responsáveis pela maioria dos casos de perda auditiva de causa genética não-sindrômica (VAN CAMP; SMITH, 2017).

Com 226 aminoácidos e quatro domínios transmembranares (figura 9A), a Conexina 26 (Cx26) é codificada pelo gene *GJB2* (OMIM 121011), o primeiro gene de perda auditiva não-sindrômica relatado. Posteriormente, este gene foi confirmado como o maior responsável de DFNB, presente em 80% dos casos. Localizado no cromossomo 13, este gene apresenta 6.629 pares de bases com um transcrito

canônico de 2.250 pares de base distribuídos em 2 éxons, sendo apenas o segundo codificante. Este gene é expresso na membrana basal, limbo espiral, ligamento espiral e células de suporte da cóclea (figura 9B) (VAN CAMP; SMITH, 2017).

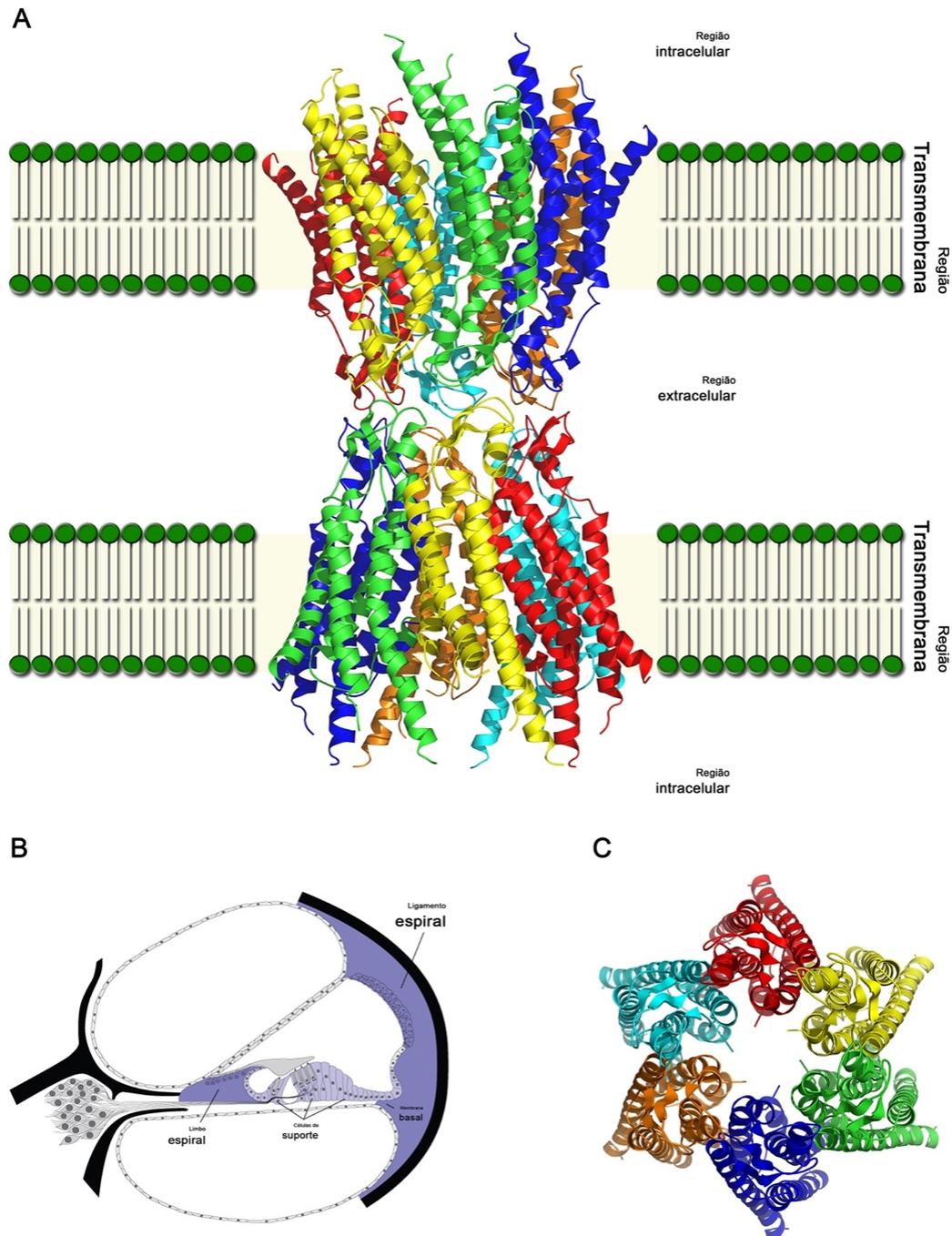


Figura 9. Estrutura e expressão da Connexina 26 na orelha interna. **A:** Representação da interação de dois conéxons de células adjacentes (Elaborado pelo autor); **B:** Regiões no interior da cóclea onde o gene *GJB2* é expresso; **C:** Conéxon homomérico composto de seis conéxinas 26 (Modificado de VAN CAMP; SMITH 2017).

Mais de 300 mutações no gene *GJB2* já foram associadas à perda auditiva (STENSON et al., 2012), estando envolvidas em perdas auditivas com padrão autossômico dominante (DFNA3A), mas principalmente com o padrão autossômico recessivo (DFNB1A), gerando um quadro clínico de perda auditiva pré-lingual, bilateral, simétrica de grau moderado à profundo (CRYNS; VAN CAMP, 2004; STENSON et al., 2012).

A principal mutação deste gene ocorre na posição 35 do transcrito, onde uma deleção de uma guanina (c.35delG) resultando na troca no quadro de leitura dos códons no primeiro domínio intracitoplasmático (IC1) da Cx26. Assim sendo, no códon 12, o aminoácido Glicina é trocado por uma Valina, seguido por um códon prematuro de terminação (*stop codon*), interrompendo a tradução do transcrito. Com esse término inesperado, o peptídeo com apenas 12 aminoácidos formado não é funcional, sendo conseqüentemente degradado. Um estudo envolvendo 3.270 controles aleatórios de 17 países europeus identificou a prevalência da deleção em um a cada 35 indivíduos da região sul da Europa e um a cada 79 da região central e norte da Europa. Com uma frequência de um a cada 51 europeus, a c.35delG tornou-se a principal mutação causadora de DFNB em caucasianos. Devido a sua alta frequência, a primeira hipótese levantada seria da região genômica se tratar de um *hot spot*, porém estudos mais aprofundados indicaram que a frequência desta deleção ocorria devido ao efeito fundador proveniente de algum local da Europa ou Oriente Médio. Interessantemente, a frequência de portadores da c.35delG na população do Oriente Médio é maior que a mutação $\Delta F508$ no gene *CFTR*, causador da fibrose cística nesta mesma população (GASPARINI et al., 2000).

Na população brasileira, a mutação c.35delG também está presente com alta frequência. Em um estudo com 645 indivíduos não aparentados e afetados com perda auditiva neurosensorial não-sindrômica, 42 apresentaram a mutação c.35delG em homozigose, 36 eram portadores para esta deleção, cinco eram indivíduos heterozigoto composto para outra mutação no mesmo gene e sete apresentavam a c.35delG em heterozigose e uma das deleções do gene *GJB6* (herança digênica). A mutação mitocondrial m.A1555G foi detectada em três indivíduos analisados. De 1290 alelos estudados, um total de 127 alelos apresentavam a principal deleção do gene *GJB2* em caucasianos, representando quase 10% dos indivíduos analisados (DE OLIVEIRA et al., 2007).

Embora presente em cinco de 376 judeus de diferentes países, nenhum judeu asquenaze apresentou a deleção (GASPARINI et al., 2000). Este fato não é de surpreender, uma vez que as mutações, assim como suas frequências podem variar de acordo com as etnias. Por exemplo, a principal mutação do gene *GJB2* em judeus asquenazes é a c.167delT, enquanto que entre os japoneses, a mais frequente é c.235delC (ABE et al., 2000; MORELL et al., 1998).

A segunda conexina mais relevante associada à perda auditiva é a Cx30. Codificada pelo *GJB6* (OMIM 604418), gene com 11.625 pares de base e transcrito canônico de 1.808 pares de base distribuídos em três éxons, apresenta proteína de 261 aminoácidos. Este gene está localizado a apenas 35 kb do gene *GJB2* (DEL CASTILLO et al., 2002).

Estima-se que 10-42% dos indivíduos com mutações no gene *GJB2* apresentam a alteração em heterozigose, ou seja, em apenas um dos alelos. Isso levou pesquisadores espanhóis às buscas mais profundas no mesmo locus do gene *GJB2* em 33 indivíduos heterozigotos. Uma grande deleção, de aproximadamente 342 kb (posteriormente corrigida para 309 kb), foi identificada no gene *GJB6* (OMIM 604418), recebendo o nome de *del(GJB6-D13S1830)*. Dos 33 indivíduos heterozigotos para mutações no gene *GJB2*, 22 apresentaram a deleção também em heterozigose no gene *GJB6*, além de dois indivíduos apresentarem a deleção em homozigose. Esta deleção foi classificada como a segunda principal causa de perda auditiva pré-lingual na população espanhola, tendo como hipótese que este locus, contendo ambos genes, poderia causar perda auditiva devido alterações em apenas um dos genes (monogênico) ou em ambos genes (digênico) (DEL CASTILLO et al., 2002). Este mesmo grupo identificou anos mais tarde, outra grande deleção em *trans* no gene *GJB6*. Esta, de 232 kb de tamanho, recebeu o nome de *del(GJB6-D13S1854)*. De 47 indivíduos heterozigotos para mutações no gene *GJB2*, 12 apresentaram esta deleção em *trans*, totalizando 25.5% dos casos. Com ambas deleções, sendo a primeira mais frequente, os pesquisadores não conseguiram identificar se causa da perda auditiva nestes casos seria a deleção de alguma região regulatória do gene *GJB2*, inativando assim ambos alelos (herança monogênica), ou se tanto a mutação em heterozigose no gene *GJB2* quanto a deleção no *GJB6*, estariam tendo efeitos aditivos e causando a perda auditiva (herança digênica) (DEL CASTILLO et al., 2005).

Outras duas deleções foram relatadas envolvendo o gene *GJB6* ou sua região regulatória. No terceiro caso, um indivíduo de cinco anos de idade proveniente da França e homocigoto para a mutação p.Val84Met apresentou uma deleção com mais de 920 kb, deletando não apenas o gene *GJB6*, mas outros sete genes, incluindo o *GJB2* e *GJA3* (FELDMANN et al., 2009). A quarta deleção foi relatada em 2010, originária da Alemanha e datando mais de 300 anos de origem. Ela compreendia a região *del*(chr13:19.837,344-19.968,698), com aproximadamente, 131.4 kb de comprimento, não deletando nem o gene *GJB2* nem o *GJB6*, mas a região *upstream* do gene *GJB6*. Neste estudo, 27 indivíduos apresentaram esta deleção em apenas um dos alelos, sendo que outros quatro indivíduos apresentaram esta deleção e a c.35delG (gene *GJB2*) ambas em heterozigose, segregando com o fenótipo de perda auditiva. Este foi o primeiro caso de deleção e cis-regulação do gene *GJB6* (WILCH et al., 2010).

A representação gráfica das quatro deleções encontra-se na figura 10.

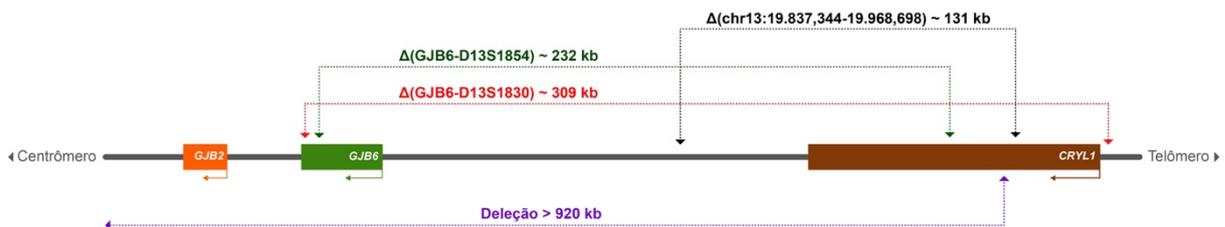


Figura 10. Representação gráfica das quatro grandes deleções envolvendo o gene *GJB6* e possível região regulatória (Elaborado pelo autor).

Outro principal gene envolvido com o transporte de íons entre células e matriz extracelular é o *SLC26A4* (OMIM 605646). Este gene, com 21 éxons, apresenta o transcrito canônico de 4930 pb, traduzido na proteína transportadora de cloreto-iodeto denominada Pendrina, de 780 aminoácidos. Expressa a partir do 13º dia embrionário no saco e ducto endolinfático, assim como nas células não sensoriais do utrículo, sáculo e cóclea, apresenta importante função na composição iônica da endolinfa. Mutações neste gene representam de 5 a 10% dos casos pré-linguais de perda auditiva e já foram associadas aos pacientes com síndrome de Pendred (OMIM 274600), a principal causa sindrômica de perda auditiva, e em pacientes com perda auditiva não-sindrômica autossômica recessiva profunda, geralmente neurossensorial, presente no locus DFNB4 (EVERETT et al., 1997; LI et al., 1998;

ANGELI; LIN; LIU, 2012; SILVA-COSTA et al., 2017). Indivíduos diagnosticados clinicamente com síndrome de Pendred apresentam perda auditiva pré-lingual, além de apresentarem más-formações cocleares denominada Displasia de Mondini, onde a cóclea não apresenta duas voltas e meia em torno do modíolo, mas apenas uma e meia. Outras manifestações clínicas característicos desta síndrome são: Aqueduto Vestibular Alargado (AVA) e o bócio. Indivíduos com DFNB causada por mutações no gene *SLC26A4* também podem apresentar casos de AVA (CRYNS; VAN CAMP, 2004). As hipóteses referentes à variação fenotípica causada por alterações neste gene estão associadas à ausência total da função da Pendrina, gerando um quadro mais grave e sindrômico, enquanto mutações que geram atividades residuais da Pendrina estariam associados aos quadros mais brandos e não-sindrômicos (SCOTT; KARNISKI, 2000). Porém, estudos recentes utilizando células de mamíferos falharam em comprovar tal hipótese (BITNER-GLINDZICZ, 2002; TAYLOR et al., 2002).

1.3.3. Estrutura da orelha interna

A morfologia, desenvolvimento e manutenção das estruturas da orelha interna, desde as escalas até os estereocílios das células ciliadas, é dependente de diversas proteínas e complexos proteicos extremamente fundamentais para o processo auditivo. Neste grupo de proteínas, encontramos as junções apertadas e justas (*Tight junctions*), presentes nas membranas celulares das células basais da cóclea, permitindo a forte comunicação/união entre as células adjacentes, fundamental para compartimentalização das três escalas. A orelha interna apresenta uma ampla variedade de células epiteliais, conectadas firmemente às células adjacentes através de proteínas estruturais, como as proteínas de junção. Dentre os principais genes que codificam estas proteínas de junção estão os genes *CLDN14*, *TRIC* e *TJP2*. A Claudina, codificada pelo gene *CLDN14* e associada ao locus DFNB29, é expressa no epitélio sensorial do órgão de Corti, mais precisamente na lâmina reticular, um tecido complexo e composto por células de suporte e sensoriais (WILCOX et al., 2001). Estudos com camundongos *knockout* para este gene mostraram que a orelha interna dos camundongos apresentou desenvolvimento normal, porém após três semanas, as CCE apresentaram rápida degeneração, assim como as CCI, causando a perda auditiva nos camundongos (BEN-YOSEF et al., 2003; DROR; AVRAHAM, 2010). A Tricelulina, codificada pelo gene *TRIC*, é outra proteína

do tipo *tight junction* e está associada ao locus DFNB49. Esta proteína é responsável pela manutenção de três células epiteliais juntas e mutações neste estão associadas à rigidez da lâmina reticular do órgão de Corti, afetando a deflexão dos estereocílios causada pela membrana tectorial, resultando em um estresse na função auditiva e prejudicando o processo de audição (RIAZUDDIN et al., 2006; DROR; AVRAHAM, 2010). O gene *TJP2* está associado ao locus DFNA51. A proteína codificada encontra-se na conexão entre as células sensoriais e de suporte do órgão de Corti, além de ser encontrada no núcleo destas células. Duplicações neste gene afetam a expressão de genes associados à via de apoptose, causando a morte celular das células do órgão de Corti, que por sua vez resultará em perda auditiva (DROR; AVRAHAM, 2010; WALSH et al., 2010a).

Não apenas as regiões basais do órgão de Corti são importantes para o processo auditivo. Outro grupo de proteínas fundamentais estão presentes nos estereocílios das células ciliadas. Embora estes aparentem estar firmemente ancorados por suas regiões basais, diversas proteínas estão presentes em suas membranas laterais e apicais, permitindo a ancoragem entre os estereocílios adjacentes e formado os feixes ciliados. Como visto no item 1.1.3, estes feixes são movimentados pela membrana tectorial, realizando a hiperflexão e deflexão dos estereocílios maiores de cada feixe, que ao curvar-se, puxam os demais cílios menores, permitindo a despolarização celular e estrada de potássio nas células, que resultarão em impulsos nervosos. Estas proteínas são divididas em conexões apicais (*Tip links*), laterais (*Lateral links*) e basais (*Ankle links*) (DROR; AVRAHAM, 2010).

Durante a morfogênese, a orientação dos estereocílios é comandada por genes que regulam a polaridade celular planar (*PCP*, do inglês *Planar Cell Polarity*). Estas proteínas controlam o posicionamento dos cinocílios, principal componente de polarização uniforme dos feixes ciliados em forma de V (nas CCI) ou W (nas CCE). Após o estágio embrionário, onde os feixes celulares são formados e polarizados, os cinocílios deixam de existir (BHONKER et al., 2015).

Após o desenvolvimento da polaridade dos feixes ciliados, os estereocílios se alongam em fileiras crescentes de cílios. Este processo se dá por proteínas motoras denominadas miosinas, que transportam os componentes necessários para a construção dos filamentos de actina por meio da hidrólise de *ATP*, garantindo a estrutura dos estereocílios. Além do alongamento ciliar, as miosinas também estão associadas à manutenção da estrutura do estereocílios, assim como à firmeza que

permitirá a deflexão e hiperflexão dos feixes ciliados. Dentre a ampla família das miosinas associadas com a perda auditiva, destaques são dados às Miosina 6 e 7A. A primeira, codificada pelo gene *MYO6* (OMIM 600970), está presente na base dos estereocílios, e mutações que afetem esta proteína causam a extinção do afunilamento da base dos estereocílios, necessário para a flexibilidade dos cílios. Este gene está associado tanto aos casos de perda auditiva não-sindrômicos autossômico dominante (DFNA22) quanto autossômico recessivo (DFNB37) (AHMED et al., 2003b; MELCHIONDA et al., 2001; SCHWANDER; KACHAR; MÜLLER, 2010). A Miosina 7A é uma proteína motora implicada na regulação do alongamento dos estereocílios. Mutações na Miosina 7A, codificada pelo gene *MYO7A* (OMIM 276903), estão relacionadas aos defeitos no feixe de estereocílios, assim como seu excessivo alongamento, sendo associadas tanto a DFNA11, DFNB2 e Síndrome de Usher tipo 1B (LIU et al., 1997b; WEIL et al., 1997; WELL et al., 1995).

Não apenas a polarização e extensão correta dos feixes de estereocílios é fundamental para o processo auditivo, mas também a ancoragem entre si. Este processo ocorre através de uma complexa rede de proteínas que conectam as regiões apicais, laterais e basais dos estereocílios (figura 11) (SCHWANDER; KACHAR; MÜLLER, 2010).

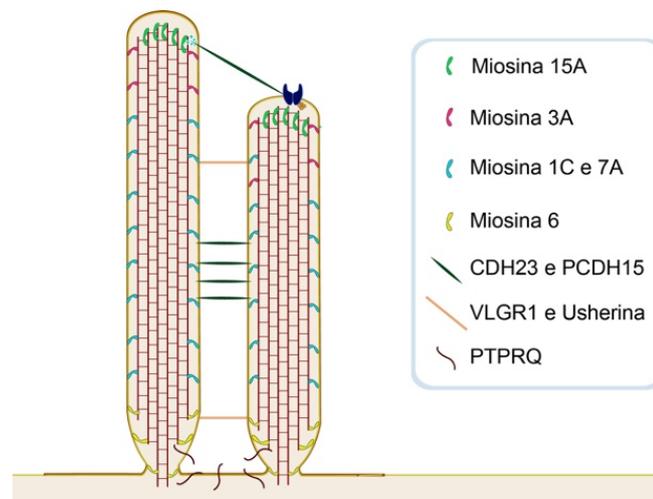


Figura 11. Esquemática das proteínas envolvidas nas conexões apicais, laterais e basais (Elaborado pelo autor).

As principais proteínas que formam as conexões apicais e laterais são: Caderina 23 (gene *CDH23*), Protocaderina 15 (gene *PCDH15*) Miosina 1C/7A/15A

(gene *MYO1C*, *MYO7A*, *MYO15A*, respectivamente) e Harmonina (gene *USH1C*). Para as conexões basais, as principais são: Usherina (gene *USH2A*), Proteína Tirosina Fosfatase Receptora tipo Q (gene *PTPRQ*), Miosina 1C/6/7A (gene *MYO1C*, *MYO6*, *MYO7A*, respectivamente) e Receptor Associado à Proteínas G 98 (gene *VLGR1/GPR98*). Ambas conexões são ancoradas nos filamentos de actina que compõem os estereocílios (SCHWANDER; KACHAR; MÜLLER, 2010).

1.4. Diagnóstico da perda auditiva

A identificação da etiologia da perda auditiva é de extrema importância para a escolha da melhor estratégia de tratamento, minimizando os efeitos causados nos indivíduos afetados e seus familiares. Como citado, a perda auditiva restringe não apenas o processo auditivo e de comunicação pela linguagem falada, mas também é considerado uma barreira pessoal e profissional.

A perda auditiva pode ser causada tanto por fatores ambientais quanto genéticos, sendo fundamental que o profissional da saúde tenha conhecimento de que nem sempre as análises audiológicas permitem a elaboração de um diagnóstico conclusivo. Sendo de notório saber que mais da metade dos casos de perda auditiva congênita são causados por problemas relacionados à genética, é de extrema valia a realização da triagem molecular quando há a suspeita da etiologia ser devido aos fatores herdados. Os resultados moleculares podem permitir a identificação de possíveis genes e mutações causadores da patologia, além de auxiliar no aconselhamento referente à ocorrência da mesma em futuras gerações da família. Assim, além do diagnóstico clínico e molecular serem complementares, eles possibilitam a escolha da melhor estratégia em cada caso, minimizando os efeitos da perda auditiva, seja com acompanhamento ainda na infância pelos profissionais da saúde, com a utilização de aparelhos que auxiliarão na audição ou até mesmo na inserção da criança em escolas que permitirão o desenvolvimento psicossocial correto (CRYNS; VAN CAMP, 2004; JOINT COMMITTEE ON INFANT HEARING, 2007).

1.4.1. Diagnóstico molecular da perda auditiva

Durante as últimas décadas, programas universais de triagem da perda auditiva em recém-nascidos foram implementados em diversos países na tentativa de diminuir a idade de identificação dos problemas auditivos, possibilitando um melhor tratamento e reabilitação dos indivíduos. Nestes programas, o recém-nascido deve ser submetido a exames audiológicos em até um mês após o nascimento. Nos casos onde esta triagem falhe, a repetição deve ocorrer antes dos três meses de vida. Alguns países incluem nesta triagem os testes genéticos envolvendo os principais genes e mutações. Porém, estes testes abrangem menos de 10% das possíveis variantes genéticas (JOINT COMMITTEE ON INFANT HEARING, 2007).

Das técnicas utilizadas na triagem molecular convencional, a reação em cadeia da polimerase (*PCR*, do inglês *Polymerase Chain Reaction*) e sequenciamento de Sanger são responsáveis pela maioria dos testes disponíveis. Embora com princípios similares envolvendo a síntese de uma molécula complementar de DNA, ambas apresentam aplicações e limitações diferentes. O *PCR* consiste na amplificação de forma exponencial do número de cópias de uma denominada sequência conhecida do DNA através da utilização de dois *primers* (oligonucleotídeos), da enzima *Taq Polimerase*, de desoxirribonucleotídeos trifosfatos (*dNTP*, do inglês *deoxynucleotide triphosphates*), além de tampão, cofatores e de um ambiente que permita a variação de forma cíclica da temperatura da reação. Essa foi a técnica padrão ouro da biologia molecular por muitos anos e continua sendo a base de muitas tecnologias atuais com seu princípio de síntese *in vitro* do fragmento utilizando uma molécula molde. A facilidade, baixo custo e velocidade para obtenção de resultados figuram entre os pontos fortes desta técnica. Porém, como pontos negativos, estão a ausência do conhecimento da sequência exata que se está trabalhando, e a impossibilidade de identificar novas variantes em um gene. Além disso, a *PCR* apresenta limitações quanto ao tamanho dos fragmentos amplificados, além da suscetibilidade à contaminação (HOLLAND et al., 1991).

Já o sequenciamento de Sanger permite a síntese de uma molécula de DNA complementar utilizando *dNTPs* modificados, denominado dideoxinucleotídeos trifosfatos (*ddNTP*, do inglês *dideoxynucleotide triphosphates*). Estes nucleotídeos não apresentam o grupo 3'-hidroxil (3'-OH) e são marcados com uma molécula fluorescente. Assim sendo, após a incorporação de um *ddNTP* na síntese da fita

complementar, nenhum outro nucleotídeo é adicionado devido à impossibilidade de gerar uma ligação fosfodiéster. Com isso, a amplificação é interrompida, gerando fragmentos de diversos tamanhos. Todos fragmentos de uma reação são inseridos em um capilar, onde cargas positivas e negativas são aplicadas. Pelo fato do DNA ser uma molécula quimicamente negativa, os fragmentos percorrem o capilar do polo negativo até a positivo, do menor ao maior fragmento. Estes capilares apresentam uma janela, denominada janela de detecção, onde um laser e complexos sistemas de captura de fluorescência se encontram. Ao passar por esta região, o fragmento é excitado pelo laser. Devido a presença de uma molécula fluorescente no *ddNTP*, há a emissão da fluorescência, que por sua vez é detectada pelas câmeras de captura e registradas para elaboração dos eletroferogramas. Entre os pontos positivos, estão o conhecimento exato de cada nucleotídeo da sequência amplificada, permitindo a descoberta de novas variantes, pequenas deleções e inserções, etc. Figurando entre os pontos negativos estão o custo dos reagentes e equipamento, o tempo necessário para a realização do experimento e o tamanho dos fragmentos que são gerados, variando de poucas centenas até pouco mais de mil pares de base, algo relativamente pequeno, levando em consideração que alguns genes são grandes e complexos, como o caso do gene *DMD*, relacionado com distrofia muscular de Duchenne (*DMD*, do inglês *Duchenne Muscular Dystrophy*), o maior gene encontrado com 2.4 Mb (BROWNSTEIN; BHONKER; AVRAHAM, 2012; SANGER; NICKLEN; COULSON, 1977).

Ao se tratar de perda auditiva, há um consenso a respeito da triagem molecular. O primeiro gene analisando é o *GJB2*. Em caucasianos, a principal mutação triada é a c.35delG. Porém muito dos casos, o indivíduo apresenta apenas a mutação em apenas um alelo, não esclarecendo a etiologia do afetado. Assim, demais mutações neste mesmo gene são triadas, por sequenciamento de Sanger, buscando uma mutação complementar que explique o fenótipo. O locus onde encontra-se o gene *GJB2* também apresenta o gene *GJB6*, associado à perda auditiva, principalmente em indivíduos heterozigotos para alguma mutação no gene *GJB2*. Duas principais deleções do gene *GJB6*, *del(GJB6-D13S1830)* e *del(GJB6-D13S1854)*, são triadas através de uma combinação de *primers* em reações denominado *PCR multiplex*. Outra mutação analisada na triagem inicial da perda auditiva é a m.A1555G, no gene mitocondrial *MTRNR1*. Esta mutação está relacionada aos casos de perda auditiva associados ao uso de antibióticos

aminoglicosídeos (DE OLIVEIRA et al., 2007; DEL CASTILLO et al., 2005, 2002; SANTORELLI et al., 1996).

Porém, sabe-se que mais de 100 genes estão relacionados a perda auditiva e este número pode chegar à 300 genes. Com ampla variedade de genes e conhecimento que muitos genes apresentavam pelo menos 20 variantes patogênicas, novas estratégias na triagem da perda auditiva foram adotadas, principalmente utilizando tecnologias de alto rendimento (*high-throughput*) de genotipagem, como TaqMan OpenArray Genotyping e Sequenom MassARRAY iPLEX. (MARTINS et al., 2013; NANCE, 2003; SVIDNICKI et al., 2015).

Porém, mesmo com o avanço das plataformas de alto rendimento para genotipagem, apenas as variantes descritas forem possíveis de ser detectadas. Tendo a necessidade de uma plataforma mais robusta e que também identificasse novas variações e novos genes associadas aos problemas genéticos, foi necessário o aprimoramento de novas tecnologias e métodos. Dentre as principais tecnologias desenvolvidas está o sequenciamento paralelo massivo.

1.4.1.1. Sequenciamento paralelo massivo

O sequenciamento de Sanger foi muito empregado na descoberta de novos genes e alterações, principalmente ao se tratar da perda auditiva. Porém esta tecnologia é limitada ao se tratar de sequenciamento de grandes genes, apresentando custo elevado e demasiado tempo para análise. Tendo em mente estas inviabilidades, a aplicabilidade dos sequenciadores automáticos acabou por restringir-se apenas à varredura de genes pequenos, ou de fragmentos não muito extensos de DNA, além da validação de outras tecnologias (GOODWIN; MCPHERSON; MCCOMBIE, 2016). Embora não sendo a principal técnica de sequenciamento na descoberta de novos genes associados a patologias, o sequenciamento de Sanger foi um marco na história, possibilitando o primeiro “rascunho” do Projeto Genoma Humano em 2001, assim como a sua versão final dois anos após, com valor total de, aproximadamente, 3.4 bilhões de dólares americanos (BAO et al., 2014; LEVY; MYERS, 2016).

Com novas informações referentes ao genoma humano, as análises genômicas mudaram de magnitude. Com a sequência conhecida, o próximo passo foi identificar a função de cada região contida no genoma, assim como o efeito das suas variações. Com isso, novas e robustas ferramentas de alto rendimento necessitaram

ser desenvolvidas, iniciando uma corrida da era genômica em busca de informações. Foi em 2006 que tecnologias de segunda geração de sequenciamento começaram a emergir na análise do DNA e RNA. Denominada Sequenciamento Paralelo Massivo (*MPS*, do inglês *Massive Parallel Sequencing*), também conhecida como Sequenciamento de Próxima Geração (*NGS*, do inglês *Next Generation Sequencing*), esta tecnologia foi e continua sendo considerada o principal método utilizado nas investigações de sequências. Duas tecnologias baseadas no sequenciamento paralelo massivo se destacam na análise do DNA. A primeira delas é o Sequenciamento Completo do Genoma (*WGS*, do inglês *Whole Genome Sequencing*). Esta teoricamente possibilita o sequenciamento, de uma única vez, do genoma completo de um organismo. A segunda restringe-se apenas ao sequenciamento das regiões codificantes, denominada Sequenciamento Completo do Exoma (*WES*, do inglês *Whole Exome Sequencing*), permitindo o sequenciamento simultâneo de todos os éxons de um genoma, que no caso dos seres humanos são os éxons de, aproximadamente, 30 mil genes, o equivalente a 1% de todo o genoma. Dentre as demais tecnologias de sequenciamento paralelo massivo, podemos citar RNA-seq, ChIP-seq e Metil-seq (ATIK et al., 2015; BAO et al., 2014).

Tanto o *WGS* quanto o *WES* apresentam pontos a favor e contra que variam de acordo com a aplicação das plataformas. A técnica de *WGS* tem como ponto positivo o sequenciamento completo do genoma. Isto permite a análise não apenas das regiões codificantes, mas também das demais regiões regulatórias e íntrons. Entre os pontos desfavoráveis estão a quantidade dos dados gerados provenientes do sequenciamento, além da necessidade de grandes espaços para armazenamento dos dados e de análises de bioinformática mais complexas. No caso da técnica de *WES*, apenas os éxons são sequenciados. Sabe-se que mais de 85% das doenças Mendelianas são causadas por variantes patogênicas em regiões codificantes ou sítios de *splicing*. Assim, esta acaba sendo a principal estratégia para estudo de problemas genéticos com pouca ou nenhuma informação disponível. Além da quantidade de dados gerados ser inferior aos do *WGS*, assim como seu custo, as análises bioinformáticas são menos complexas. Porém, variantes patogênicas em regiões intrônicas e regulatórias podem passar despercebidas na análise molecular (ATIK et al., 2015; DIAZ-HORTA et al., 2016).

Uma das principais limitações das plataformas de sequenciamento paralelo massivo está no sequenciamento de regiões repetitivas e complexas dos genomas.

Isto ocorre pelo fato da grande maioria de plataformas sequenciarem apenas pequenos fragmentos de DNA. A solução para este problema estaria no sequenciamento de maiores fragmentos de DNA, possibilitando amplificação completa das regiões complexas e o melhor alinhamento com o genoma de referência (ATIK et al., 2015; GOODWIN; MCPHERSON; MCCOMBIE, 2016).

O uso de tecnologias baseadas em sequenciamento paralelo massivo depende de etapas cruciais para a obtenção de ótimos resultados. Dentre os processos envolvendo o sequenciamento completo do exoma estão: Preparo e enriquecimento da biblioteca genômica, sequenciamento massivo e análises bioinformáticas.

1.4.1.1.1. Preparo da biblioteca genômica

A primeira etapa compreende na fragmentação total do DNA genômico, podendo ocorrer de forma mecânica, por sonicação ou com o uso de enzimas de restrição. Com diversos fragmentos menores que 500 pb, adaptadores são adicionados às extremidades destes fragmentos. Estes mesmos adaptadores apresentam uma região complementar aos *primers* fornecidos nos *kits* de preparo da biblioteca, responsáveis pela geração de milhares de cópias do mesmo fragmento por *PCR* (figura 12). Este processo é denominado “enriquecimento das moléculas alvo” e precede o sequenciamento completo do exoma (GOODWIN; MCPHERSON; MCCOMBIE, 2016).

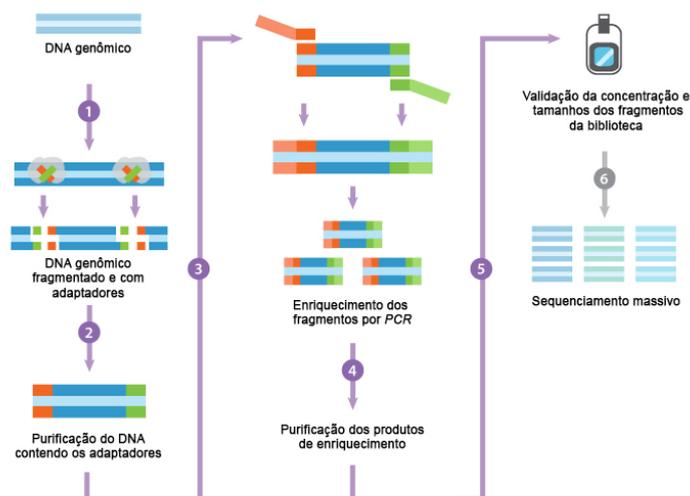


Figura 12. Esquematização resumida do preparo de bibliotecas genômicas (Modificado de https://www.abmgood.com/marketing/knowledge_base/next_generation_sequencing_experimental_design.php).

O processo acima pode variar de acordo com a plataforma e *kits* utilizados para o sequenciamento. Todos os reagentes necessários para a construção da biblioteca genômica são fornecidos juntamente com os *kits* vendidos comercialmente.

1.4.1.1.2. Sequenciamento

O sequenciamento massivo é a etapa que sucede o preparo da biblioteca genômica. Diversos fatores nesta etapa estão implicados na qualidade dos resultados obtidos, inclusive no desenho do experimento. As tecnologias mais difundidas atualmente utilizam o sistema de sequenciamento de curtos fragmentos, variando de 35 a 400 pb. Além disso, ele pode ser *single-end* ou *paired-end*. No sequenciamento *single-end*, o DNA molde é sequenciado apenas em uma direção, ou seja, há apenas o sequenciamento de uma fita do genoma. No caso de *paired-end*, o genoma é sequenciado de ambas as direções, obtendo ambas as fitas. Estes dois fragmentos sequenciados apresentam distância conhecida entre um fragmento e outro, permitindo o melhor alinhamento dos fragmentos com o genoma de referência (figura 13) (SIMS et al., 2014).

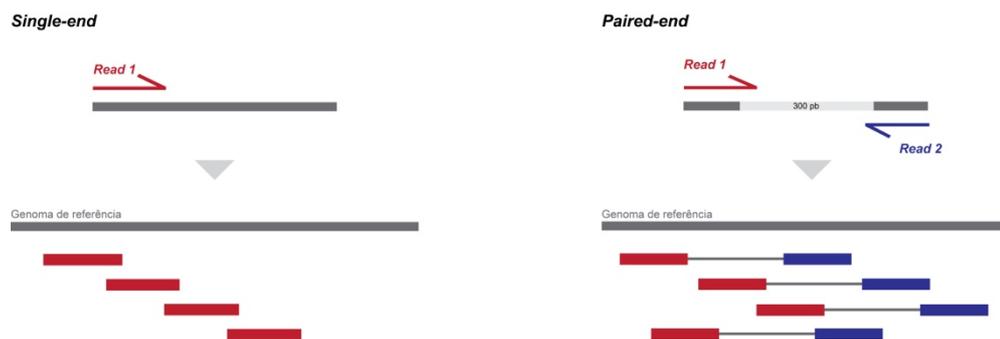


Figura 13. Representação gráfica dos métodos de sequenciamento *single-end* e *paired-end* (Elaborado pelo autor).

Outros dois parâmetros devem ser definidos durante o desenho do experimento: a cobertura e a profundidade. A cobertura pode ser classificada em teórica (média do número de vezes que uma base será repetida baseado no número de *reads* sequenciados de um certo comprimento) ou empírica (o número exato que a mesma base foi sequenciada de acordo com *reads* de alta qualidade do sequenciamento). O termo profundidade (do inglês *depth*) é um sinônimo de

cobertura, sendo utilizado para indicar quantas vezes a mesma base é sequenciada. Embora com significados redundantes, os termos têm representações diferentes no sequenciamento paralelo massivo. O termo cobertura passou a se referir à abrangência da cobertura, indicando o quanto do genoma foi sequenciado. No início desta tecnologia, a cobertura recomendada para a obtenção de bons resultados era de 100 X, principalmente devido a prevalência do sequenciamento *single-end*. Com o aperfeiçoamento da técnica e a melhora dos reagentes, atualmente há a prevalência dos sequenciamentos *paired-end*, diminuindo a cobertura mínima para 30 X (figura 14) (SIMS et al., 2014).

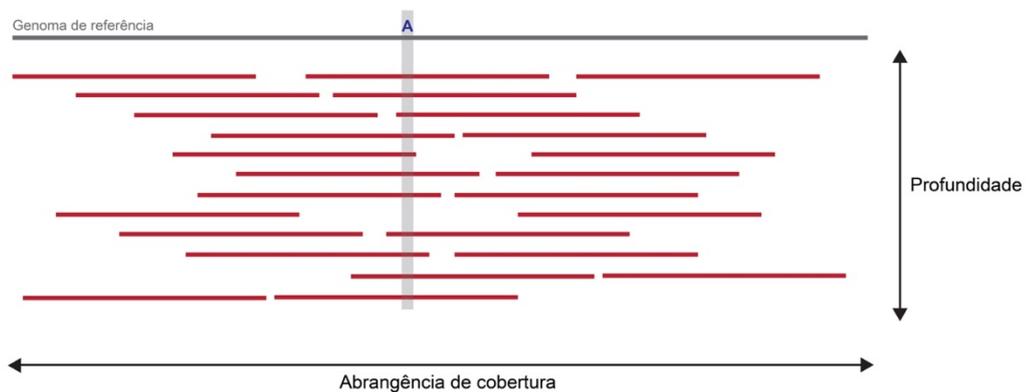


Figura 14. Ilustração representativa dos conceitos de profundidade e abrangência de cobertura de acordo com o sequenciamento paralelo massivo (Elaborado pelo autor).

As plataformas disponíveis de sequenciamento paralelo massivo de pequenos fragmentos apresentam diferenças nos métodos utilizados para o sequenciamento e detecção das bases incorporadas, podendo ser divididos em duas sub-categorias: sequenciamento por ligação (*SBL*, do inglês *Sequencing By Ligation*) e sequenciamento por síntese (*SBS*, do inglês *Sequencing By Synthesis*).

1.4.1.1.2.1. Sequenciamento de fragmentos curtos por ligação

No sequenciamento por ligação, uma sonda marcada com um agente fluorescente é hibridizada com um fragmento complementar de DNA. Além da sequência específica, esta sonda contém uma sequência degenerada que também se ligará à fita molde. A ação de uma *ligase* permite a clivagem de parte dos nucleotídeos degenerados, liberando o fluoróforo da sonda, que é captada por um sistema de

câmeras, identificando a sonda naquela posição. Este processo é repetido diversas vezes, alterando o quadro de leitura até que toda sequência seja identificada (figura 15). Dentre as principais plataformas utilizando esta metodologia estão a *SOLiD* (Thermo Fisher Scientific, EUA) e *Complete Genomics* (Beijing Genomics Institute, China), ambas comercialmente descontinuadas (GOODWIN; MCPHERSON; MCCOMBIE, 2016; LEVY; MYERS, 2016).

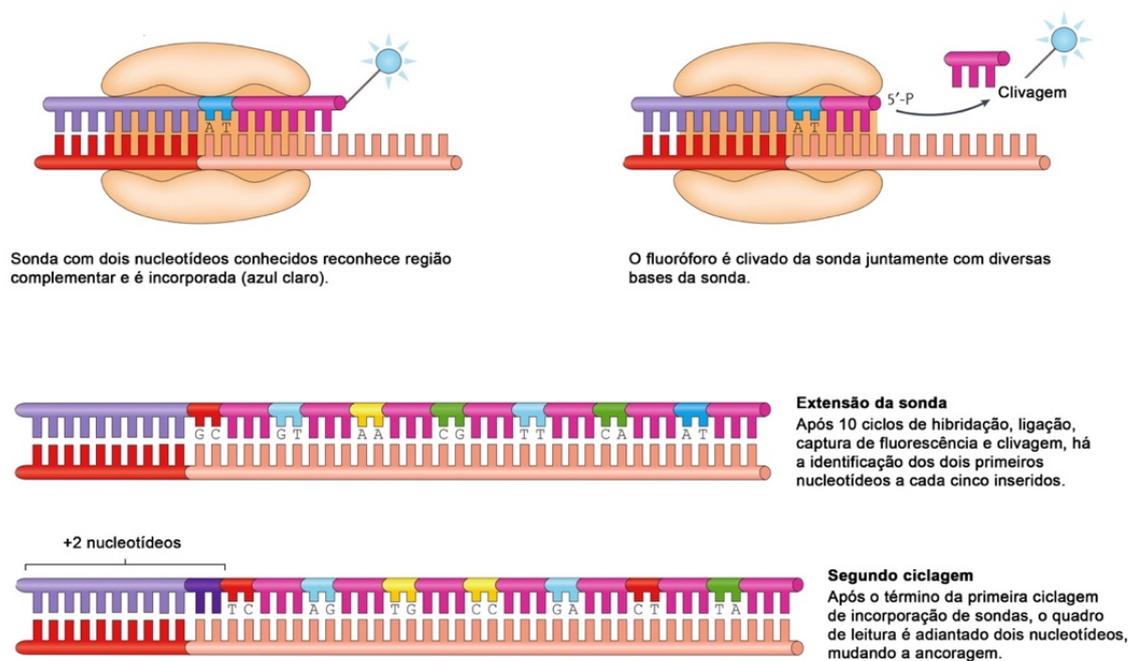


Figura 15. Representação de um sequenciamento massivo realizado pelo método de ligação por sonda. Esta exemplificação se baseia na plataforma *SOLiD NGS* (Modificado de GOODWIN; MCPHERSON; MCCOMBIE, 2016).

1.4.1.1.2.2. Sequenciamento de fragmentos curtos por síntese

No sequenciamento por síntese, a identificação do fragmento se dá pela incorporação de um nucleotídeo marcado à região complementar do DNA molde. A detecção pode ocorrer pela emissão da fluorescência oriunda de cada base inserida ou até mesmo a variação do *pH* (do inglês *Potential of Hydrogen*) do meio após a incorporação de cada nucleotídeo (figuras 16 e 17). As principais plataformas são: *Illumina* (Illumina, EUA), *PacBio* (Pacific Biosciences, EUA) e *Ion Torrent* (Thermo Fisher Scientific, EUA) (GOODWIN; MCPHERSON; MCCOMBIE, 2016; LEVY; MYERS, 2016).

Uma nova categorização ocorre entre as plataformas que realizam o sequenciamento por síntese. O método de incorporação dos *dNTPs* podem ocorrer através de terminação reversível cíclica (*CRT*, do inglês *Cyclic Reversible Termination*) ou adição de único nucleotídeo (*SNA*, do inglês, *Single-Nucleotide Addition*) (GOODWIN; MCPHERSON; MCCOMBIE, 2016).

No método de terminação reversível cíclica, o nucleotídeo inserido na construção do fragmento final, denominado *read*, apresenta similaridade com o processo de sequenciamento desenvolvido por Sanger. Neste, o grupo 3'-hidroxil da ribose de cada *dNTP* encontra-se “bloqueado” quimicamente, impossibilitando o alongamento da fita de DNA pela incorporação do próximo *dNTP*. Além deste bloqueador, cada tipo de *dNTP* (*dATP*, *dTTP*, *dCTP* e *dGTP*) dispõe de um fluoróforo específico que permite identificar qual base nitrogenada foi inserida (GOODWIN; MCPHERSON; MCCOMBIE, 2016; SANGER; NICKLEN; COULSON, 1977).

Após o fragmento do DNA contendo o adaptador reconhecer a sequência complementar imobilizada em uma matriz sólida, *primers* compatíveis com a região do adaptador são anelados, permitindo a síntese da fita de DNA. A reação então se dá por uma ciclagem incorporação/lavagem/clivagem/detecção. Durante a extensão da fita complementar, uma polimerase utiliza uma mistura contendo os quatro tipos de *dNTP* marcado por fluoróforo e com o bloqueador. Entre cada ciclo de inserção de nucleotídeo há um processo de lavagem, removendo os nucleotídeos que não foram incorporados à fita. Em seguida, há a clivagem do agente fluorescente, emitindo um sinal registrado por câmeras *CCD* (do inglês *Charge-Coupled Device*). Após a detecção, tanto a molécula fluorescente como o agente bloqueador são removidos, permitindo um novo ciclo para a extensão da fita a ser sintetizada (figura 16). Devido a formação de *cluster* de um mesmo fragmento, o sinal emitido durante a incorporação de um *dNTP* é superior ao de qualquer ruído, evitando assim problemas na identificação do nucleotídeo. A principal plataforma a utilizar este método de sequenciamento é a plataforma *Illumina NGS* (Illumina, EUA).

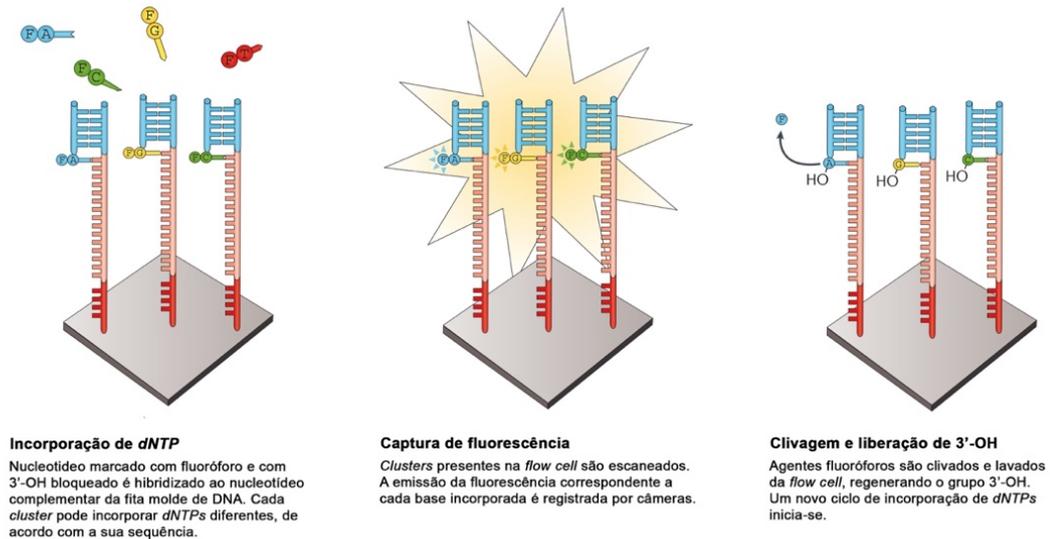


Figura 16. Representação do método de sequenciamento massivo por síntese e terminação reversível cíclica (Modificado de GOODWIN; MCPHERSON; MCCOMBIE, 2016).

O outro método de sequenciamento por síntese ocorre pela simples adição de um nucleotídeo e a sua detecção, sem a necessidade de interromper o sequenciamento para realizar a detecção. Porém, como nenhum nucleotídeo é marcado com nenhuma agente fluoróforo que possibilite a distinção de qual base foi incorporada, o processo de síntese se dá pela adição de apenas um tipo de *dNTP* por vez, seguido da sua detecção (GOODWIN; MCPHERSON; MCCOMBIE, 2016; LEVY; MYERS, 2016).

A primeira plataforma de sequenciamento paralelo massivo produzida recebeu o nome de 454 (Roche, EUA). O sequenciamento era realizado através de um pirosequenciador. Neste, as esferas (*beads*) contendo o DNA molde eram distribuídas em uma placa (*PicoTiter Plate*) contendo uma mistura enzimática. A cada incorporação de *dNTP*, uma cascata enzimática ocorria, resultando em um sinal de bioluminescência, detectado por uma câmera CCD. A emissão/detecção de algum sinal luminescente indicava a incorporação do tipo de *dNTP* do presente ciclo. Esta plataforma foi descontinuada (GOODWIN; MCPHERSON; MCCOMBIE, 2016).

Atualmente, a principal plataforma a realizar o sequenciamento por síntese por meio da simples adição de *dNTP* é *Ion Torrent* (Thermo Fisher Scientific, EUA). Diferente de qualquer tecnologia, esta detecta os íons de H^+ que são liberados da incorporação de cada *dNTP*. A variação de *pH* do meio é detectada por um semiconductor (CMOS, do inglês *Integrated Complementary Metal-Oxide-*

Semiconductor) e um transistor (*ISFET*, do inglês *Ion-Sensitive Field-Effect Transistor*) (figura 17) (GOODWIN; MCPHERSON; MCCOMBIE, 2016; LEVY; MYERS, 2016).

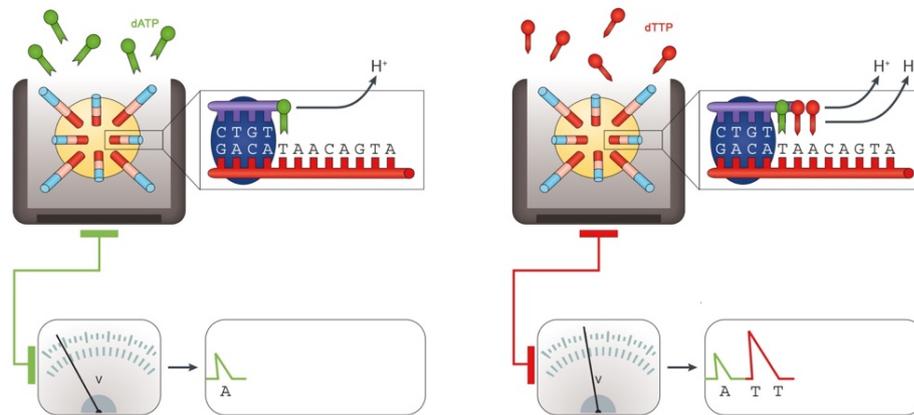


Figura 17. Representação de sequenciamento massivo utilizando a tecnologia *Ion Torrent* (Thermo Fisher Scientific, EUA) (Modificado de GOODWIN; MCPHERSON; MCCOMBIE, 2016).

1.4.1.1.2.3. Sequenciamento massivo de fragmentos longos

Os genomas apresentam diversas regiões repetitivas, alterações nos números de cópia e variações estruturais que não são detectadas pelos pequenos *reads* gerados nas plataformas convencionais de sequenciamento paralelo massivo. Com esta limitação, um novo método objetivando a geração de *reads* longos vem sendo desenvolvida. Estima-se que estas novas plataformas possibilitarão o sequenciamento de *reads* com vários *kb* de tamanho, permitindo incluir em apenas um *read* regiões repetitivas e complexas sem haver nenhum problema de ambiguidade (GOODWIN; MCPHERSON; MCCOMBIE, 2016; LEVY; MYERS, 2016).

O principal método empregado para a geração de *reads* longos é denominado sequenciamento em tempo real de uma simples molécula. Este não necessita da geração de *clusters* de um único fragmento, nem da ciclagem química para detecção de cada base nitrogenada. A estratégia está na fragmentação do genoma e a inserção de códigos de barra em cada fragmento (do inglês *barcodes*), permitindo a posterior montagem do genoma por meio da bioinformática. Uma das principais plataformas utilizando esta tecnologia é a *PacBio* (Pacific Biosciences, EUA). Esta utiliza uma *flow cell* específica, com milhares de poços individualizados e de fundo transparente. A síntese do fragmento se dá por uma polimerase imobilizada ao fundo de cada poço. Assim, a cada *dNTP* incorporado, há a detecção em tempo

real por meio de um sistema de laser e câmeras, registrando a fluorescência e o tempo de exposição em que ela foi emitida. Após a captura, o fluoróforo é clivado, permitindo a incorporação da próxima base (figura 18). Uma das limitações envolvendo esta tecnologia está no sequenciamento de fragmentos maiores de 3 kb. O DNA molde forma uma estrutura circular com a adição dos adaptadores, permitindo o sequenciamento repetitivo do mesmo fragmento diversas vezes. Após o término das extensões, é gerado um consenso dos fragmentos denominado sequencia circular consenso (CCS, do inglês *Circular Consensus Sequence*) (GOODWIN; MCPHERSON; MCCOMBIE, 2016; LEVY; MYERS, 2016).

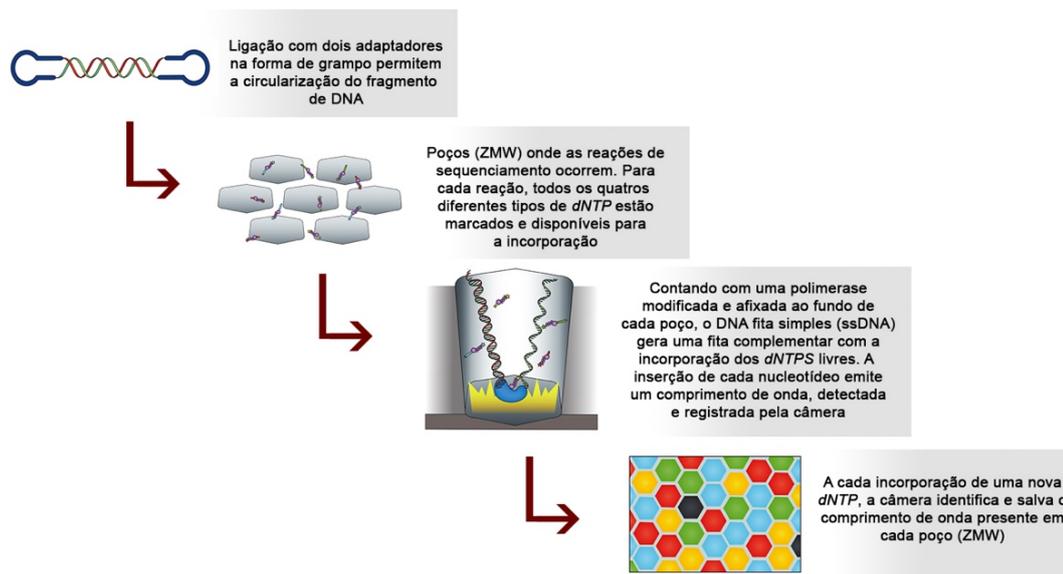


Figura 18. Ilustração do sequenciamento utilizando a metodologia *PacBio* (Pacific Biosciences, EUA) (Modificado de GOODWIN; MCPHERSON; MCCOMBIE, 2016)

A outra plataforma disponível que permite a síntese de fragmentos longos recebe o nome de *Nanopore NGS* (Oxford Nanopore Technologies, Reino Unido). Nesta, não ocorre a síntese/hibridação de uma nova fita de DNA a partir de uma molécula molde, mas sim a detecção da composição de uma fita simples de DNA (*ssDNA*, do inglês *single strand DNA*). A fita simples de DNA passa pelo poro de uma proteína aberto por meio da aplicação de uma corrente elétrica. Em seguida, a molécula simples de DNA passa pelo poro de uma proteína motora secundária. A corrente constante aplicada neste sistema permite identificar as mudanças de voltagem geradas pela passagem da *ssDNA*, registrando a sequência específica dos nucleotídeos (figura 19). A sequência é identificada pela análise bioinformática

utilizando análises de *k-mer* registradas na passagem do DNA (GOODWIN; MCPHERSON; MCCOMBIE, 2016; LEVY; MYERS, 2016).

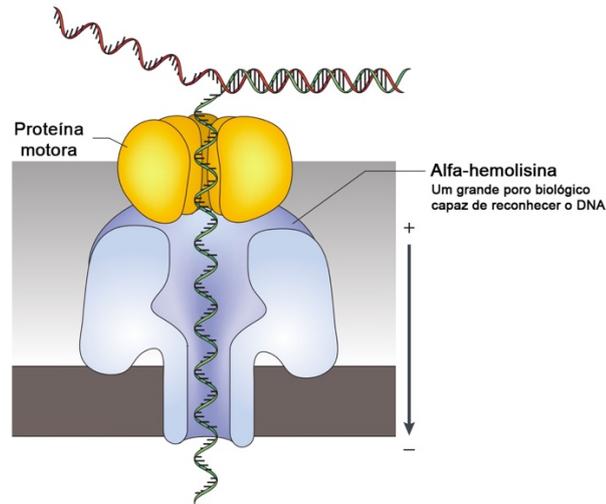


Figura 19. Representação do sequenciamento por meio da tecnologia *Nanopore* (Oxford Nanopore Technologies, Reino Unido) (Modificado de GOODWIN; MCPHERSON; MCCOMBIE, 2016)

A relação entre dados gerados por corrida e comprimento dos *reads* pode ser observado na figura 20.

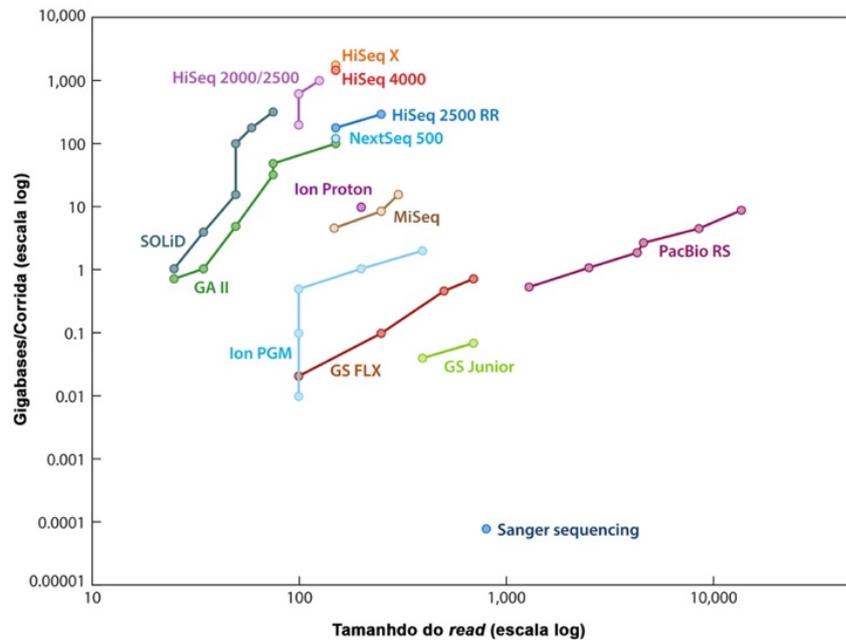


Figura 20. Comparativo entre plataformas de sequenciamento paralelo massivo, tamanho dos *reads* e quantidade de dados gerados (Modificado de LEVY; MYERS, 2016).

1.4.1.1.3. Análise bioinformática

As análises de bioinformática são fundamentais para a obtenção de dados com qualidade gerados dos sequenciamentos, assim como a identificação das possíveis variantes causais (BAO et al., 2014).

Arquivos *FASTQ* são os arquivos de saída proveniente das plataformas de sequenciamento paralelo massivo. Este tipo de arquivo, diferentemente dos arquivos *FASTA* (apenas a sequência de nucleotídeos), contém a sequência obtida assim como sua qualidade baseada na classificação *Phred*, representada pelos códigos *ASCII*. Todas sequências de um *read* são concatenadas em um único arquivo, passando pelo controle de qualidade (*QC*, do inglês *Quality Control*). Esta etapa é realizada por uma aplicação desenvolvida em *java*, o *FastQC*, que checa a qualidade dos *reads* gerados pelo sequenciamento paralelo massivo, assim como a distribuição do conteúdo GC, comprimento médio dos *reads*, quantidade de *reads*, duplicações de sequências, etc. O principal motivo da realização do controle de qualidade está na identificação de sequências referentes aos adaptadores presentes nos *reads*, dificultando ou até inviabilizando o alinhamento com um genoma de referência. Uma forma de corrigir tais problemas seria a remoção destas regiões das extremidades dos fragmentos por outras ferramentas (BAO et al., 2014; VAN DER AUWERA et al., 2013).

A etapa que sucede é o alinhamento dos *reads* com boa qualidade a um genoma de referência com máxima eficiência e acurácia. Utilizaremos para exemplificação a versão do genoma humano *hg38*, também conhecido como *GRCh38* (*Genome Reference Consortium*), a mais recente versão do genoma publicada em dezembro de 2013. Diversas ferramentas estão disponíveis para realizar este alinhamento dos *reads*, porém a sua escolha depende de qual genoma o pesquisador está trabalhando. Para alinhamento de fragmentos curtos, as principais ferramentas utilizadas são *BWA* e *Bowtie2*, ambas utilizando o algoritmo *BWT* (*Burrows–Wheeler Transformation*). Ambos os programas pareiam a sequência dos *reads* com o genoma de referência. Estes devem obedecer alguns parâmetros, como porcentagem de *mismatches* de nucleotídeos permitidos no alinhamento, uma vez que há variações no genoma de cada indivíduo. Importante ressaltar que a escolha de qual ferramenta utilizar dependerá do desenho do experimento. Ao término, é gerado um arquivo *SAM*

(do inglês *Sequence Alignment Map*), sendo então convertido em um arquivo binário (*BAM*, do inglês *Binary Alignment Map*) (BAO et al., 2014; LI et al., 2009).

Objetivando a redução de artefatos, três processos pós-alinhamento são recomendados: remoção de *reads* duplicados, re-alinhamento de *indel* e re-calibragem da qualidade dos nucleotídeos. Após o alinhamento com o genoma de referência, alguns *reads* podem apresentar a mesma posição de início e término. Isto pode representar de fato um material genético duplicado (*CNV*, do inglês *Copy Number Variation*) ou um artefato da reação de *PCR*. Nos casos de *WES*, é recomendado a remoção destes *reads* duplicados para evitar problemas com viés referentes à amplificação do fragmento. Das ferramentas que realizam esta remoção, estão o *Picard tools* (Broad Institute Inc., EUA) e *SAMtools* (LI et al., 2009). Após a remoção dos fragmentos duplicados, há um re-alinhamento do *reads* para identificar possíveis pequenas inserções ou deleções no genoma. A principal ferramenta para tal é o *GATK* (*Genome Analysis Toolkit*), uma aplicação com diversas ferramentas de bioinformática. A estipulação de um valor *Phred* para cada nucleotídeo inserido é fundamental para a análise bioinformática. Este parâmetro irá indicar qual a probabilidade do sequenciador ter acertado na identificação do nucleotídeo naquela posição. A re-calibração pós-alinhamento destas bases incorporada utiliza diversos parâmetros visando diminuir a chance de falsos positivos e negativos nos resultados finais. Novamente o *GATK* figura entre as principais ferramentas utilizadas (BAO et al., 2014; DEPRISTO et al., 2011; VAN DER AUWERA et al., 2013).

A seguinte etapa refere-se à análise da variante, consistindo na identificação de qualquer tipo de variação no genoma sequenciado em referência ao genoma de referência utilizado (do inglês *variant calling*), anotação das variantes e filtragens. O arquivo de saída contendo as variantes identificadas e sua posição genômica recebe o nome de *VCF* (do inglês *Variant Call Format*). Das etapas seguintes, há a anotação das variantes com a informação disponível em diversos banco de dados públicos. Esta anotação pode conter informações como a posição da variante em transcritos e em proteínas, o tipo de variante (sinônima, não-sinônima, exônica, intrônica, *UTR*, *indel* com e sem troca de quadro de leitura, etc.), além da informação se a variante está presente em heterozigose ou homozigose. Além disso, a anotação inclui a frequência da variante de acordo com banco de dados públicos e a pontuação em diversas ferramentas de predição *in silico* referentes ao efeito da variante da função da proteína afetada, assim como região afetada (evolutivamente

conservada ou não) (tabela 9). A principal ferramenta responsável pela anotação das variantes é o *ANNOVAR*, que também dispõe de uma versão online (*wANNOVAR*) (BAO et al., 2014; CHANG; WANG, 2012).

Tabela 9. Principais ferramentas de predição *in silico* e suas respectivas classificações.

Tipo de análise	Ferramenta	Pontuação	Classificação (Efeito)
Conservação	GRATHAM	0-50	Conservado
		51-100	Moderadamente conservado
		101-150	Moderadamente não conservado
		≥151	Não conservado
	GERP++	-12,3	Não conservado
		6,17	Conservado
	PhyloP	-14	Não conservado
		6	Conservado
	PhastCons	0	Não conservado
		1	Conservado
Função	SIFT	<0,05	Deletério (D)
		≥0,05	Tolerado (P)
	PolyPhen (hVar)	≥0,957	Provavelmente patogênico (D)
		≥0,453 e ≤0,956	Possivelmente patogênico (P)
		≤0,452	Não patogênico (B)
	PolyPhen (hDiv)	≥0,909	Provavelmente patogênico (D)
		≥0,447 e ≤0,908	Possivelmente patogênico (P)
		≤0,446	Não patogênico (B)
	Mutation Taster	A	Patogênico (predição automática)
		D	Patogênico
N		Polimorfismo	
P		Polimorfismo (predição automática)	
LTR	D	Patogênico	
	N	Neutro	
	U	Desconhecido	
Mutation Assessor	H	Efeito deletério grande	
	M	Efeito deletério médio	
	L	Efeito deletério baixo	
	N	Neutro	
FATHMM	<1,5	Patogênico	
	≥1,5	Tolerado	

A filtragem e priorização das variantes varia de acordo com o objetivo do estudo. Porém, a frequência e a pontuação das ferramentas de análise *in silico* são os principais parâmetros para identificação das variantes candidatas como causais da patologia estudada, que ao serem identificadas, dever ser exaustivamente analisadas e comparadas com dados publicados na literatura (BAO et al., 2014).

O primeiro gene associado à perda auditiva não-sindrômica foi o *TPRN*, responsável pela DFNB79 em uma família paquistanesa (REHMAN et al., 2010), seguido do gene *GPSM2* (lôcus DFNB82) em uma família palestina (WALSH et al., 2010b). Ambos os genes foram identificados através do sequenciamento completo do exoma dos indivíduos analisados. O primeiro caso de perda auditiva não-sindrômica autossômica dominante utilizando o sequenciamento paralelo massivo, mais precisamente o *WES*, foi pela identificação de uma mutação no gene *CEACAM16*, no lôcus DFNA4 (ZHENG et al., 2011).

Outra tecnologia de sequenciamento paralelo massivo mostrou-se bastante promissora no estudo da perda auditiva de origem genética, principalmente visando o diagnóstico clínico. Conhecida com painel de captura (*TGC + MPS*, do inglês *Targeted Genomic Capture* seguido de *Massive Parallel Sequencing*), este método permite o sequenciamento não do exoma, mas apenas dos éxons de genes alvos. Além de apresentar análise mais simples, gerando menor quantidade de dados, o painel apresentava uma cobertura maior do sequenciamento quando comparada ao *WGS* e *WES* (ATIK et al., 2015). O primeiro painel de captura foi desenvolvido em 2011 e atualmente é conhecido com *HEar-Seq*. Este contava com 246 genes relacionados à perda auditiva em humanos e camundongos. Na sua primeira triagem, contou com 11 indivíduos do Oriente Médio com suspeita de surdez genética. Deste, seis casos (dois autossômicos dominantes e quatro autossômicos recessivos) tiveram êxito na identificação das mutações responsáveis pela perda auditiva, estas presentes nos genes *CDH23*, *MYO15A*, *TMC1*, *WFS1* e *TECTA* (BROWNSTEIN et al., 2011). Atualmente, este painel encontra-se na quarta versão e é considerado o painel mais abrangente focado na identificação de perda auditiva de origem genética voltado para pesquisa. Além de contar com 392 genes associados à perda auditiva, o *HEar-Seq v4* também oferece a análise de variação do número de cópias (*CNV*) (fonte: comunicação pessoal).

OtoSCOPE, *OtoGenome* e *Otogenetics* figuram entre os principais painéis comerciais para a detecção da perda auditiva. *OtoSCOPE* (do inglês *Otologic Sequence Capture Of Pathogenic Exons*) teve sua primeira versão em 2010 e contava 54 genes associados à perda auditiva, o equivalente a 0,02% de todo genoma ou 1% de todo exoma humano. Atualmente, ao custo de USD 1.500, este painel encontra-se na sexta versão e conta com 116 genes relacionados à perda auditiva não-sindrômica, síndrome de Pendred e de Usher (SHEARER et al., 2010; SHEARER; SMITH, 2015).

O painel *Otogenetics* é comercializado pelo *OtoGenetics Corporation* (Norcross, EUA), contendo 129 genes relacionados aos casos síndrômicos e não-síndrômicos de perda auditiva. Seu custo é de, aproximadamente, 600 dólares americanos e os resultados são entregues entre cinco e seis semanas (SHEARER; SMITH, 2015).

Outro painel comercial de captura de genes associados à perda auditiva recebe o nome de *OtoGenome* (Partners Healthcare - Boston, EUA) e conta com 87 genes. Levando de oito a doze semanas para ter os resultados entregues ao paciente, este painel tria, além dos genes não-síndrômicos, as síndromes de Usher, Pendred, Jervell e Lange-Nielsen, Branchio-Oto-Renal (BOR), Perrault e Waardenburg (SHEARER; SMITH, 2015).

É de extrema importância ressaltar que a utilização dos painéis não garante a identificação da causa genética da perda auditiva, assim como nos casos do *WES* e *WGS*. Isto ocorre devido à necessidade de melhor conhecer e compreender os mecanismos associados à perda auditiva, assim como identificar os genes que regulam ou medeiam o processo auditivo (BROWNSTEIN et al., 2011). Além destes fatores, é necessária cautela ao realizar o sequenciamento paralelo massivo, uma vez que este pode abranger achados incidentais e outras questões éticas que melhor necessitam ser discutidas.

1.5. Justificativa do trabalho

A heterogeneidade clínica e molecular da perda auditiva é notoriamente conhecida. Presente em mais de 5% da população mundial, pode ser causada tanto por fatores ambientais quanto genéticos, sendo este último responsável por, pelo menos, metade dos casos congênitos de perda auditiva. O conhecimento dos mecanismos moleculares envolvidos no processo auditivo é de fundamental importância para a elaboração de um diagnóstico conclusivo, assim como de novas estratégias e tratamentos. A identificação precoce e correta da perda auditiva é de extrema relevância, pois possibilita a realização de prognósticos determinantes, a identificação de riscos associados, a predição de desordens coexistentes, a prevenção do agravamento da perda auditiva, o aconselhamento genético com maior acurácia, permitindo maiores chances de reabilitação e alívio psicológico do sentimento de culpa que os pais possam sentir.

Até o momento, mais de 100 genes estão relacionados aos diversos tipos de perda auditiva (sindrômico e não-sindrômico), porém a estimativa é de que este número seja superior a 300 genes. Em busca da identificação de novos genes e variantes causadoras de perda auditiva, assim como a conclusão molecular de diagnósticos incompletos, esta tese utilizou plataformas de sequenciamento paralelo massivo, mais precisamente o sequenciamento completo do exoma (*WES*) e o painel de captura de 284 genes (*HEar-Seq v3*, Universidade de Tel Aviv/Israel) para analisar famílias brasileiras e do Oriente Médio em busca da identificação dos fatores genéticos, novos ou conhecidos, associados à perda auditiva.

1.6. Hipótese da tese

A hipótese desta tese repousa na afirmação que o uso de tecnologias de sequenciamento paralelo massivo, em especial o sequenciamento completo do exoma e o sequenciamento pelo painel *HEar-Seq v3*, podem esclarecer a etiologia de mais de 70% dos casos de perda auditiva estudados.

2. OBJETIVOS

Objetivo primário:

- Analisar indivíduos com suspeita de perda auditiva de origem genética com etiologia molecular desconhecida por meio de sequenciamento completo do exoma (*WES*) e painel de captura (*HEar-Seq, v3*) em busca de variantes genômicas, novas ou conhecidas, que possam esclarecer a causa do fenótipo.

Objetivos secundários:

- Caracterizar por ferramentas *in silico* e/ou funcionalmente a patogenicidade de variantes candidatas não relatadas previamente na literatura.
- Correlacionar os efeitos das variantes candidatas identificadas (genótipo) com o tipo de perda auditiva presente no indivíduo afetado (fenótipo).

3. CASUÍSTICA E MÉTODOS

3.1. Casuística

Esta tese foi desenvolvida no laboratório de genética molecular humana do Centro de Biologia molecular e Engenharia Genética (CBMEG) da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), em colaboração com o laboratório da prof. Karen B. Avraham, da Sackler Faculty of Medicine, na Universidade de Tel Aviv (Tel Aviv/Israel). Assim, tanto probandos e famílias brasileiras, quanto provenientes do Oriente Médio, compõem esta tese.

Cinco famílias provenientes da população brasileira foram analisadas por meio do sequenciamento completo do exoma (*WES*). Para facilitar compreensão, as famílias foram nomeadas com o prefixo “*Bra*”, seguidas de numeração específica. As amostras provenientes do laboratório da prof. Karen Avraham compreendem 20 famílias sequenciadas pelo painel de captura *HEar-Seq v3*, desenvolvido pelo seu grupo. Para melhor representação, as famílias provenientes do Oriente Médio foram nomeadas pelo prefixo “*Isr*”, seguido do número indicando a família.

Todos os probandos com perda auditiva analisados por meio da tecnologia de sequenciamento paralelo massivo apresentavam, como fator de inclusão: algum tipo e grau de perda auditiva, recorrente ou não na família, com suspeita de causa genética. Para isso, foram coletados o histórico familiar, como casos de recorrência de perda auditiva e consanguinidade, assim como o histórico médico, compreendendo as análises audiológicas indicando o tipo e grau da perda auditiva, a idade de início da perda, a evolução e simetria da perda auditiva, a utilização de aparelhos auditivos ou implante coclear, a presença de zumbido, a utilização de medicamentos, exposição ao barulho, alterações patológicas na orelha e outras observações clínicas relevantes, como alterações vestibulares. As famílias selecionadas para este estudo foram selecionadas de acordo com a maior informação clínica disponível.

Indivíduos com perda auditiva causada por fatores ambientais ou lesões na orelha externa e média, assim como indivíduos com diagnóstico molecular de perda auditiva concluídos, foram excluídos das análises utilizando tecnologias de sequenciamento paralelo massivo. Pacientes positivos para alguma variante possivelmente patogênica ou patogênica na triagem inicial da perda auditiva também foram excluídos.

Referente às amostras brasileiras, o trabalho foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa, da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas (Ref. 396/2006) (Anexo 01). Todos os indivíduos das famílias brasileiras analisadas assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) proveniente desta tese. Para a análise das famílias provenientes do Oriente Médio, o trabalho foi aprovado conforme os termos da Declaração de Helsinki da Universidade de Tel Aviv/Israel, do Ministério Israelense de Saúde e pelo Comitê de Assunto Humanos da Universidade de Belém/Cisjordânia, sob responsabilidade de prof. Karen B. Avraham.

3.2. Análise de famílias do Oriente Médio

Vinte famílias foram analisadas utilizando o painel de captura *HEar-Seq v3*. As famílias/probandos e seus países de origem ou etnia encontram-se descritos na tabela 10.

Tabela 10. Famílias do Oriente Médio estudadas por meio do painel de captura *HEar-Seq v3*.

Quantidade	Etnia/Origem	Famílias
1	Bielorrússia	<i>Isr06</i>
7	Judeu (etnia)	<i>Isr03, Isr08, Isr09, Isr10, Isr11, Isr12, Isr16</i>
4	Árabe (etnia)	<i>Isr02, Isr07, Isr13, Isr14</i>
1	Afegão	<i>Isr20</i>
1	Iraque	<i>Isr17</i>
1	Turquia/Síria	<i>Isr18</i>
1	Marrocos/Iêmen	<i>Isr19</i>
1	Irã	<i>Isr15</i>
1	Síria	<i>Isr05</i>
1	Rússia/Turquia/ Egito	<i>Isr01</i>
1	Irã/Iêmen	<i>Isr04</i>

3.2.1. Triagem inicial da perda auditiva

Todos indivíduos selecionados para o sequenciamento paralelo massivo com o painel *HEar-Seq* foram rastreados inicialmente quanto à presença de mutações

no gene *GJB2* por técnica de sequenciamento de Sanger. Somente foram selecionados para o sequenciamento massivo indivíduos que não apresentaram nenhuma variante patogênica no gene *GJB2* que explicasse o fenótipo de perda auditiva.

3.2.2. Painel de captura *HEar-Seq v3*

Para a análise das amostras provenientes do Oriente Médio, o grupo da prof. Karen B. Avraham desenvolveu um painel de captura denominado *HEar-Seq v3*. Embora o painel esteja na quarta versão, contando com 392 genes associados à perda auditiva, para este projeto utilizou a terceira versão do painel (*HEar-Seq v3*). Esta versão dispõe de 284 genes, sendo 118 genes codificantes de proteínas, três genes de miRNAs, além de 163 genes de camundongos ortólogos aos genes humanos associados à perda auditiva, síndrômica e não-síndrômica (tabela 11).

Tabela 11. Genes presentes no painel de captura *HEar-Seq v3*.

Genes								
<i>ABR</i>	<i>CDKN1B</i>	<i>DLX5</i>	<i>FZD3</i>	<i>HOXB1</i>	<i>MITF</i>	<i>OC90</i>	<i>SCARB2</i>	<i>TCF21</i>
<i>ACAN</i>	<i>CDKN2D</i>	<i>DMD</i>	<i>FZD6</i>	<i>IFT88</i>	<i>MKKS</i>	<i>OTOA</i>	<i>SCRIB</i>	<i>TCOF1</i>
<i>ACTB</i>	<i>CELSR1</i>	<i>DSPP</i>	<i>GATA3</i>	<i>IGF1</i>	<i>MOS</i>	<i>OTOF</i>	<i>SERPINB6</i>	<i>TECTA</i>
<i>ACTG1</i>	<i>CHD7</i>	<i>DVL1</i>	<i>GBX2</i>	<i>ILDR1</i>	<i>MPV17</i>	<i>OTOG</i>	<i>SIX1</i>	<i>TGFA</i>
<i>ALDH1A2</i>	<i>CHRNA9</i>	<i>DVL2</i>	<i>GF11</i>	<i>ITGA8</i>	<i>MSRB3</i>	<i>OTOP1</i>	<i>SIX5</i>	<i>TGFB2</i>
<i>ALMS1</i>	<i>CKB</i>	<i>DVL3</i>	<i>GJA1</i>	<i>JAG1</i>	<i>MSX2</i>	<i>OTOR</i>	<i>SLC12A2</i>	<i>THRA</i>
<i>AP3D1</i>	<i>CLDN11</i>	<i>EDN3</i>	<i>GJA1P1</i>	<i>JAG2</i>	<i>MTAP</i>	<i>OTX1</i>	<i>SLC12A6</i>	<i>THRB</i>
<i>APAF1</i>	<i>CLDN14</i>	<i>EDNRB</i>	<i>GJB1</i>	<i>KCNE1</i>	<i>MUTED</i>	<i>OTX2</i>	<i>SLC12A7</i>	<i>TIMM8A</i>
<i>AQP4</i>	<i>CLDN9</i>	<i>EPHB1</i>	<i>GJB2</i>	<i>KCNJ10</i>	<i>MYH14</i>	<i>PAX2</i>	<i>SLC17A8</i>	<i>TJP2</i>
<i>ATF2</i>	<i>CLIC5</i>	<i>EPHB2</i>	<i>GJB3</i>	<i>KCNMA1</i>	<i>MYH9</i>	<i>PAX3</i>	<i>SLC19A2</i>	<i>TMC1</i>
<i>ATOH1</i>	<i>CLNS1A</i>	<i>EPHB3</i>	<i>GJB4</i>	<i>KCNQ1</i>	<i>MYO15A</i>	<i>PCDH15</i>	<i>SLC1A3</i>	<i>TMIE</i>
<i>ATP2B2</i>	<i>CLRN1</i>	<i>ERBB4</i>	<i>GJB5</i>	<i>KCNQ4</i>	<i>MYO1A</i>	<i>PDZD7</i>	<i>SLC26A4</i>	<i>TMPRSS3</i>
<i>ATP6V1B1</i>	<i>COCH</i>	<i>ERCC1</i>	<i>GJB6</i>	<i>KIT</i>	<i>MYO1C</i>	<i>PHEX</i>	<i>SLC26A5</i>	<i>TMPRSS5</i>
<i>ATP8B1</i>	<i>COL11A1</i>	<i>ERCC2</i>	<i>GLI3</i>	<i>KITLG</i>	<i>MYO1F</i>	<i>PLDN</i>	<i>SLC30A4</i>	<i>TNFRSF11B</i>
<i>AXIN1</i>	<i>COL11A2</i>	<i>ERCC3</i>	<i>GPR98</i>	<i>LAMA2</i>	<i>MYO3A</i>	<i>PMP22</i>	<i>SLC4A11</i>	<i>TPRN</i>
<i>BARHL1</i>	<i>COL2A1</i>	<i>ERCC4</i>	<i>GPSM2</i>	<i>LARGE</i>	<i>MYO6</i>	<i>PNOC</i>	<i>SLC4A7</i>	<i>TRIOBP</i>
<i>BBS1</i>	<i>COL4A3</i>	<i>ERCC5</i>	<i>GPX1</i>	<i>LFNG</i>	<i>MYO7A</i>	<i>POLH</i>	<i>SLC9A1</i>	<i>TRPV4</i>
<i>BBS4</i>	<i>COL4A4</i>	<i>ESPN</i>	<i>GRHL2</i>	<i>LHFPL5</i>	<i>NAV2</i>	<i>POU1F1</i>	<i>SMS</i>	<i>TSHR</i>
<i>BCR</i>	<i>COL4A5</i>	<i>ESR2</i>	<i>GRID1</i>	<i>LHX3</i>	<i>NDP</i>	<i>POU3F4</i>	<i>SNAI2</i>	<i>TUB</i>
<i>BCS1L</i>	<i>COL9A1</i>	<i>ESRRB</i>	<i>GRXCR1</i>	<i>LMO4</i>	<i>NEU1</i>	<i>POU4F3</i>	<i>SOBP</i>	<i>TYRP1</i>
<i>BDNF</i>	<i>COL9A3</i>	<i>EYA1</i>	<i>GSTM1</i>	<i>LMX1A</i>	<i>NEUROD1</i>	<i>PROP1</i>	<i>SOD1</i>	<i>UCN</i>

<i>BMP4</i>	<i>CPLX1</i>	<i>EYA4</i>	<i>GSTP1</i>	<i>LOXHD1</i>	<i>NEUROG1</i>	<i>PRPS1</i>	<i>SOX10</i>	<i>USH1C</i>
<i>BSN</i>	<i>CRYM</i>	<i>FABP4</i>	<i>GSTT1</i>	<i>LRIG3</i>	<i>NF1</i>	<i>PRRX1</i>	<i>SOX2</i>	<i>USH1G</i>
<i>BSND</i>	<i>DDB2</i>	<i>FAS</i>	<i>GUSB</i>	<i>LRP2</i>	<i>NOTCH1</i>	<i>PRRX2</i>	<i>SOX9</i>	<i>USH2A</i>
<i>C19orf46</i>	<i>DDR1</i>	<i>FBXO2</i>	<i>HAL</i>	<i>LRTOMT</i>	<i>NOX3</i>	<i>PTK7</i>	<i>SPINK5</i>	<i>VANGL2</i>
<i>CACNA1D</i>	<i>DFNA5</i>	<i>FGF3</i>	<i>HES1</i>	<i>MAFB</i>	<i>NOXO1</i>	<i>PTPRQ</i>	<i>SPRY2</i>	<i>WFS1</i>
<i>CACNB2</i>	<i>DFNB31</i>	<i>FGFR1</i>	<i>HES5</i>	<i>MAP1A</i>	<i>NR2F1</i>	<i>RARA</i>	<i>ST3GAL5</i>	<i>XPA</i>
<i>CACNG2</i>	<i>DFNB59</i>	<i>FGFR2</i>	<i>HGF</i>	<i>MARVELD2</i>	<i>NR4A3</i>	<i>RARB</i>	<i>STRC</i>	<i>XPC</i>
<i>CASP3</i>	<i>DIAPH1</i>	<i>FGFR3</i>	<i>HMX2</i>	<i>MCOLN3</i>	<i>NTF3</i>	<i>RARG</i>	<i>SYNJ2</i>	
<i>CATSPER2</i>	<i>DIO2</i>	<i>FIGN</i>	<i>HMX3</i>	<i>MIR182</i>	<i>NTN1</i>	<i>RASA1</i>	<i>TBL1X</i>	
<i>CCDC50</i>	<i>DIO3</i>	<i>FOXP1</i>	<i>HOXA1</i>	<i>MIR183</i>	<i>NTRK2</i>	<i>RDX</i>	<i>TBX1</i>	
<i>CDH23</i>	<i>DLX2</i>	<i>FOX11</i>	<i>HOXA2</i>	<i>MIR96</i>	<i>NTRK3</i>	<i>S1PR2</i>	<i>TBX10</i>	

Genes em preto: Genes de humanos.

Genes em vermelho: Genes de camundongos ortólogos aos genes humanos.

Este painel foi customizado utilizando o sistema de captura e enriquecimento *Agilent SureSelect* (Agilent Technologies, EUA), sendo planejado para capturar não apenas os éxons destes 284 genes, mas também suas regiões flanqueadoras. Assim sendo, 40 pb intrônicos *upstream* e *downstream* de cada éxon também foram sequenciados em busca de variantes em regiões de sítio de *splicing*. A sequência dos éxons sequenciados baseou-se nos bancos de dados *NIH* (RefSeq) e *UCSC*, utilizando o *UCSC Genome Browser*.

3.2.3. Preparo de biblioteca enriquecida e sequenciamento massivo utilizando *HEar-Seq v3*

O DNA extraído, pelo método de lise alcalina, teve sua pureza e concentração mensurados pelo *Nanodrop*[®] 8000 (Thermo Fisher Scientific, EUA). As amostras selecionadas para o sequenciamento paralelo massivo utilizando o painel de captura apresentaram razão $A_{260/280}$ entre 1.8 e 2.0, indicando pureza mínima para continuidade dos experimentos.

A quantidade de 3 µg de DNA genômico foi adicionada ao tampão 1X *TE* (Tris-HCl 10 mM; EDTA 1 mM, pH 8,0), com volume final de 130 µL. Em seguida, as amostras sofreram cisalhamento mecânico, gerando fragmentos de 150-200 pb. Para verificação do tamanho dos fragmentos desta etapa e demais etapas do preparo da biblioteca, foi utilizado o *Bioanalyzer 2100* (Agilent Technologies, EUA). Os adaptadores, assim como terminadores, foram adicionados aos fragmentos, seguidos da amplificação da biblioteca e análise do tamanho do fragmento, agora com

tamanhos entre 250-275 pb. Para hibridação, foram utilizadas sondas de RNA biotilado (cRNA), permitindo posterior recuperação das sondas ligadas aos fragmentos de DNA por meio do uso de esferas magnéticas revestidas com estreptavidina (*Dynabeads MyOne Streptavidin T1*). O uso da estante magnética, procedidas de lavagens com *SureSelect Binding Buffer/SureSelect Wash 1/SureSelect Wash 2*, possibilitou a captura da biblioteca (ERNANI; LEPROUST, 2016).

Do material capturado, 14 μ L foram adicionados a 35 μ L do *Herculase II Master Mix* e 1 μ L do *PCR Primer Index*, fornecido no *kit SureSelect Library Prep*. Após adição do *index* e amplificação dos fragmentos, foram utilizadas as esperas *Agencourt AMPure XP* para purificação dos fragmentos, verificando o tamanho dos fragmentos entre 300 e 400 pb. A adição de cada *index* foi verificada por *qPCR* (do inglês *quantitative PCR*), utilizando o *kit qPCR NGS Library Quantification*. O *pool* das amostras para a realização do sequenciamento paralelo massivo foi realizado em seguida, no qual as bibliotecas apresentaram quantidades equimolares. Após o preparo da biblioteca, assim como enriquecimento da captura, os éxons dos 284 genes das amostras foram sequenciados simultaneamente utilizando o sequenciador *Illumina Genome Analyzer IIx* (Illumina, EUA). Para o sequenciamento paralelo massivo, foi adotada a estratégia *paired-end*, com fragmentos de 101 pb (2x101 pb).

Todas etapas de preparo de biblioteca (figura 22) e sequenciamento já haviam sido realizadas previamente pelo laboratório da prof. Karen B. Avraham.

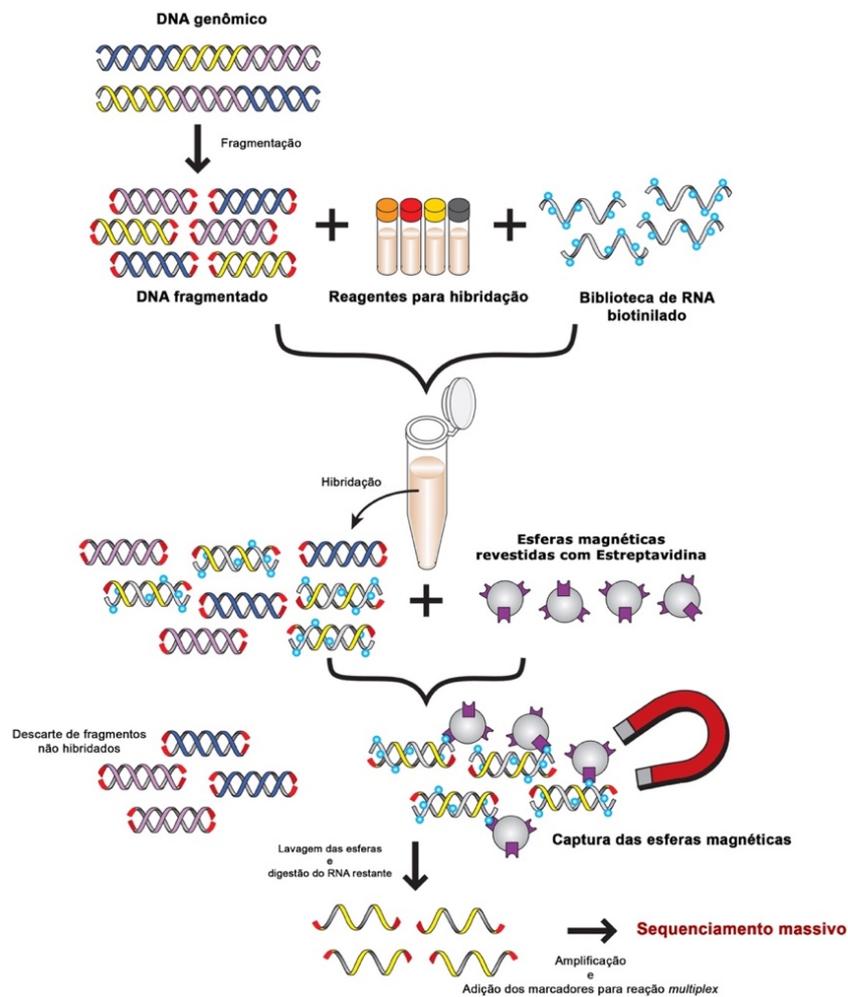


Figura 22. Representação da etapa de captura e enriquecimento dos fragmentos utilizando *kit Agilent SureSelect* (Agilent Technologies, EUA) (Modificado de ERNANI; LEPROUST, 2016).

3.2.4. Análise bioinformática

As análises de bioinformática das amostras provenientes do laboratório da prof. Karen B. Avraham foram realizadas em colaboração com o grupo do Dr. Noam Shomron, do Departamento Celular e Desenvolvimento Biológico, da Sackler Faculty of Medicine, na Universidade de Tel Aviv (Tel Aviv/Israel). Todos os dados brutos oriundos do sequenciamento paralelo massivo no formato *FastaQ* foram analisados por *pipeline* própria do grupo de pesquisa, alinhando os *reads* provenientes do sequenciamento com o genoma humano de referência *GRCh37*, também conhecido por *hg19*, pela ferramenta *BWA*. Ferramentas como *Picard tools* (Broad Institute Inc., EUA), *SamTools* (LI et al., 2009) e *GATK* (DEPRISTO et al., 2011; VAN DER AUWERA et al., 2013), foram utilizadas para o processamento pós-alinhamento,

assim como para análise das variantes. A anotação das variantes foi realizado pela ferramenta *ANNOVAR* (CHANG; WANG, 2012).

3.2.5. Priorização das variantes

O grupo do Dr. Noam Shomron desenvolveu não apenas uma *pipeline* para análises bioinformáticas, mas também um algoritmo para priorização das variantes candidatas. Uma nova variável, denominada *delScore*, foi adicionada aos resultados das anotações das variantes. Esta compreendia na análise unificada dos resultados *in silico* referentes à frequência da variante, função da proteína e regiões conservadas da proteína afetada pela variante. Assim sendo, era gerado uma escala com pontuação, sendo zero para “variante não candidata/não patogênica” e dez para “variante altamente candidata/patogênica”.

A priorização das variantes candidatas foi realizada em três etapas. A primeira consistia na exclusão das variantes presentes em regiões de *UTRs*, *upstream*, *downstream*, intergênicas, intrônicas e *ncRNA*, além das variantes sinônimas e das que não alteravam da matriz da leitura da sequência (*non-frameshift*). A segunda exclusão correspondia a todas variantes classificadas como polimorfismos (frequência maior que 1%). A última exclusão se deu pelas variantes com baixo valor de *delScore*. Do resultado das filtragens, as variantes restantes foram analisadas individualmente de acordo com o fenótipo da perda auditiva, levando em consideração a frequência desta na população, resultados de predições *in silico* como patogênica, mutações já descritas como causadoras de perda auditiva e função/expressão da proteína.

Cada família apresentou, em média, 10 a 15 variantes candidatas que foram priorizadas de acordo com achados presentes na literatura científica, como artigos científicos e banco de dados.

3.2.6. Validação das variantes candidatas

Todas as variantes candidatas identificadas pelo painel *HEar-Seq v3* foram validadas e confirmadas por sequenciamento de Sanger. Para isso, *primers* foram customizados objetivando sequenciar o éxon completo onde a variante se encontrava

(tabela 12). Tanto o *primer sense (forward)*, quanto o *antisense (reverse)*, foram diluídos da solução estoque para 10 μ M e o fragmento foi amplificado por uma reação padrão de *PCR* com gradiente de ciclagem, denominada *TouchDown*. A desnaturação inicial correspondia a 95°C por 5 minutos, seguido de 35 ciclos: desnaturação a 95°C por um minuto; pareamento por um minuto com *Tm* variando entre 60°C e 55°C (decrecendo de 1°C/ciclo) e extensão a 72°C por um minuto. Cinco minutos de extensão final a 72°C finalizavam a reação de *PCR*. Os *amplicons* foram visualizados em gel de agarose 1%, corados com Brometo de Etídeo.

Para desenho dos primers utilizados, utilizou-se a ferramenta *online Primer3* (UNTERGASSER et al., 2012).

Tabela 12. Primers utilizados para validar/confirmar variantes candidatas identificadas com o painel *HEar-Seq v3* em famílias do Oriente Médio.

Família	Gene	Primers 5'>3'	Tamanho do fragmento
<i>Isr01</i>	<i>SLC26A4</i>	4aF- CTGAATGCATATTGCTTTTGC 4aR- AAACCGCAATTACTTTTGCAC	343 pb
		5F- AAACCCTATGCAGACACATTGA REM5R- CATTACCTGTATAATTCCAACCAGaAG	262 pb
<i>Isr02</i>	<i>USH2A</i>	49F- AGTAATATGGTCTCAGATCTTCT 49R- TGGTTCAATTTTTGTTGAGAGG	400 pb
<i>Isr03</i>	<i>GATA3</i>	3aF- GGACCCATCGCTGTCCAC 3aR- GGCTCCTACCTGTGCTGGA	299 pb
<i>Isr04</i>	<i>CELSR1</i>	3F- TCCTCTCTGGCATCTTCCTC 3R- TCCTAAAGAGACCCCCGTGT	297 pb
		3F- TGGTTGACTTTTTGTTGCTGA 3R- GGGTGGGAAGTAGAAAAGGA	250 pb
	<i>SLC12A6</i>	2cDNAF- ACCCAGTGACCGGACTTCT 6cDNAR- CCCATGAAGGTACCCATTTG	339 pb
		Cloning_F- ATGAGTGAGATGTCTGGGGC Cloning_R- TTATGAATAAATGGTGATCA	3276 pb
	<i>LRP2</i>	4F- AGGATGTGCTCAGAAAAATGC 4R- GGGGCTAGAACCACTCCTTC	250 pb
	<i>MAP1A</i>	4aF- GATCGAGCTCTGGCTCTGG 4aR- CCAGCTCTCCAGACTCCTGT	274 pb
	<i>NOTCH1</i>	11F- CAGGTCTGGTCATGGGTGTC 11R- ACGTGTCCGGTCAGTCCTCA	375 pb
<i>Isr05</i>	<i>OTOF</i>	34aF- CCTTCCTGCTCTGCTCATT 34REMR- CCTAGAAGGGTCTGCTCCTAGGCTgTC	217 pb
		int_41F- GCTGCTAACCAGCCTTCTCT int_42R- CTTCCCTCTGCCTCCTCTC	213 pb
<i>Isr06</i>	<i>MYO6</i>	14F- GCCTTCAACAAGAGATCTGAAAA 14R- CAAAGTCATTCCGGTTGAAA	256 pb
<i>Isr07</i>	<i>USH2A</i>	18F- CCAGCACTCTTTAACTGACCTG 18R- TGCTTTTCAAATGTACTTTCACAG	461 pb
<i>Isr08/ Isr09</i>	<i>STRC</i>	21F- TTCCCCTTCCTTTTCCTCAC 21R- CATATCCTTTGCCCTCTTTGG	248 pb

Isr11	<i>DFNB59</i>	2F- CAATGCTTAATTTTGTGCCTGA 2R- TGACCTATGTTTAGGTTGCCAAT	359 pb
Isr12	<i>USH1C</i>	19F-ACCCCACCATGACCTCAC 19R-GTAGCCCTGGTCTGCTCCTC	220 pb
	<i>USH2A</i>	17F- TCACCAACTTGTGAAATGTAACCTT 17R- GATTCTCATTTCATGTCTTGACCA	599 pb
Isr13	<i>CDH23</i>	69F- GGTTTCAGCCACATAGCCAGT 69R- CTGTCCCTGCCCTTGCTC	495 pb
		57F- GGGGCCAGACAGAGCTAGT 57R- CTGTTGTTGCCAATGTCTGC	513 pb
Isr14	<i>GJB2</i>	2F- TGCTTGCTTACCCAGACTCA 2R- CCTCATCCCTCTCATGCTGT	837 pb
	<i>KCNQ4</i>	6F- CCAGGAGAGGGAGAATCCAT 6R- TAAGAGGCTGCAAGGGTGTC	395 pb
Isr15	<i>CEACAM16</i>	5F- CCAACCTCCACTCCTCCT 5R- ACCTTCGCAGCCTGATGA	400 pb
Isr16	<i>MYO7A</i>	39F- CAGGCCCTGTGGGAAGTG 39R- GTAAGAGCTGCCCGTCACAG	300 pb
	<i>MYO7B</i>	12F- GATGGCTGGTGATCCTATGG 12R- AGTTTCCCAGCCTCCAAGAG	371 pb
Isr17	<i>PCDH15</i>	4REmodF- GCTAGGGGAGGACCACCAGCTACCA ^{cA} 4RER- TGAATTTCCAGAGACTGGCATA	221 pb
Isr18	<i>DMD</i>	53F- TGTCTCCTCCAGACTAGCATTT 53R- TTTTCAGCTTTAACGTGATTTTCTG	391 pb
Isr19	<i>COL11A2</i>	8F- TCCAGGGTAAGCCTCCTCTC 8R- GCTCCCACTGGTAGTCAAGAA	293 pb
	<i>COL11A2</i>	RE46FMod- ACCCTGCAGGGGAGCAGATGGGGAG ^{tC} RE46R- ACAGTCCCCTCCCCTCAGAC	245 pb
Isr20	<i>LRP2</i>	56F- TCCAGGATTCACTGATGTCAA 56R- CCATGGAAGTTTCTCCTCGTGT	388 pb
	<i>FGFR1</i>	5F- GAGGGTGTCCGTGTTTCATCT 5R- TCTTAAACCCAATGCCAAGA	237 pb

*Nucleotídeos marcados em vermelho correspondem às alterações da sequência normal objetivando a criação do sítio de restrição de endonucleases.

Os fragmentos de *PCR* foram purificados utilizando o *kit RBC HiYield™ Gel/PCR DNA Fragments Extraction* (Real Biotech Corporation, Taiwan), seguindo recomendações do fabricante. As amostras foram preparadas para o sequenciamento, sendo necessários 10 ng de *amplicons* para cada 100 pb de sequenciamento, em um volume final de 16 μ L, além de 1 μ L do *primer* (10 μ M). As purificações da reação para sequenciamento, assim como o sequenciamento, foram realizadas no Centro de Serviço e Instrumentação da Faculdade de Ciências da Vida George S. Wise, Universidade de Tel Aviv (Israel), utilizando o sequenciador *ABI Prism 377 DNA* e o *kit ABI Prism BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction* (Thermo Fisher Scientific, EUA). Os picos dos eletroferogramas resultantes do sequenciamento de Sanger foram alinhados com a sequência normal referente ao fragmento, extraídas do banco de dados público *UCSC*, por meio da ferramenta *Benchling* (Benchling Inc., EUA).

3.3. Análise de famílias Brasileiras

3.3.1. Coleta e extração de material genético

A extração de DNA genômico foi realizada a partir de leucócitos obtidos em 10 mL de sangue periférico, coletado em tubos *Vacutainer* contendo 10% do anticoagulante EDTA (ácido etilenodiamino tetra-acético dissódico 2H₂O/0,5 M/pH 8,0). Empregou-se o método de extração com fenol-clorofórmio, padronizado no Laboratório de Genética Molecular Humana do Centro de Biologia Molecular e Engenharia Genética (CBMEG) da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP).

3.3.2. Qualidade e concentração de DNA extraído

O DNA extraído das amostras teve a pureza e concentração verificados por meio do *Nanodrop*[®] 8000 (Thermo Fisher Scientific, EUA) e *Qubit*[®] 2.0 *Fluoremeter* (Invitrogen, EUA), respectivamente. Para verificar a pureza, foram utilizados 6 µL de cada amostra (em triplicatas, sendo 2 µL para cada análise). Amostras consideradas aptas à continuidade do experimento apresentaram valores da razão $A_{260/280}$ entre 1,8 e 2. Para verificação da concentração das amostras foi utilizado o fluorímetro *Qubit*[®] 2.0 e o kit *Qubit*[®] *Assay Kit dsDNA Broad Range Assay* (Invitrogen, EUA).

3.3.3. Triagem primária para perda auditiva

Todos os pacientes encaminhados para o laboratório de genética molecular humana do CBMEG foram submetidos à triagem molecular primária. Esta consistiu na análise completa da região codificante do gene *GJB2* por sequenciamento de Sanger, assim como da triagem das duas principais grandes deleções do gene *GJB6* (*GJB6-D13S1830* e *GJB6-D13S1854*) por *PCR multiplex* e a análise da mutação mitocondrial m.A1555G, no gene *MTRNR1*, por *RFLP-PCR* utilizando a endonuclease *BsmAI* (New England Biolabs, EUA) (MARTINS, 2013).

3.3.4. Preparo de biblioteca enriquecida e sequenciamento completo do exoma (WES)

Para o sequenciamento das famílias brasileiras por meio do sequenciamento paralelo massivo, utilizou-se o sequenciamento completo do exoma (WES), utilizando o *kit Nextera Rapid Capture Expanded Exome* (Illumina, EUA) para o preparo da biblioteca e o sequenciador *Illumina HiSeq 2500* (Illumina, EUA). A combinação das estratégias adotadas permitiu o sequenciamento de 201.121 éxons, *UTR* e *miRNA*, com cobertura superior a 90% de todo genoma humano. O volume inicial foi de 50 ng de DNA de cada amostra e um tempo de corrida de um dia e meio, gerando 62 Mb de dados (ILLUMINA, 2015).

Utilizando a quantidade inicial de 50 ng de DNA genômico, o material genético foi tagmentado por transposomas, seguindo do processo de purificação utilizando esferas para purificação e álcool etílico 80%. O comprimento dos fragmentos purificados foi checado utilizando *2100 Bioanalyzer system* e o kit *DNA 1000* (Agilent Technologies, EUA), variando entre 150 pb e 1 kb. Estes fragmentos genômicos foram amplificados utilizando o *Nextera Library Amplification mix* e *Index primers 1 e 2* (Illumina, EUA). Ao término, os fragmentos foram purificados pelas esferas de purificação, tendo o comprimento analisado novamente (300 pb).

Na primeira hibridação ocorreu a adição dos *index 1 e 2*. Para isto, foram utilizados os reagentes de hibridação e os *primers* para amplificação expandida do exoma. A quantidade de 500 ng de cada biblioteca genômica foi misturada para elaboração do *pool* com volume final de 40 μ L, seguindo para a amplificação dos fragmentos das amostras. O *kit* permite o *pool* de até 12 amostras diferentes. No nosso estudo das famílias brasileiras, foi realizado o *pool* de apenas 9 famílias, permitindo assim melhor profundidade no sequenciamento. Em seguida, esferas magnéticas revestidas com estreptavidina foram adicionadas ao *pool* genômico, permitindo a captura dos fragmentos marcados com sondas biotiniladas por meio do uso de estantes magnéticas. Isto possibilitou a purificação e eluição apenas dos fragmentos desejados para o sequenciamento paralelo massivo. Uma segunda hibridação sucedeu este ponto, seguida de uma nova purificação utilizando esferas magnéticas revestidas com estreptavidina e eluição dos fragmentos do *pool*.

Após as duas reações utilizando os *primers* para a captura do exoma expandido, uma nova purificação foi realizada com as esferas para purificação e álcool

etílico 80%, sendo as amostras diluídas e ressuspendidas. A última amplificação do *pool* foi realizada utilizando o *Nextera Enrichment Amplification mix* e o *PCR primer cocktail* (Illumina, EUA). Após uma nova purificação, os fragmentos tiveram o tamanho checados novamente utilizando o *2100 Bioanalyzer system* com o kit *DNA 1000* (Agilent Technologies, EUA), apresentando o comprimento de 300 pb.

Todo processo descrito acima neste tópico foi realizado seguindo as recomendações da fabricante do *kit Nextera Rapid Capture Expanded Exome* (figura 23) (Illumina, EUA). O mesmo se sucedeu para a checagem do tamanho dos fragmentos utilizando o *2100 Bioanalyzer system* com o kit *DNA 1000* (Agilent Technologies, EUA).

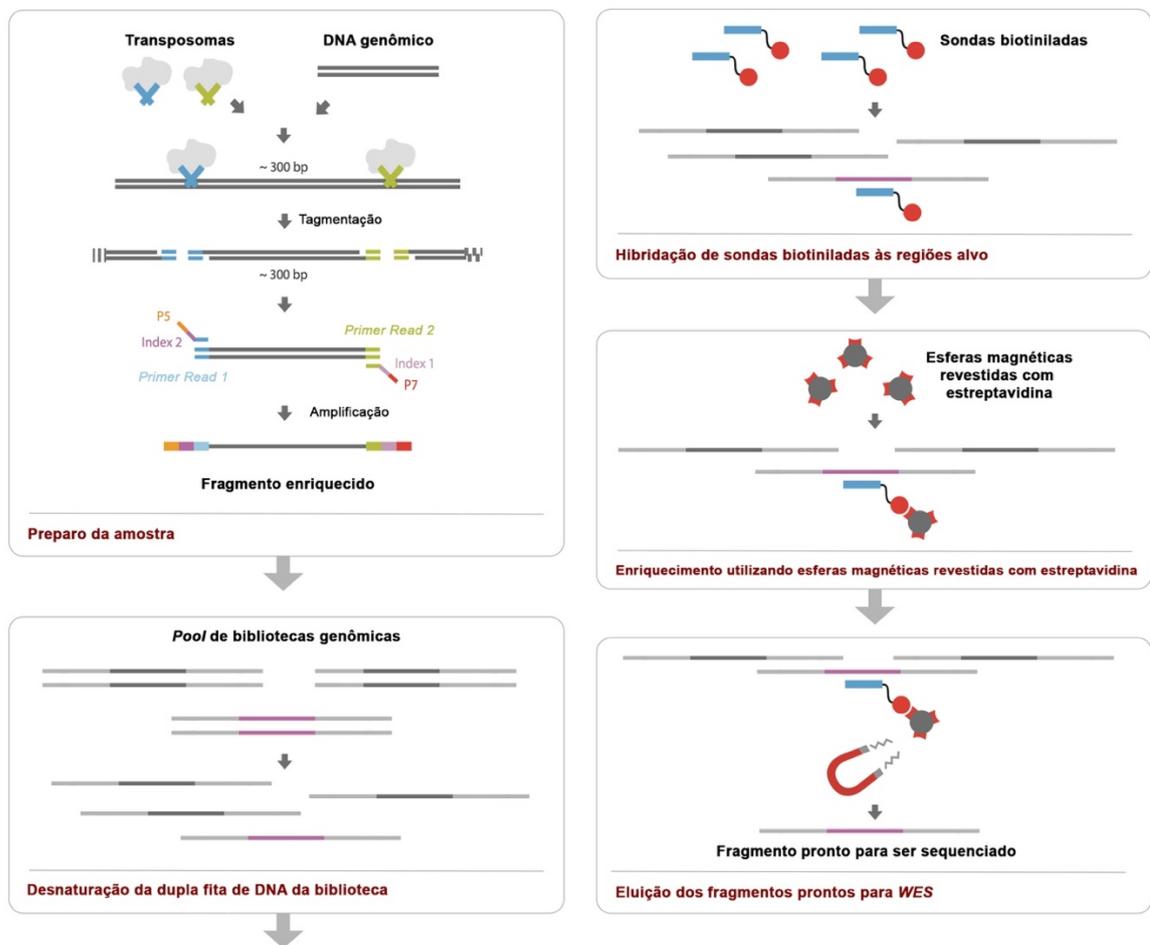


Figura 23. Representação gráfica do preparo e enriquecimento da biblioteca genômica utilizando o *kit Nextera Rapid Captura Expanded Exome* (Illumina, EUA) (Modificado de ILLUMINA 2015).

Com o *pool* das nove bibliotecas genômicas, as amostras foram enviadas para o sequenciamento paralelo massivo, *paired-end* (2x100 pb), utilizando o

sequenciador *Illumina HiSeq 2500* (Illumina, EUA) do Laboratório Central de Tecnologias de Alto Desempenho em Ciências da Vida (LaCTAD), da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP).

3.3.5. Análise bioinformática

Para análise bioinformática dos dados de *WES* das famílias brasileiras, uma *pipeline* foi desenvolvida em nosso laboratório para a análise das variantes. Os dados brutos gerados pelo *Illumina HiSeq 2500* foram concatenados, passando pelo controle de qualidade pela ferramenta *FastQC* (VAN DER AUWERA et al., 2013). Os *reads* que apresentavam no mínimo 90% do comprimento com pontuação *Phred* superior à Q20 foram alinhados, pelo *BWA*, com a versão mais recente do genoma humano de referência, o hg38 ou GRCh38. O processamento pós-alinhamento e a análise das variantes foram realizados de forma similar ao do grupo do Dr. Noam Shomron (item 3.2.4), utilizando ferramentas como *Picard tools* (Broad Institute Inc., EUA), *SamTools* (LI et al., 2009) e *GATK* (DEPRISTO et al., 2011; VAN DER AUWERA et al., 2013). A anotação das variantes foi realizado pela ferramenta *wANNOVAR* (CHANG; WANG, 2012).

3.3.6. Priorização das variantes

A priorização das variantes candidatas provenientes do *WES* das famílias brasileiras foi realizada em duas etapas. A primeira consistia na exclusão das variantes presentes em regiões de *UTRs*, *upstream*, *downstream*, intergênicas, intrônicas e *ncRNA*, além das variantes sinônimas e das que não alteravam a matriz da leitura da sequência (*non-frameshift*). A segunda exclusão correspondia a todas variantes classificadas como polimorfismos (frequência maior a 1%). Do resultado das filtragens, as variantes restantes foram analisadas individualmente de acordo com o fenótipo da perda auditiva, levando em consideração a frequência desta na população, resultados de predições *in silico* como patogênica, mutações já descritas como causadoras de perda auditiva e função/expressão da proteína. Cada família apresentou, em média, 10 a 15 variantes candidatas que foram priorizadas de acordo

com achados presentes na literatura científica, como artigos científicos e banco de dados.

3.3.7. Validação das variantes candidatas

As variantes identificadas pelo sequenciamento completo do exoma como candidatas foram validadas e confirmadas por sequenciamento de Sanger. Para isso, *primers* foram customizados (tabela 13). Tanto o *primer sense*, quanto o *antisense*, foram diluídos da solução estoque para 10 μ M e o fragmento foi amplificado por uma reação padrão de *PCR*, variando apenas a *Tm*. A desnaturação inicial correspondia a 95°C por 5 minutos, seguido de 30 ciclos: desnaturação a 95°C por um minuto; pareamento por um minuto com *Tm* variável e extensão a 72°C por um minuto/kb. Cinco minutos de extensão final a 72°C finalizavam a reação de *PCR*. Os *amplicons* foram visualizados em gel de agarose 1%, corados com Brometo de Etídeo.

Para desenho dos primers utilizados, utilizou-se a ferramenta *online Primer3* (UNTERGASSER et al., 2012).

Tabela 13. *Primers* utilizados para validar/confirmar variantes candidatas identificadas com o sequenciamento completo do exoma em famílias Brasileiras.

Família	Gene	Primers 5'>3'	Tamanho do fragmento
Bra01	<i>MYH9</i>	17F- TCTTGCCCTGTCAGGTTTCAT 17R- GTCGCTCCCTCACGACAG	321pb
Bra02	<i>GATA3</i>	6F- GAGACAGGAGAAGGTGGGAG 6R- CTCTAACCCATGGCGGTGA	446pb

A reação de sequenciamento foi realizada utilizando o *kit BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing* (Thermo Fisher Scientific, EUA). A purificação desta reação foi realizada por meio do protocolo de EDTA/Etanol, tendo as amostras sequenciadas pelo sequenciador *3730xl DNA Analyzer* (Thermo Fisher Scientific, EUA), do Laboratório Central de Tecnologias de Alto Desempenho em Ciências da Vida (LaCTAD/UNICAMP). Os picos dos eletroferogramas resultantes do sequenciamento de Sanger foram alinhados com a sequência normal referente ao fragmento, extraídas do banco de dados público *UCSC*, por meio da ferramenta *Benchling* (Benchling Inc., EUA).

3.4. Análise de segregação familiar das variantes candidatas

A análise de segregação das variantes candidatas foi idêntica tanto para famílias analisadas pelo painel *HEar-Seq v3*, quanto pelo *WES*. Ela consistiu na verificação, por sequenciamento de Sanger, da variante candidata (conhecida ou nova) em indivíduos com e sem perda auditiva da mesma família. Todos os indivíduos que aceitaram participar do estudo e assinaram o TCLE foram marcados nos heredogramas com um asterisco. As reações obedeceram aos mesmos padrões utilizados na validação das variantes candidatas (itens 3.2.6 e 3.3.7).

3.5. Análise de frequência da variante na população

As variantes identificadas na família brasileira tiveram a sua análise de frequência realizadas utilizando dois repositórios públicos de *WES* da população brasileira: o BIPMed e o ABraOM. O BIPMed (do inglês *Brazilian Initiative on Precision Medicine*), disponível no link <http://bipmed.iqm.unicamp.br/genes>, apresenta o sequenciamento completo e variantes anotadas de 106 indivíduos. Já o ABraOM (Arquivo Brasileiro Online de Mutações), disponível pelo link <http://abraom.ib.usp.br/index.php>, apresenta o resultado do sequenciamento completo do exoma de 609 indivíduos idosos saudáveis da cidade de São Paulo (NASLAVSKY et al., 2017).

As famílias provenientes do Oriente Médio tiveram as variantes candidatas (novas ou conhecidas) checadas de acordo com a população estudada. Assim, a variante candidata teve frequência analisada em 150 indivíduos da mesma etnia da família com a variante, além de 150 indivíduos de diferentes grupos étnicos e 150 indivíduos com perda auditiva de etiologia desconhecida, totalizando 450 indivíduos analisados. Esta análise foi realizada, preferencialmente, por *RFLP-PCR* (do inglês *Restriction Fragment Length Polymorphism - PCR*). Os *amplicons* foram digeridos com endonucleases específicas (tabela 14) que permitiram a genotipagem dos indivíduos devido a exclusividade do sítio de restrição criado ou extinto pela variante, quando comparada à sequência normal. O mix da *RFLP-PCR* foi otimizado, utilizando 17,5 µL de produto de *PCR*, 2 µL do tampão indicado para a endonuclease e 0,5 µL de endonuclease. As condições das reações, assim como a temperatura ideal e a inativação da enzima obedeceram às recomendações sugeridas pela fabricante. Os

resultados foram visualizados em gel de agarose 2%, corados com Brometo de Etídeo. No caso de detecção de algum indivíduo controle com a variante, o mesmo foi submetido ao sequenciamento de Sanger para validação do resultado (item 3.2.6).

Tabela 14. Endonucleases utilizadas para análise em larga escala da frequência da variante candidata.

Família	Gene	Endonuclease
<i>Isr01</i>	<i>SLC26A4</i>	<i>EAM1104I</i>
<i>Isr02</i>	<i>USH2A</i>	<i>BsII</i>
<i>Isr03</i>	<i>SLC12A6</i>	<i>EcoRV</i>
<i>Isr05</i>	<i>OTOF</i>	<i>HincII</i>
<i>Isr06</i>	<i>MYO6</i>	<i>MfeI</i>
<i>Isr17</i>	<i>GATA3</i>	<i>PvuII</i>
<i>Isr18</i>	<i>DMD</i>	<i>BsrBI</i>

As variantes candidatas identificadas tanto pelo *HEar-Seq v3* quanto pelo *WES* também tiveram a frequência checada em três repositórios mundiais de sequenciamento paralelo massivo: *ExAC*, repositório com o sequenciamento completo do exoma de 60.706 indivíduos não relacionados (LEK et al., 2016); *1000 Genomes*, que dispõe de 2.504 genomas humanos (SUDMANT et al., 2015) e *Exome Variation Server*, contendo 6.503 *WES* (EVS, 2017).

3.6. Teste de paternidade

Para a família *Bra02* foi realizado o teste de paternidade para confirmar se a variante candidata identificada tratava-se de uma mutação *de novo*. Para isso, foram selecionados nove marcadores polimórficos (*STR*, do inglês *Short Tandem Repeats*) presentes no *CODIS* (do inglês *Combined DNA Index System*), tendo seus *primers* customizados para a análise (tabela 15). A reação de *PCR* foi realizada de acordo com a reação padrão (item 3.3.7), porém os fragmentos foram visualizados em gel de agarose 1000 ultrapura a 5% (Thermo Fisher Scientific, EUA) para melhor resolução e separação das bandas. Todos os fragmentos foram cortados do gel, identificados e purificados pelo *kit Wizard SV gel and PCR clean-up system* (Promega, EUA). Os fragmentos foram submetidos ao sequenciamento de Sanger utilizando o mesmo *kit* e equipamento contido no item 3.3.7. A análise dos marcadores foi realizada manualmente, com auxílio da ferramenta *Benchling* (Benchling Inc., EUA).

Tabela 15. Marcadores polimórficos (*STR*) e seus respectivos *primers* utilizados para analisar paternidade.

Marcador	Primer forward (5'>3')	Primer reverse (5'>3')	T _m (°C)	Fragmento (pb)
<i>D8S1179</i>	CTTGGGGTGTGCGCTTTTCT	TGCATTGTTGTTGGGAATGT	60	396
<i>D3S1358</i>	AGCTATTCCCAGGTGAGGAC	TGAGATGGGAGGATCACTTG	58	466
<i>D5S818</i>	CCCATCTGGATAGTGGACCT	TTTTAAAATTAATACTGAGACATGC	58	374
<i>D7S820</i>	CGATTCCACATTTATCCTCA	AGTGCAGTGGTGCGATCT	57	393
<i>D18S51</i>	CAAAAATTAGTTGGGCATGG	CCGACTACCAGCAACAACAC	58	400
<i>FGA</i>	GCAGAAGCTGGATATGCTGT	CATCTTAACTGGCATTTCATGG	58	393
<i>CSF1PO</i>	TCAGACTCTTCCACACACCA	GAGTGATGGGGTCAGATTGT	57	400
<i>TH01</i>	CTCCTGTGGGCTGAAAAG	TAGTCAGCACCCCAACCA	55	299
<i>D21S11</i>	AGACTTGGACAGCCCACTG	AAACTGAGAAGGGAGAAACA	58	400

3.7. Estudos funcionais e validações de patogenicidade das variantes candidatas

Três famílias do Oriente Médio, *Isr01*, *Isr04* e *Isr06*, tiveram suas variantes candidatas validadas por estudos funcionais, sendo a última família analisada pela técnica de *CRISPR/CAS9* e as demais por experimentos de co-localização.

Para melhor compreensão dos métodos utilizados para a análise funcional, este item foi dividido e apresentado de acordo com os experimentos realizados em cada família.

3.7.1. Estudos de co-localização de proteína

3.7.1.1. Família *Isr01*

Para o estudo do caso da família *Isr01*, foi utilizado o plasmídeo *pEGFP-C1* (figura 24) (Clontech, EUA) com o gene *SLC26A4* previamente clonado. A variante candidata foi inserida no plasmídeo contendo a sequência normal por meio de mutagênese sitio dirigida. Assim sendo, um plasmídeo contendo a sequência normal (*pEGFP-C1_SLC26A4_Nor*) e outro contendo a sequência com a variante (*pEGFP-C1_SLC26A4_Mut*) foram clonados e extraídos.

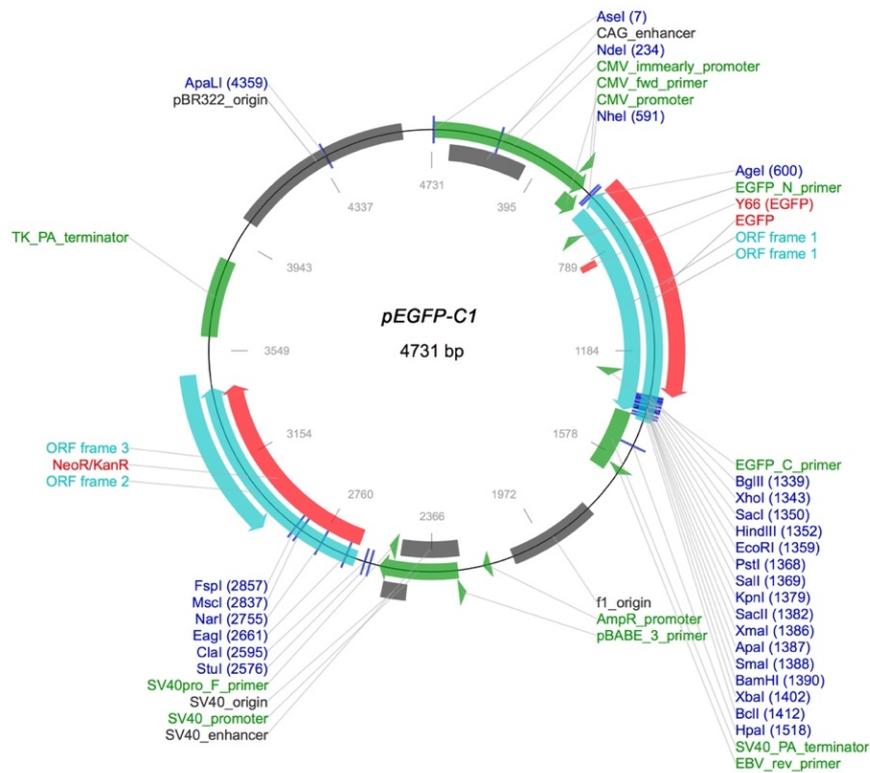


Figura 24. Representação do plasmídeo *pEGFP-C1* e suas regiões (Clontech, EUA) (Modificado de <https://www.addgene.org/vector-database/2487>. Acessado dia 06 de junho de 2017).

3.7.1.1.1. Mutagênese sitio dirigida

A inserção da variante candidata no plasmídeo ocorreu por mutagênese sitio dirigida, utilizando o *kit QuikChange Lightning Site-Directed Mutagenesis* (Agilent Technologies, EUA), permitindo inserir a variante c.349C>T no gene *SLC26A4*, presente no plasmídeo *pEGFP-C1* (Clontech, EUA).

Os *primers* complementares (figura 25) necessários para a inserção da variante na sequência do gene foram customizados utilizando a ferramenta *QuikChange Primer Design* (Agilent Technologies, disponível em <http://www.genomics.agilent.com/primerDesignProgram.jsp>), seguindo as recomendações do *kit* de mutagênese, como: tamanho dos *primers* (entre 25 e 45 pb), T_m igual ou superior a 78°C, variante presente no meio dos *primers* e apresentar, no mínimo, 40% de conteúdo GC.

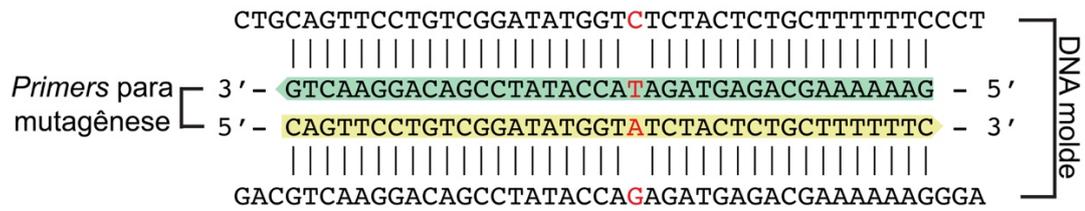


Figura 25. Representação dos *primers* utilizados para inserir a variante c.C349T no gene *SLC24A6* por meio de mutagênese sitio dirigida (Elaborado pelo autor).

A amplificação do fragmento foi realizada por condições estipuladas pelo fabricante, sendo utilizado 5 μ L de tampão 10X, 100 ng de dsDNA molde, 125 ng de cada *primer*, 1 μ L de *dNTP mix* e 1,5 μ L de reagente *QuikSholution*, completando o volume para 50 μ L com água ultrapura. A termociclagem ocorreu por uma desnaturação inicial a 95°C por dois minutos, seguido de 18 repetições do ciclo: desnaturação (95°C por 20 segundos), pareamento (60°C por 10 segundos) e extensão (68°C por 30 segundos/kb do plasmídeo utilizado). A extensão final foi a 68°C por cinco minutos.

Ao término da *PCR*, 2 μ L da endonuclease *Dpn I* foi utilizado por cinco minutos a 37°C para a digestão do plasmídeo molde devido ao reconhecimento de regiões metiladas, ausente em plasmídeos gerados *in vitro*. Paralelamente, foi realizada a reação controle utilizando o plasmídeo *pWhitescript 4.5 kb* para identificar o sucesso da reação de mutagênese.

3.7.1.1.2. Transformação de células competentes

A reação de transformação utilizou 2 μ L de β -Mercaptoetanol adicionados em 45 μ L de células ultracompetentes *XL10-Gold*, incubando a mistura no gelo por dois minutos. Em seguida, 2 μ L de plasmídeo tratado com *Dpn I* foi adicionado à mistura e incubado em gelo por 30 segundos. O tubo contendo a mistura foi aquecido por apenas 30 segundos a 42°C, e incubado novamente no gelo, por dois minutos. O volume de 500 μ L de meio *LB* líquido pré-aquecido/sem antibiótico foi adicionado à mistura, seguindo da incubação a 37°C por uma hora em agitação constante a 250 rpm. Após esta etapa, a reação foi centrifugada a 3.000 Xg por três minutos, descartando os 500 μ L de meio *LB* líquido, adicionando em seguida 250 μ L de novo meio *LB* líquido e plaqueando todo o volume em placa contendo meio *LB* com ágar e

antibiótico correspondente ao plasmídeo, neste caso a Canamicina. As placas foram incubadas a 37°C por 16 horas.

3.7.1.1.3. Preparo de *MiniPrep*

Após o período de 16 horas de incubação das placas com as células transformadas, 10 unidades formados de colônia (UFC) foram coletadas por hastes estéreis e transferidas para uma placa de Petri contendo meio *LB* com ágar e Canamicina (placa *Backup*). A mesma haste utilizada para transferir o material para o meio sólido foi transferida para um tubo contendo 2 µL de meio *LB* líquido com Canamicina. Ambos tubo e placa foram incubados a 37°C por 16 horas. Após este período e identificada a presença de colônias em ambos meios, a placa com meio sólido foi vedada e armazenada a 4°C. O tubo foi utilizado para extração do plasmídeo (*MiniPrep*) utilizando o *kit NucleoSpin Plasmid EasyPure* (Macherey-Nagel, Alemanha), seguindo as recomendações do fabricante. Ao término da extração, o produto teve sua concentração e pureza checado pelo *Nanodrop*[®] 8000 (Thermo Fisher Scientific, EUA), sendo sequenciado (item 3.2.6) para confirmação do plasmídeo contendo a variante na posição e direção correta.

3.7.1.1.4. Preparo de *MidiPrep*

As colônias que apresentaram plasmídeo contendo a variante foram resgatadas da placa *Backup* através de hastes estéreis, sendo transferidas para tubos de base redonda com 2 mL de meio *LB* líquido com Canamicina, denominados iniciadores (do inglês, *starters*). O meio com as células competentes foi incubado a 37°C por 16 horas. Ao término desta etapa e na presença de um meio *LB* líquido turvo, indicando a presença da célula competente resistente ao antibiótico, o *starter* foi transferido para 100 mL de meio *LB* líquido contendo antibiótico, sendo incubados novamente a 37°C por 16 horas, com agitação constante de 250 rpm. Após este período, e apresentando crescimento bacteriano no meio líquido, o plasmídeo contendo a variante foi extraído (*MidiPrep*) utilizando o *kit Nucleobond Xtra Midi Plus* (Macherey-Nagel, Alemanha), seguindo as recomendações do fabricante. O produto

teve sua concentração e pureza checado pelo *Nanodrop*[®] 8000 (Thermo Fisher Scientific, EUA).

3.7.1.1.5. Cultura celular com células animais

As células imortalizadas COS7, proveniente de fibroblastos (*african green monkey fibroblast*), foram utilizadas para os experimentos de cultura celular animal. O meio de cultura estoque utilizado para o trabalho com células animais foi o *DMEM* (do inglês, *Dulbecco's Modified Eagle's Medium*) enriquecido com L-glutamina (1%), soro fetal bovino (10%) (*FBS*, do inglês *Fetal Bovine Serum*) e penicilina/estreptomicina (1%). Todos os procedimentos foram realizados em ambiente controlado e estéril.

3.7.1.1.6. Descongelando as células animais

As células congeladas foram retiradas do nitrogênio líquido e mantidas em gelo, até o descongelamento. Em um tubo de 15 mL foram adicionados 8 mL de meio de cultura estoque e 2 mL de células descongeladas. Estas foram homogeneizadas suavemente e centrifugadas a 11.000 rpm por três minutos, descartando o sobrenadante contendo *DMEM* e *DMSO* (sulfóxido de dimetilo). O *pellet* foi re-suspendido em 10 mL de meio de cultura estoque novo, agitando levemente para homogeneização. Todo o volume foi transferido para uma placa de Petri estéril, sendo incubada a 37°C e 5% de CO₂. O crescimento das células foi verificado com o microscópio binocular *Nikon E200* (Nikon, Japão).

3.7.1.1.7. Repique de células animais

Ao atingir entre 60% e 80% de confluência, as células foram repicadas, sendo diluídas na razão 1:10 e transferidas para uma nova placa. Para isso, o meio de cultura antigo foi aspirado e descartado. O interior da placa, onde as células estavam fixadas, foi lavado com 5 mL de tampão fosfato-salino 1X (*PBS*, do inglês *Phosphate Buffered Saline*), sendo também aspirado e descartado. Dois mililitros de Tripsina foram adicionados para remoção das células fixadas na placa de Petri, sendo incubado por cinco minutos a 37°C. Outros 8 mL de meio de cultura estoque foram

adicionados e homogeneizados, anulando o efeito da tripsina. O volume de 1 mL foi homogeneizado com 9 mL de meio de cultura estoque e transferidos para uma nova placa de Petri, sendo levada a incubadora a 37°C com 5% de CO₂.

3.7.1.1.8. Transfecção

Para transfecção dos plasmídeos nas células animais, foi utilizado o *kit* comercial *Lipofectamina 2000* (Thermo Fisher Scientific, EUA). Para este procedimento o volume de 2 µL de células (50.000 células/µL) foi utilizado em cada poço da placa de cultura com lamínula na superfície. Ao atingir 60-70% de confluência, as células foram transfectadas seguindo as recomendações do fabricante.

O desenho adotado para esta análise de co-localização para identificar o efeito da variante foi:

- Transfecção apenas do plasmídeo *pEGFP-C1_SLC26A4_Nor* em células COS7.
- Transfecção apenas do plasmídeo *pEGFP-C1_SLC26A4_Mut* em células COS7.
- Para controles negativos, foram utilizados (i) ambos plasmídeos (sem agente de transfectantes) e (ii) apenas o agente de transfecção (para detectar a toxicidade dos reagentes nas células).

Cada um dos experimentos acima foi realizado com duplicata técnica, em triplicatas biológicas.

3.7.1.1.9. Imunocitoquímica para experimentos de co-localização

3.7.1.1.9.1. Fixação das células animais

As lamínulas contendo as células transfectadas com 80-90% de confluência foram submetidas a fixação celular. Para isso, o meio presente em cada poço foi removido e descartado, lavando cada poço com 1 mL de tampão fosfato-salino 1X por três vezes. Em seguida, foi adicionado 1 mL da solução Paraformaldeído 4% (PFA) em cada poço, incubando a placa a 37°C por 15 minutos. Após este

processo de fixação, o PFA 4% foi descartado corretamente, ocorrendo outro processo de lavagem utilizando 1 mL de *PBS 1X* por quatro vezes.

3.7.1.1.9.2. Coloração das células animais e captura de imagens por microscopia confocal

No estudo da variante candidata da família *Isr01*, o plasmídeo apresentando a proteína fluorescente *GFP* (do inglês *Green Fluorescent Protein*) como marcador foi utilizado tanto para a sequência normal do gene *SLC26A4* quanto para a sequência contendo a variante (item 3.7.1.1.1). Por apresentarem o mesmo marcador, cada experimento foi realizado separadamente, comparando a localização da proteína normal e afetada com o retículo endoplasmático. Com suspeita da variante causar a retenção da proteína no retículo endoplasmático (ao invés da membrana citoplasmática), foi utilizado um anticorpo monoclonal para reconhecimento da proteína Calnexina, específica para o retículo endoplasmático. O anticorpo primário utilizado foi a Calnexina Monoclonal *AF18* de coelho (Thermo Fisher Scientific, EUA). Para isso, após a fixação das células foi realizado o processo de permeabilização da membrana citoplasmática adicionando 1 mL de *TritonX-100 0,2%* em cada lamínula por cinco minutos. Em seguida, ocorreram três lavagens utilizando *PBS 1X*, procedidos da incubação das lamínulas em solução bloqueadora de albumina de soro bovino 3% (*BSA*, do inglês *Bovine Serum Albumin*) por 15 minutos.

As células, foram então incubadas com o anticorpo primário Calnexina Monoclonal *AF18* (1:250) por uma hora em ambiente protegido de luminosidade. Após este período, as lamínulas foram lavadas cuidadosamente com *PBS 1X* por três vezes e uma vez com água ultrapura. A etapa seguinte correspondeu à incubação com o anticorpo secundário *Goat anti-Rabbit IgG (H+L) Secondary Antibody, Alexa Fluor 594* (Thermo Fisher Scientific, EUA), juntamente com o corante de núcleo *DRAQ5* (corante fluorescente DNA-específico com comprimento de onda entre 710 e 850 nm), respeitando as razões 1:200 e 1:400, respectivamente. A incubação ocorreu em ambiente protegido de luminosidade por uma hora, utilizando 100 µL desta mistura. Ao término, as lamínulas foram lavadas cuidadosamente com *PBS 1X* por três vezes e uma vez com água ultrapura. A montagem das lâminas ocorreu utilizando uma gota de meio para montagem (*mounting media*), sendo mantidas em ambiente escuro para secagem até a análise por microscópio confocal. As lâminas prontas foram

visualizadas respeitando o comprimento de onda de fluorescência de cada marcador. A captura das imagens em arquivos do tipo .TIFF (*Tagged Image File Format*) ocorreu utilizando o microscópio confocal *Leica TCS SP8 STED* (Leica, Alemanha), do *Sackler Cellular & Molecular Imaging Center (SCMIC)* da Universidade de Tel Aviv, Israel. As imagens geradas por microscopia foram analisadas utilizando a distribuição *Fiji* do programa *ImageJ* (SCHINDELIN et al., 2012).

3.7.1.2. Família *Isr04*

No caso da família *Isr04*, a variante candidata correspondia a deleção do éxon 3 (Δ exon3) do gene *SLC12A6*. Esta análise foi iniciada pela aluna de mestrado Maria Birkan (Universidade de Tel Aviv, Israel) (BIRKAN, 2015). Para isso, foi adquirido o clone do cDNA *SLC12A6* (NM_001042494) no plasmídeo *pBluescriptR* (Dharmacon, EUA). A aluna realizou a inserção do cDNA em dois vetores, *pmCherry-C1* e *pEGFP-C3* (do inglês *Green Fluorescent Protein*), cedidos pelo laboratório do Dr. Yossi Shiloh (Universidade de Tel Aviv, Israel) e pelo grupo da Prof. Ruth Ashery-Padan (Universidade de Tel Aviv, Israel), respectivamente. A sequência correspondente ao terceiro éxon foi removida do plasmídeo *pmCherry-C1_SLC12A6* por meio do método de clonagem Gibson, utilizando *primers forward* e *reverse* que se sobrepunham 40 pb, sem a necessidade de clivar o plasmídeo contendo a sequência normal.

Ao término, a aluna obteve dois plasmídeos, um contendo o marcador *GFP* com a cópia normal do gene (*pEGFP_SLC12A6_Nor*), enquanto o plasmídeo contendo o *mCherry* apresentava a cópia do gene sem o terceiro éxon (*pmCherry_SLC12A6_Δexon3*). A amplificação destes plasmídeos e as devidas extrações foram realizadas seguindo protocolo do item 3.7.1.1.4, variando apenas o antibiótico seletivo utilizado, sendo a Ampicilina ao invés da Canamicina.

Células *COS7* foram utilizadas para este experimento. Sendo estas as mesmas utilizadas para análise da variante na família *Isr01*, os protocolos de repique e manutenção foram os mesmos presentes no item 3.7.1.1.7.

3.7.1.2.1. Transfecção

Para transfecção dos plasmídeos nas células animais, foi utilizado o *kit* comercial *Lipofectamina 3000* (Thermo Fisher Scientific, EUA). Para este procedimento o volume de 2 μ L de células (50.000 células/ μ L) foi utilizado em cada poço da placa de cultura com lamínula na superfície. Ao atingir 60-70% de confluência, as células foram transfectadas seguindo as recomendações do fabricante.

O desenho do experimento de co-localização para identificar o efeito da variante foi realizado da seguinte maneira:

- Transfecção apenas do plasmídeo *pEGFP_SLC12A6_Nor* em células COS7.
- Transfecção apenas do plasmídeo *pmCherry_SLC12A6_Δexon3* em células COS7.
- Transfecção dos plasmídeos *pEGFP_SLC12A6_Nor* e *pmCherry_SLC12A6_Δexon3* em células COS7.
- Para controles negativos foram utilizados (i) apenas os plasmídeos (sem o agente de transfecção) e (ii) apenas o agente de transfecção (para detectar a toxicidade dos reagentes nas células).

Cada um dos experimentos acima foi realizado com duplicata técnica, em triplicatas biológicas.

3.7.1.2.2. Imunocitoquímica para experimentos de co-localização

3.7.1.2.2.1. Coloração das células animais e captura de imagens por microscopia confocal

Na análise da variante da família *Isr04*, foram utilizados dois plasmídeos com o gene *SLC12A6*, porém marcados por proteínas fluorescentes diferentes, sendo o plasmídeo com a sequência normal marcado com o *GFP*, e o plasmídeo contendo a variante marcado com *mCherry*. Assim sendo, apenas a coloração adicional do núcleo foi necessária, uma vez que o objetivo era identificar se ambas proteínas estavam presentes na membrana (conforme proteína normal). Para isso, foi realizado o processo de permeabilização presente no item 3.7.1.1.9.2, seguido da incubação com a sonda *DRAQ5* (Abcam, EUA). Para o processo de coloração, o corante *DRAQ5*

foi diluído em *BSA* 3% na razão 1:400. Para cada lamínula presente em cada poço, foram distribuídos, em uma superfície lisa, 100 μ L de *DRAQ5*, no qual cada lamínula foi depositada e protegida da luz por 15 minutos. Após a incubação, as lamínulas foram lavadas com *PBS 1X* por três vezes e uma vez com água ultrapura. Com o uso do meio de montagem (*mounting media*) as lâminas foram mantidas em ambiente escuro para secagem. As imagens das lâminas foram capturadas por microscopia confocal, sendo analisadas conforme item 3.7.1.1.9.2.

3.7.1.2.3. Testes eletrofisiológicos

Os testes eletrofisiológicos realizados para atestar função da proteína contendo a exclusão do terceiro éxon foram feitos pela aluna Maria Birkan em parceria com o laboratório do prof. Bernard Attali, do Departamento de Fisiologia e Farmacologia (Universidade de Tel Aviv, Tel Aviv/Israel). Para isso, foram utilizadas linhagens celulares de ovário de hamster (*CHO*, do inglês *Chinese Hamster Ovary*), os plasmídeos (*pEGFP_SLC12A6_Nor* e *pmCherry_SLC12A6_Δexon3*) e a proteína *CIC2 Δ16-61* sem a sua porção N-terminal, que permitiriam a abertura permanente dos canais de cloreto.

As células *CHO* foram cultivadas utilizando as mesmas especificações do item 3.7.1.1.7, assim como a transfecção de cada plasmídeo mais a proteína *CIC2 Δ16-61* seguiram o protocolo previamente relatado no item 3.7.1.2.1. As células foram repicadas em lamínulas tratadas com *poli-L-lysina* (Sigma-Aldrich, EUA), montadas em um microscópio invertido TS100 (Nikon, Japão). Capilares de vidro preenchidos com fibra de boro silicato, com resistência de 4-8 Ω foram utilizados para aquisição dos valores à temperatura ambiente. Os resultados foram concebidos pela técnica patch-clamp (HAMILL et al., 1981), utilizando a solução externa (em mM): 140 NaCl, 4 KCl, 1,8 CaCl, 1,2 MgCl, 11 de glicose e 5,5 HEPES, ajustados para pH 7.3 com KOH e volumes de 320 mosmol/L. A solução pipetada continha (em mM): 130 gluconato sódico, 20 KCl, 1 MgCl, 5KATP, 5EGTA, 4,7 CaCl e 10 HEPES, ajustados para pH 7.3, com osmolaridade 307 mosmol/l. Os sinais foram amplificados utilizando o Axopatch 200B patch clamp amplifier (Axon Instruments, EUA) e filtrados a 2 KHz, pelo filtro de quatro polos Bessel. Os dados foram analisados utilizando o programa pClamp 10.5 (Axon Instruments, EUA)

3.7.2. Estudo funcional da proteína com a variante utilizando a técnica *CRISPR/Cas9*

3.7.2.1. Família *Isr06*

A análise da variante candidata da família *Isr06* foi realizada utilizando a tecnologia de edição de genoma *CRISPR/Cas9* (grupos de repetições palindrômicas curtas regularmente espaçadas, do inglês *Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeat*), inserindo a variante c.1473_1473+2delGGTinsC no gene endógeno *MYO6*.

3.7.2.1.1. Construção do plasmídeo de expressão *CRISPR/Cas9* e desenho do *sgRNA*

O plasmídeo utilizado foi o *pX459* [pSpCas9(BB)-2A-Puro] (figura 26). Este, fornecido como cortesia pelo grupo do Dr. Feng Zheng (Massachusetts Institute of Technology, EUA), continha a endonuclease *Cas9* humanizada, um marcador de seletividade por meio de resistência à Puromicina e a região promotora *U6* de *homo sapiens*. Objetivando a inserção da variante na sequência endógena do gene *MYO6*, foi adotada a estratégia de reparo direcionado por homologia (*HDR*, do inglês *Homology Directed Repair*).

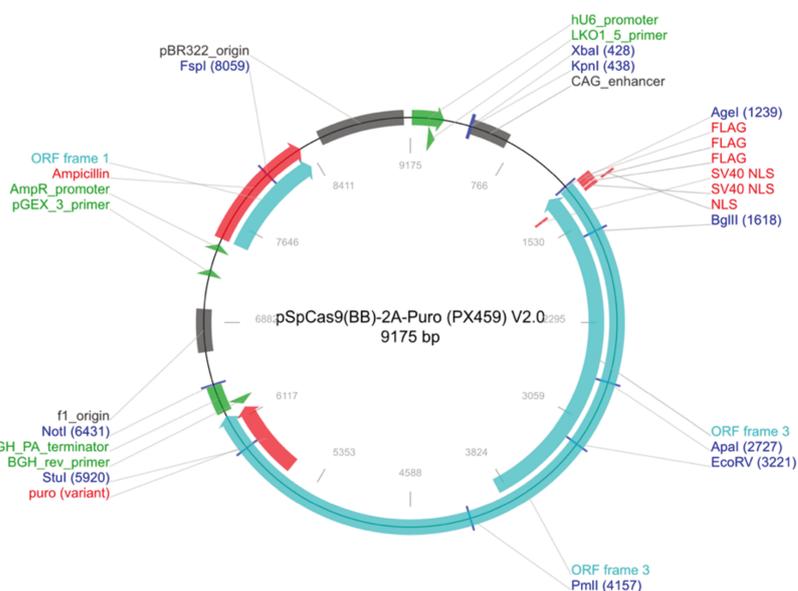


Figura 26. Esquematização do plasmídeo *pX459* e suas regiões (Retirado de <https://www.addgene.org/62988>. Acessado dia 06 de junho de 2017).

A fosforilação e pareamento utilizou 1 µL de cada *primer*, 1 µL do tampão de ligação *T4* 10X, 0,5 µL da enzima *T4 PNK* (New England BioLabs Inc., EUA) e 6,5 µL de água ultrapura. A reação de ligação ocorreu a 37°C por 30 minutos, seguido da inativação da enzima a 95°C por cinco minutos e o decréscimo de 5°C/minuto da temperatura até 25°C.

Os oligonucleotídeos pareados e fosforilados foram diluídos 250 vezes para a reação de ligação com o plasmídeo *pX459*. Para a incubação à temperatura ambiente por 10 minutos, 50 ng do plasmídeo linearizado foram misturados com 1 µL dos *primers* (anelados/fosforilados e diluídos) e 5 µL de tampão *Quickligation 2X* (New England BioLabs Inc., EUA), completando o volume para 10 µL com água ultrapura. Outro microlitro da enzima *Quick ligase* (New England BioLabs Inc., EUA) foi adicionado. A reação de ligação foi tratada com o *PlasmidSafe ATP-Dependent DNase*, seguindo recomendações do fabricante (Epicentre Inc., EUA).

A reação de transformação ocorreu seguindo protocolo de choque térmico (item 3.7.1.1.2), variando apenas o plasmídeo utilizado (plasmídeo *pX459* tratado com os *primers* para *CRISPR/Cas9*) e as células competentes utilizadas, *Stb13*. Pelo plasmídeo *pX459* apresentar seletividade por resistência à Ampicilina, o meio de cultura *LB* foi preparado utilizando tal antibiótico. O preparo do *MiniPrep* foi feito de acordo com o item 3.7.1.1.3, e o sequenciamento de Sanger para confirmação da inserção correta foi realizada de acordo com os procedimentos do item 3.2.6, utilizando o *primer* da região promotora *pX459_U6_SEQ* - CAAGGCTGTTAGAGAGATAA (5'>3').

3.7.2.1.2. Construção da molécula *ssDNA Donor*

A síntese da molécula *Ultramer*[®] (Integrated DNA Technologies Inc., EUA), correspondente à molécula *ssDNA Donor*, apresentou o comprimento de 200 pb, contendo as regiões flanqueadoras da região alvo. Esta molécula apresenta quatro regiões fundamentais: *left homology arm*, *right homology arm*, *sgRNA* e *PAM*. Na molécula customizada, a região de homologia (do inglês *homology arm*) correspondeu à sequência de 60 pb na porção *upstream* (*left*) e 52 pb na porção *downstream* (*right*) da região alvo. O desenho e escolha da região *sgRNA* encontra-se no item 3.7.2.1.1. Para o desenho da região contendo repetições e espaçadores (*PAM*, do inglês *Protospacer Adjacent Motif*) foram selecionados os três nucleotídeos adjacentes ao

sgRNA, sendo uma timina e duas guaninas. Para evitar o reconhecimento e clivagem do *ssDNA donor* pela proteína *Cas9* (do inglês *CRISPR Associated Protein-9*), a última guanina da trinca TGG foi alterada por uma adenina (figura 27). A molécula *Ultramer*[®] confeccionada foi diluída em Tampão *TE 1X* (do inglês *Tris-EDTA*) para a concentração de 100 µM.

3.7.2.1.3. Cultura de células e transfecção

A cultura de células respeitou os mesmos procedimentos descritos nos itens 3.7.1.1.5 e 3.7.1.1.7, com a diferença do tipo celular utilizado e a ausência de lamínulas no fundo de cada poço. Ao invés da cultura em células do tipo *COS7*, foram utilizadas células *HEK293T* (variação das células embrionárias de rim humano, do inglês *Human embryonic kidney 293*). Em cada poço de cultura, após a confluência entre 60-80%, 500 ng do plasmídeo *pX459* com o *sgRNA* e 1 µL da molécula *Ultramer*[®] customizada (100 µM) foram transfectados utilizando o *kit Lipofectamina 2000* (Thermo Fisher Scientific, EUA) seguindo recomendações do fabricante. Após 36 horas da transfecção, as células foram selecionadas utilizando Puromicina (3 µg/mL). A seleção por antibiótico foi procedida por repiques em placas de cultura de 96 poços, isolando células transfectadas únicas.

3.7.2.1.4. Confirmação de células imortalizadas contendo o gene *MYO6* endógeno com a variante c.1473_1473+2delGGTinsC

Após o isolamento das células e a confluência destas em placas de 96 poços, cada colônia foi transferida para placa de cultura de seis poços em duplicata. Uma duplicata perpetuou a colônia por meio de repiques e diluição 1:10 ao atingir a confluência 60-80%, enquanto a outra teve seu gDNA extraído pelo *kit ISOLATE II Genomic DNA* (Bioline, Inglaterra), conforme recomendações do fabricante. Um fragmento de 1,1 kb flanqueando a região alvo foi amplificado do gDNA extraído utilizando *PHUSION*[®] *High Fidelity PCR Master Mix* com Tampão *HF* (New England BioLabs Inc., EUA) e o par de *primers* (5'>3') *MYO6_gDNA_FWD* - CCTTATT TGTCAACTGAAGCAGGG e *MYO6_gDNA_REV* - GAGATGCCAAAGGCAGGGAT. A reação de amplificação do fragmento respeitou os parâmetros estipulados no item

3.2.6. Os fragmentos foram verificados em gel de agarose 1% e corados com Brometo de Etídeo. O produto de *PCR* foi purificado com o *kit ISOLATE II PCR/Gel* (Bioline, Inglaterra). O *primer* (5'>3') *MYO6_gDNA_SEQ*-GAGAACATTTGGGAAGTATAG foi utilizado para o sequenciamento do fragmento respeitando o protocolo no item 3.2.6.

3.7.2.1.5. Análise de *Off-Target Sites*

A análise dos três sítios *Off-Target* (*OTS*, do inglês *Off-Target Site*) presentes no experimento de *CRISPR/Cas9* foi verificada por meio de *PCR* do gDNA extraído das colônias isoladas. Fragmentos de 1-1,2 kb contendo os *OTS* foram amplificados utilizando *PHUSION® High Fidelity PCR Master Mix* com Tampão *HF* (New England BioLabs Inc., EUA). Tanto o *PCR*, quando a confirmação dos resultados e exclusão de possíveis *OTS* por sequenciamento de Sanger, foram realizados conforme o item 3.2.6. Os *primers*, assim como os *OTS*, estão descritos na tabela 16.

Tabela 16. *Primers* utilizados para exclusão de *OTS*.

Off Target Site	Primer	Sequência (5'>3')
chr12:-117925521 KSR2	MYO6_OTS#1 FWD	TTAGTAGCTGTGCCAAACTGGT
	MYO6_OTS#1 REV	AAATGCCACTGATAGCCACCC
	MYO6_OTS#1 SEQ	AGAGCAGCCAATTACTC
chr14:-25744518 Sem gene <i>RefSeq</i>	MYO6_OTS#2 FWD	AAGCAATCGTAGATGCCTGGT
	MYO6_OTS#2 REV	TGTATCCTCATCAGCATTGGGC
	MYO6_OTS#2 SEQ	TGTA CT CGAATCTCAGTG
chr1:+160810984 NM_016382	MYO6_OTS#3 FWD	GATGAGCATAAGCAACAGCCC
	MYO6_OTS#3 REV	AACCTCACCTACCTGGACGA
	MYO6_OTS#3 SEQ	AGAGTAGGATAGGCCTAG

3.7.2.1.6. Extração de mRNA e análise de transcrito por *PCR* em tempo real

A extração do mRNA das colônias contendo tanto o gene *MYO6* endógeno normal quanto com a variante foi realizada utilizando o protocolo padrão de extração por Tryzol (Invitrogen, EUA). Para a síntese do cDNA, foi utilizado o *kit qScript cDNA Synthesis* (QuantaBio, EUA), seguindo as recomendações do fabricante. Para análise do transcrito, foram sintetizados cinco primers objetivando a identificação do éxon 14 no transcrito (figura 28), analisados por *PCR* em tempo real utilizando *PerfeCTa SYBR Green FastMix PCR Reagent* (QuantaBio, EUA).

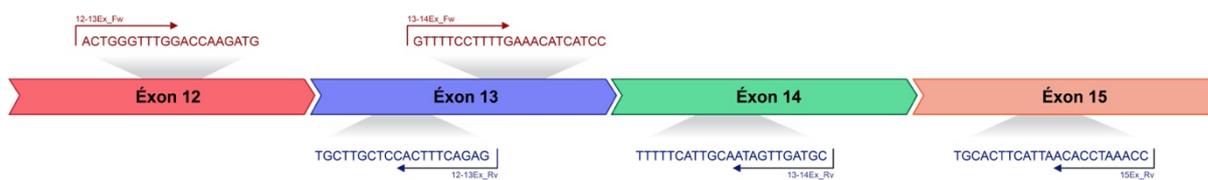


Figura 28. Esquematização dos *primers* (5'>3') utilizados para experimento para análise do transcrito de Miosina 6 (Elaborado pelo autor).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Para melhor compreensão desta sessão, serão apresentados primeiramente os casos que obtiveram êxito na análise molecular da perda auditiva utilizando as tecnologias de sequenciamento paralelo massivo, seja pelo painel *HEar-Seq v3* ou pelo sequenciamento completo do exoma (*WES*).

4.1. Estudo concluídos com o uso do sequenciamento paralelo massivo

Das 25 famílias analisadas, 12 tiveram o diagnóstico molecular total ou parcial concluído, sendo dois casos determinados por meio do *WES* e os dez casos restante pelo painel de captura *HEar-Seq v3*.

O tamanho final de captura utilizando o painel *HEar-Seq v3* foi de 1,86 Mb, utilizando 31.702 adaptadores (3.959 regiões). Isto permitiu a captura de 4.475 éxons, com profundidade entre 113 e 641 vezes. De todos nucleotídeos sequenciados, 84% apresentaram pelo menos 10 repetições em diferentes *reads*, enquanto 73% apresentaram mais de 30 repetições.

4.1.1. Família *Isr01*

A família *Isr01*, com descendência russa e egípcia/turca, apresentou o indivíduo III:1 com perda auditiva congênita bilateral profunda (Figura 29A e 29B) e aqueduto vestibular alargado (AVA). Após análises clínicas, a etiologia da perda auditiva continuou desconhecida. Por este fato, este indivíduo foi submetido ao sequenciamento paralelo massivo pelo painel *HEar-Seq v3*.

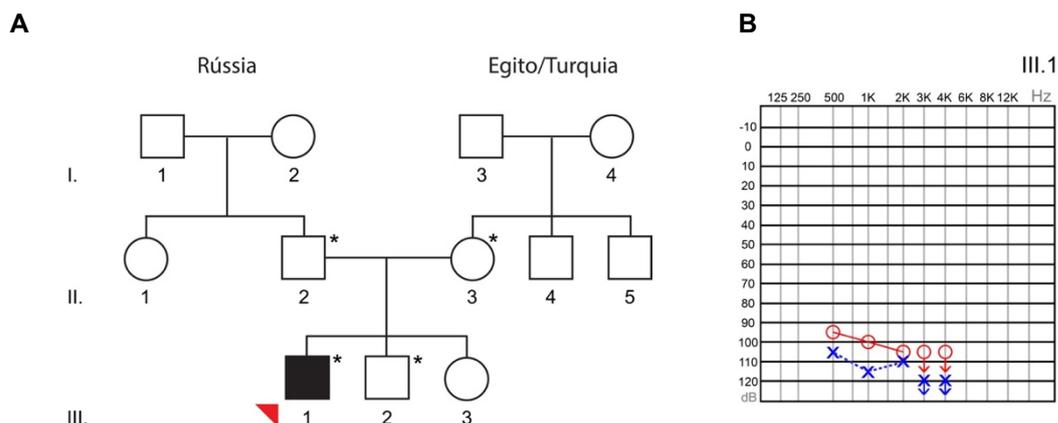


Figura 29. Informações referentes à família *Isr01*. **A:** Heredograma da família. O indivíduo sequenciado pelo painel *HEar-Seq v3* (III:1) está indicado pela seta vermelha. Asteriscos indicam os indivíduos que participaram da pesquisa. **B:** Audiometria tonal por via aérea do indivíduo III:1, indicando perda auditiva bilateral profunda. “O” vermelho: orelha direita; “X” azul: orelha esquerda.

Por se tratar de um caso esporádico e considerando histórico médico da do probando e da família, a principal hipótese levantada foi da herança ser autossômica recessiva ligada ao gene *SLC26A4* (*DFNB4*), associado à casos de perda auditiva e AVA. Para isso, após o sequenciamento pelo painel, foram filtradas possíveis variantes candidatas em homozigose e/ou em heterozigose composta. Esta análise não resultou em nenhuma potencial variante candidata em homozigose. Assim sendo, foram filtradas as variantes em heterozigose composta que pudessem explicar o fenótipo. Destas, duas variantes em heterozigose composta no gene *SLC26A4*, foram identificadas como principais variantes candidatas desta família (tabela 17).

Tabela 17. Variantes candidatas identificadas na família *Isr01* e principais resultados das análises de predição *in silico*.

Gene e Transcrito	Variante (cDNA)	Variante (Proteína)	MAF	Sift	PolyPhen (hVar)	Mutation Taster	PhyloP	GERP++	Genótipo
<i>SLC26A4</i>	c.349C>T	p.Leu117Phe	0,000459	0 P	0,998 D	0,96 D	2,536	5,12 D	0/1:177,161
<i>NM_000441.1</i>	c.578C>T	p.Thr193Ile	-	0 P	0,821 P	0,72 D	2,362	5,07 D	0/1:227,172

MAF: *Minor Allele Frequency* (Menor Frequência Alélica)

P: Patogênico

D: *Disease causing* (Causador de patologia)

A variante c.349C>T (*rs145254330*), p.Leu117Phe na proteína Pendrina, foi previamente relatada em um estudo envolvendo dois indivíduos com perda auditiva

e AVA, porém nenhuma outra variante foi identificada no gene *SLC26A4*. Análises posteriores de co-localização e efluxo de iodeto permitiram classificar esta variante como não patogênica, uma vez que a proteína canônica, assim como a contendo a variante, estavam presentes na membrana citoplasmática e não apresentava deficiência no efluxo de iodeto. Porém, esta análise de efluxo apresentou um viés, uma vez que algumas proteínas contendo a variante não estavam disponibilizadas na sua totalidade para o estudo, tendo sua classificação de patogenicidade atualizada para efeito desconhecido (*VUS*, do inglês *Variant of Uncertain Significance*) (TAYLOR et al., 2002).

A segunda variante, c.578C>T (p.Thr193Ile), registro *rs111033348*, foi previamente relatada em homozigose em seis indivíduos de uma família de drusos do Oriente Médio. Esta família havia sido diagnosticada como um caso de DFNB4 por um estudo de ligação. A reanálise clínica e molecular permitiu identificar que indivíduos desta família apresentavam não apenas perda auditiva, mas também bócio, sendo reclassificados como caso de Síndrome de *Pendred* (ADATO et al., 2000; BALDWIN et al., 1995). A caracterização funcional desta variante permitiu identificar a retenção da mesma no retículo endoplasmático, ao invés da membrana citoplasmática, resultando na perda total de função da proteína (DE MORAES et al., 2016).

A síndrome de *Pendred* e DFNB4 são causados por mutações em ambos alelos do gene *SLC26A4*. Estas podem ser em homozigose ou em heterozigose composta. Embora não se tenha relatos na literatura sobre a heterozigose composta envolvendo ambas variantes candidatas desta família, demais estudos foram realizados para confirmação do efeito causador destas, quando associadas. A primeira análise se deu pela segregação da variante na família, permitindo identificar se a variante estava em *cis* ou *trans*. Para isso, foram sequenciados os pais do probando (II:2 e II:3) para ambas variantes (figura 30).

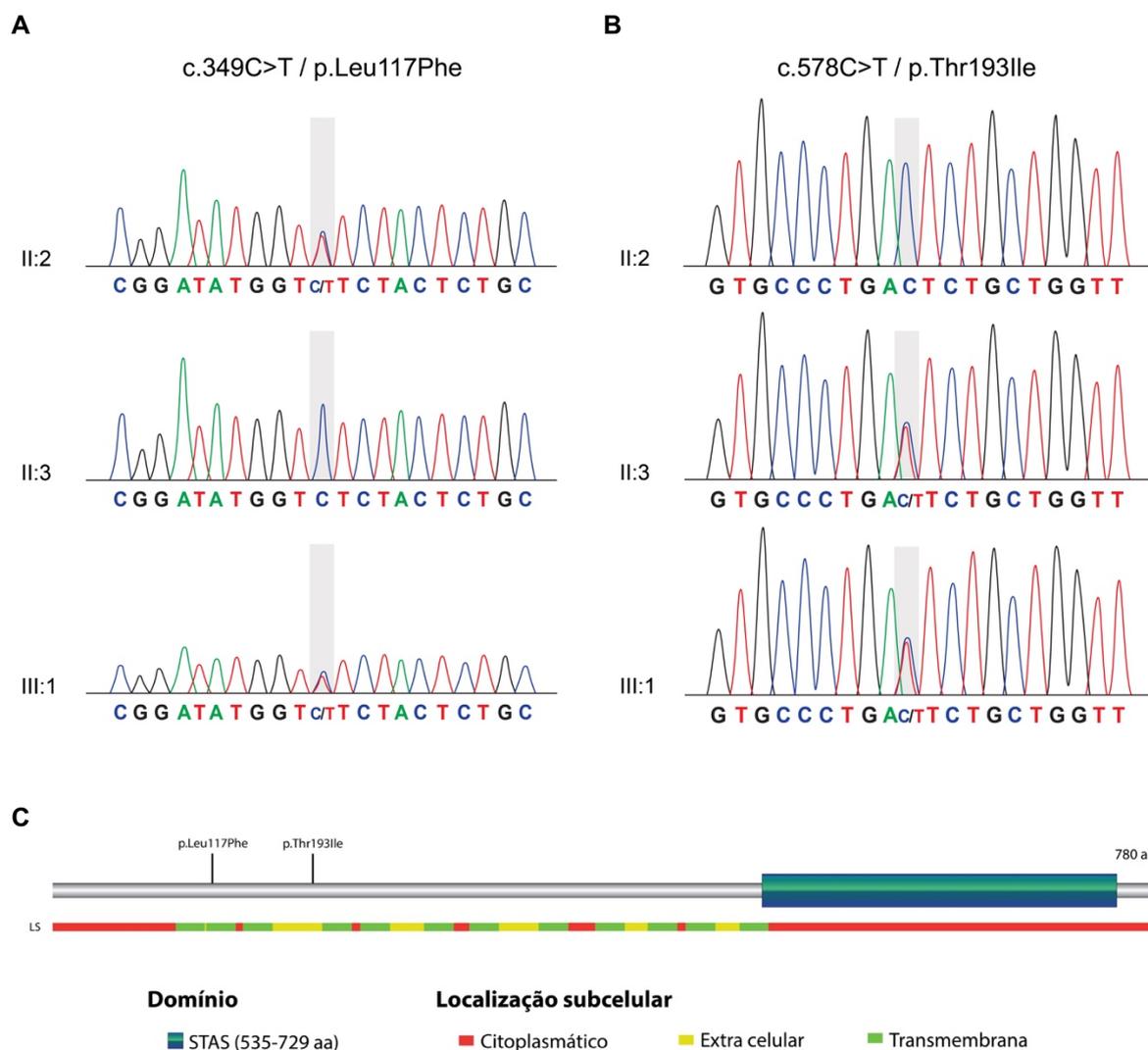


Figura 30. Resultados dos sequenciamentos referentes às variantes candidatas no gene *SLC26A4*. **A:** Eletroferogramas da análise da variante c.349C>T, indicando segregação em heterozigose proveniente do pai do indivíduo (II:2); **B:** Eletroferogramas da análise da variante c.578C>T, indicando segregação em heterozigose proveniente da mãe do indivíduo (II:3); **C:** Esquematização do transcrito do gene *SLC26A4* e das variantes identificadas na família *Isr01*, assim como sua proteína canônica (*Uniprot ID:* O43511-1) (Elaborado pelo autor).

Tanto a variante c.349C>T, quanto c.578C>T, foram confirmadas no probando por meio do sequenciamento de Sanger. A variante c.349C>T foi identificada em heterozigose no pai do probando (II:2), enquanto a mãe apresentava apenas a variante c.578C>T em heterozigose no gene *SLC26A4* (figura 31), confirmando o quadro de heterozigose composta em *trans* no probando.

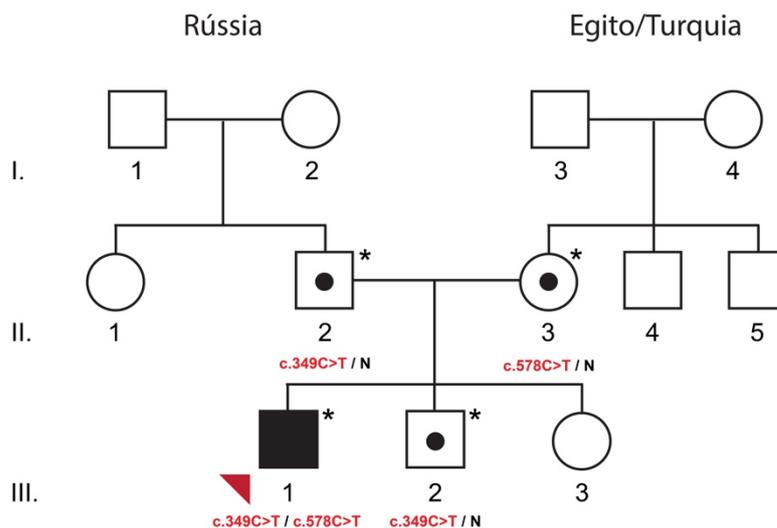


Figura 31. Resultados de segregação das variantes candidatas na família *Isr01*.

O estudo de frequência da variante $c.349C>T$ foi realizado por sequenciamento de Sanger com os mesmos *primers* utilizados para validação da variante candidata. Assim sendo, foram analisados 316 indivíduos (632 cromossomos), identificando a variante em apenas um alelo de um indivíduo judeu asquenaze (0,1582%).

A variante $c.578C>T$ havia sido relatada previamente em uma população de drusos do Oriente Médio, não sendo identificada em nenhum dos 110 controles utilizados, totalizando 220 cromossomos. Porém, nenhum estudo de referente à população da família estudada havia sido realizado. Assim sendo, por meio de *RFLP-PCR* e da endonuclease *Eam1104I*, o *amplicon* de 262 pb foi digerido em dois fragmentos menores em indivíduos sem a variante, um com 239 pb e outro com 23 pb. Os indivíduos contendo a variante tiveram o sítio de restrição abolido, gerando apenas o fragmento não digerido (figura 32).

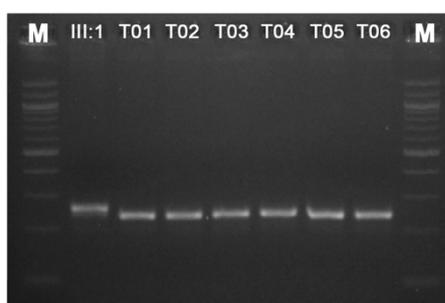


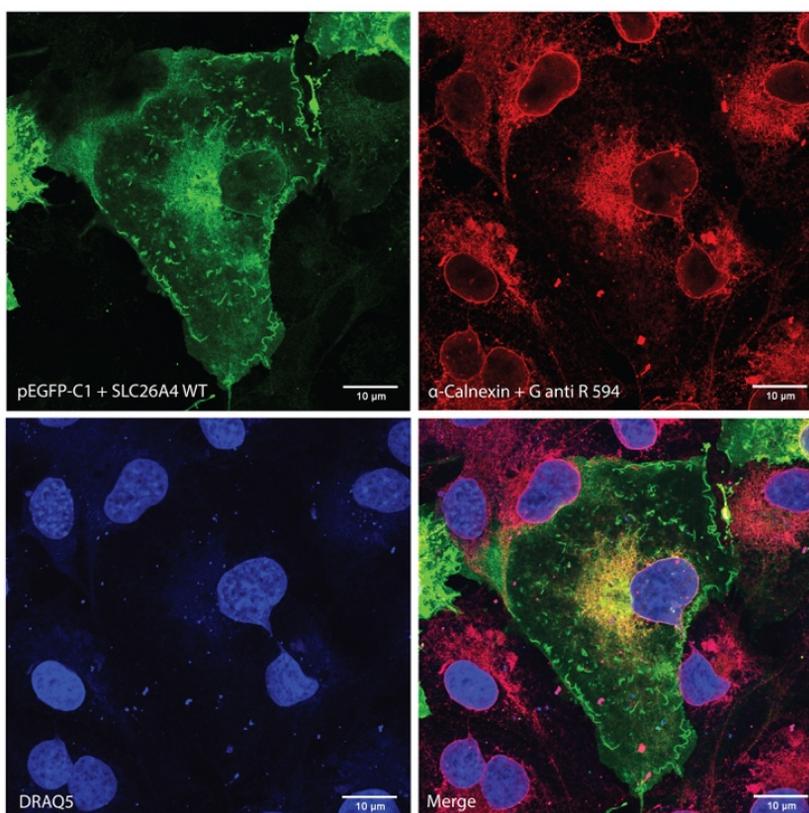
Figura 32. Gel de agarose 3% após *RFLP-PCR* utilizando endonuclease *Eam1104I*. Indivíduos normais apresentaram duas bandas, uma visível no gel (239 pb) e outra de 23 pb (não visível). Já o indivíduo

contendo a variante teve o sítio de restrição abolido, gerando apenas um fragmento de 262 bp (III:1).
M: Marcador molecular 1 kb Plus DNA Ladder (Thermo Fisher Scientific, EUA).

Foram analisados 93 indivíduos turcos, 48 iemenitas, 93 iranianos e 40 marroquinos, além de 137 indivíduos com perda auditiva de etiologia desconhecida. Dos 411 controles (822 cromossomos) analisados para a variante, nenhum apresentou a variante c.578C>T.

Pelo efeito da variante c.349C>T, diferentemente da c.578C>T, ainda ser considerado desconhecido, novos estudos de co-localização foram realizados para verificar a disponibilidade real da proteína Pendrina contendo a variante p.Leu117Phe. Assim sendo, para a expressão da proteína contendo a sequência normal e a variante (criado por mutagênese sítio dirigida) foi utilizado o plasmídeo com o marcador molecular *GFP* em células do tipo COS7. Para confirmar hipótese da proteína com a variante estar retida no retículo endoplasmático, experimentos de imunocitoquímica foram realizados utilizando o anticorpo primário α -Calnexina (proteína presente exclusivamente no retículo endoplasmático) (figura 33).

A



B

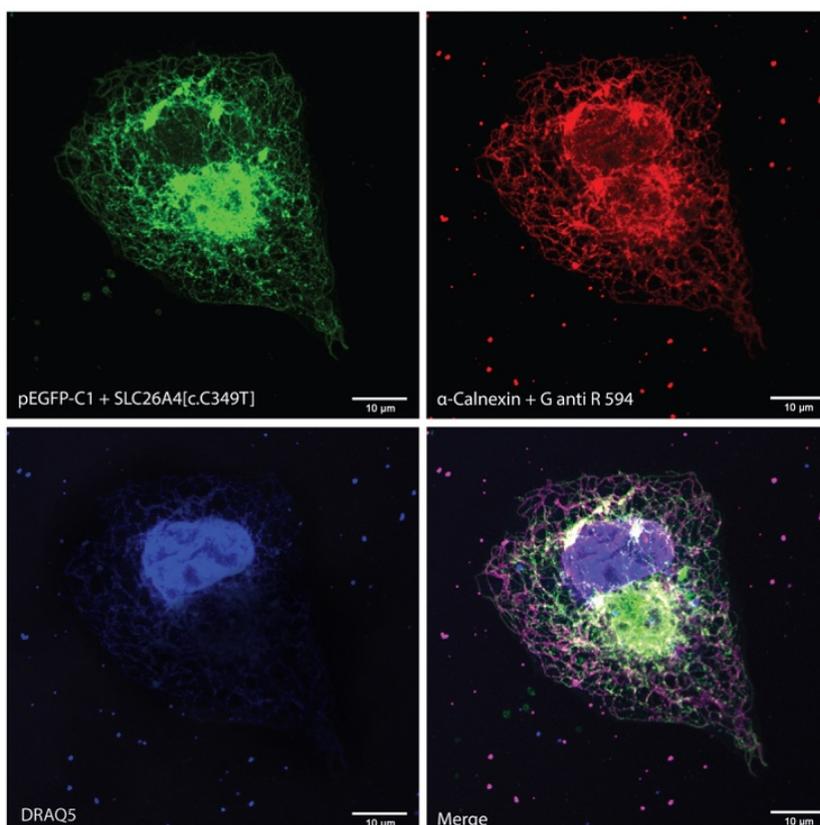


Figura 33. Resultados dos experimentos de co-localização da proteína Pendrina normal (**A**) e com a variante c.349C>T (p.Leu117Phe) (**B**). Tanto a proteína normal, quanto a contendo a variante estão marcadas com GFP, assim representado no quadrante superior esquerdo da cada figura. A co-localização da proteína se deu com o retículo endoplasmático, aqui marcado com o anticorpo primário alfa-Calnexina e o secundário *Goat anti Rabbit 594*, visto em ambas figuras no quadrante superior direito. *DRAQ5* é um marcador núcleo específico, representado em azul em ambas figuras, no quadrante inferior esquerdo. A sobreposição de todas as figuras (proteína + marcador de retículo endoplasmático + núcleo) pode ser visto nas figuras assinaladas como *merge*, possibilitando a análise de co-localização qualitativa.

Contradizendo relatos da literatura, onde a variante p.Leu117Phe não afetava a função da proteína, foi possível identificar a Pendrina com a variante retida no retículo endoplasmático, ao invés de ser localizada na membrana citoplasmática. Este fato deve acarretar em problemas no efluxo de iodeto, gerando fenótipos como o da Síndrome de *Pendred* e/ou DFNB4.

A presença da variante c.349C>T com c.578C>T em heterozigose composta, em *trans*, foi confirmada como causadora da perda auditiva não-sindrômica autossômica recessiva (DFNB4), elucidando a etiologia da perda auditiva da família *Isr01*. Este achado foi registrado no banco de dados *ClinVar* (National Center for

Biotechnology Information, EUA) com o número de acesso 424816, disponível em <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/variation/424816>.

4.1.2. Família *Isr02*

A família de *Isr02*, de descendência árabe, apresentou dois indivíduos, provenientes de um relacionamento com consanguinidade, com perda auditiva (figura 34). Nenhum dos pais apresentavam qualquer tipo de perda auditiva, porém ambos filhos apresentavam perda auditiva congênita bilateral profunda em altas frequências.

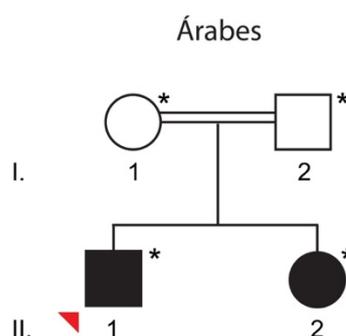


Figura 34. Heredograma da família *Isr02*. O indivíduo com amostra de DNA sequenciada pelo painel *HEar-Seq v3* (II:1) está indicado pela seta vermelha. Asteriscos indicam os indivíduos que participaram da pesquisa.

Por se tratar de um caso de casamento consanguíneo e a ausência do fenótipo nos pais, a principal hipótese adotada para análise do sequenciamento paralelo massivo desta família baseou-se na busca por variantes candidatas em homozigose e/ou heterozigose composta no probando. Das variantes candidatas identificadas pelo painel de captura, a única variante em homozigose e principal candidata foi c.9685delG (p.Glu3229Argfs*72), no gene *USH2A*.

Tabela 18. Variantes candidatas identificadas na família *Isr02* e principais resultados das análises de predição *in silico*.

Gene e Transcrito	Variante (cDNA)	Variante (Proteína)	Mutation Taster	Genótipo
<i>USH2A</i> NM_206933.2	c.9685delG	p.Glu3229Argfs*72	1 D	1/1: 1,396

D: *Disease causing* (Causador de patologia)

A variante c.9685delG (p.Glu3229Argfs*72) causa a substituição do aminoácido Glu3229 da proteína canônica por uma Arginina (Arg), gerando a troca da matriz de leitura (*ORF*, do inglês *Open Reading Frame*) e inserindo um códon de terminação prematuro 72 aminoácidos após o local da variante. Esta alteração resulta na exclusão dos 1901 aminoácidos próximos à região C-terminal da Usherina, excluindo 16 domínios de Fibronectina do tipo-3, além do *motif* de ligação do domínio *PDZ* (figura 35). Este *motif* é fundamental para a interação com o primeiro domínio *PDZ* da proteína Harmonina, formando o complexo proteico de ancoragem dos feixes ciliados à F-actina, indispensável para o processo de mecanotransdução. Invariavelmente, a perda da porção C-terminal, em homozigose, da Usherina leva a casos de Síndrome de Usher tipo 2, seja pela proteína truncada ou por sua degradação (ADATO et al., 2005; ZOU et al., 2016).

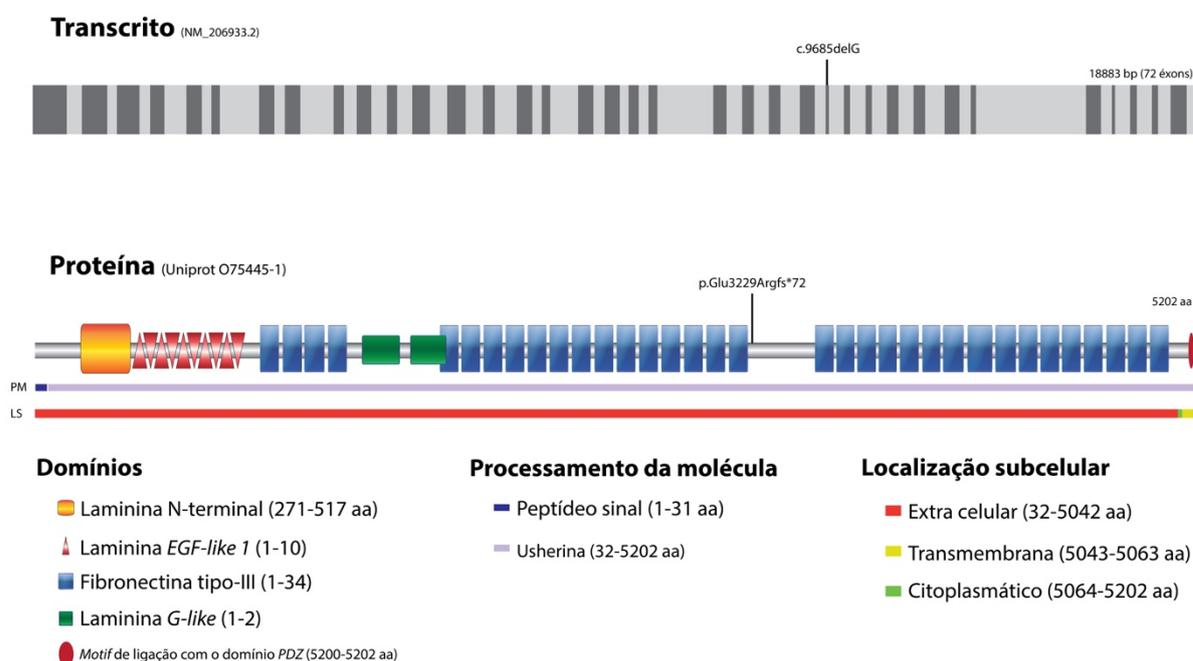


Figura 35. Esquematização do transcrito do gene *USH2A* e a variante identificada na família *Isr02*, assim como sua proteína canônica (Elaborado pelo autor).

A variante candidata c.9685delG foi validada no probando por sequenciamento de Sanger, sendo confirmada em homozigose. Para a correlação do fenótipo com o genótipo, os pais do indivíduo (sem perda auditiva), assim como o irmão (com o mesmo padrão de perda auditiva), também foram checados para a variante, indicando a presença em heterozigose da variante em ambos pais (I:1 e I:2) e em homozigose no irmão do probando (II:2) (figura 36).

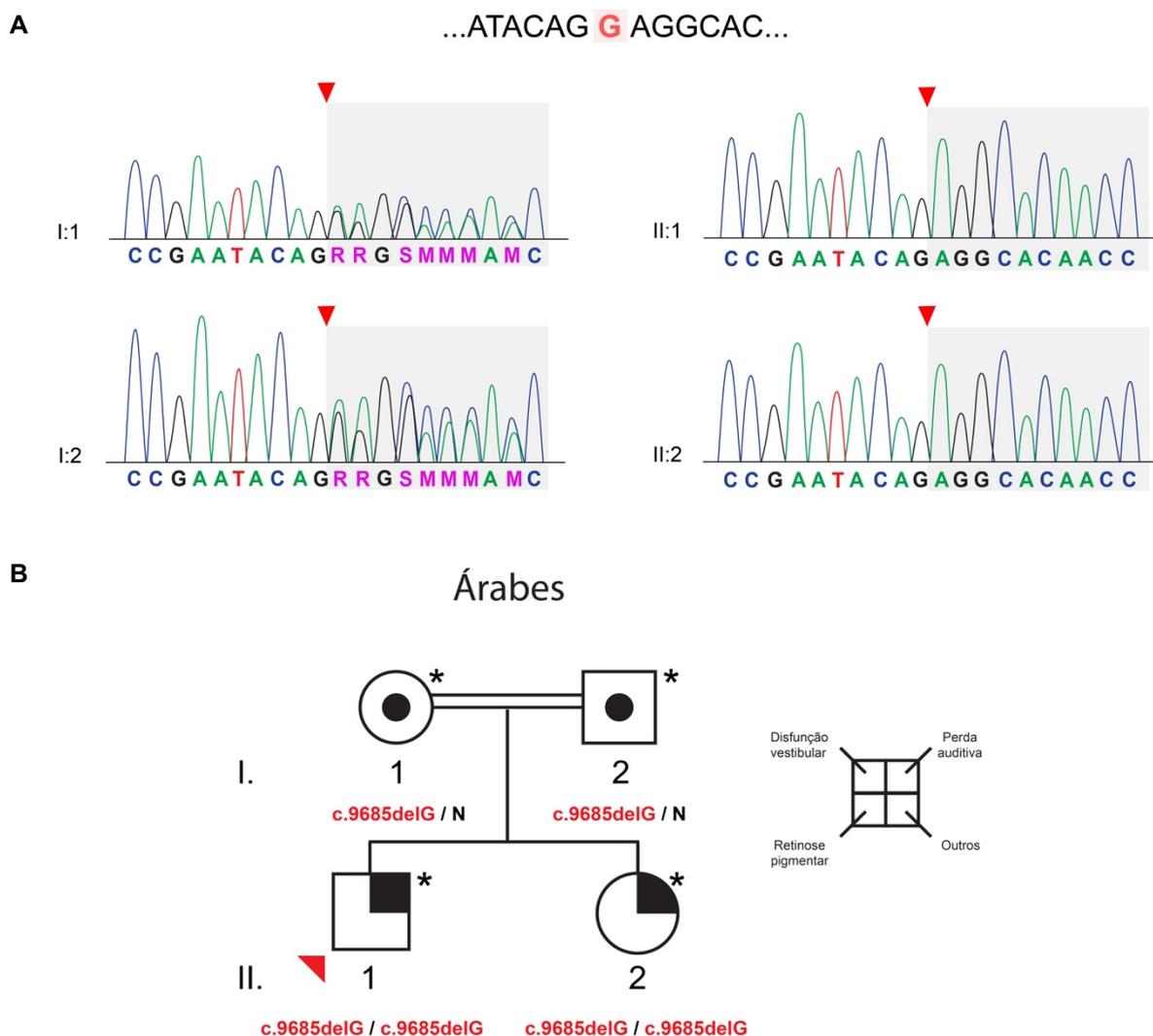


Figura 36. Resultados da análise de segregação da variante na família *Isr02*. **A:** Eletroferogramas dos indivíduos da família *Isr02*, confirmando a variante p.Glu3229Argfs*72 em heterozigose nos pais (I:1 e I:2) e em homozigose nos filhos (II:1 e II:2); **B:** Resultados de segregação das variantes candidatas na família *Isr02*.

Por se tratar de uma variante nunca antes descrita, análise de frequência foi realizada por *RFLP-PCR* utilizando a endonuclease *BsII*. Indivíduos sem a variante apresentaram três sítios de restrição, digerindo o *amplicon* de 399 pb em quatro fragmentos (150 pb, 80 pb, 59 pb e 110 pb). Os indivíduos contendo a variante tiveram um dos sítios de restrição abolidos, gerando apenas três fragmentos (150 pb, 138 pb e 110 pb) (figura 37).

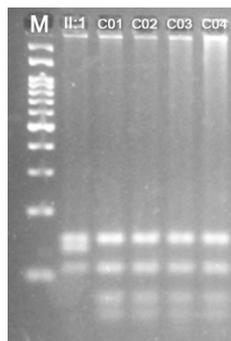


Figura 37. Resultados do *RFLP-PCR* para a análise de frequência da variante candidata na família *Isr02*. *C0**: Controles. *M*: Marcador molecular *1 Kb Plus DNA Ladder* (Thermo Fisher Scientific, EUA).

Ao todo, foram analisados 154 controles árabes, 153 controles de diversas etnias e 111 controles com perda auditiva de etiologia desconhecida. Nenhum dos 418 controles (836 cromossomos) apresentou a variante, sendo esta identificada apenas na família estudada.

Pelo fato da síndrome de Usher tipo 2 ser caracterizado pela presença de três manifestações clínicas (perda auditiva congênita bilateral simétrica moderada/profunda; disfunção vestibular e retinose pigmentar após segunda/terceira década de vida) (BONNET et al., 2016), houve a solicitação para demais teste clínicos que pudessem confirmar o caso sindrômico na família. Dos resultados da análise vestibular, nenhum indivíduo apresentou disfunção, assim como retinose pigmentar. Porém, vale ressaltar que a retinose pigmentar, geralmente, acomete o indivíduo na sua segunda/terceira década de vida, e uma vez que os indivíduos II:1 e II:2 encontram-se na primeira década de vida, eles podem vir a apresentar retinose pigmentar tardiamente. Assim sendo, foi recomendado à família por aconselhamento genético, o acompanhamento periódico da análise clínica referente aos sintomas relacionados à síndrome de Usher tipo 2.

A presença da nova variante c.9685delG em homozigose foi confirmada como causadora da perda auditiva na família *Isr02*. Porém, exames periódicos devem ser realizados para identificar possível retinose pigmentar nos indivíduos afetados. Este achado foi registrado no banco de dados *ClinVar* (National Center for Biotechnology Information, EUA) com o número de acesso 236049 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/variation/236049>), além de ter sido depositado no banco de dados *dbSNP* (National Center for Biotechnology Information, EUA) com número *rs878853233*.

4.1.3. Família *Isr03*

A família *Isr03* compreendia três gerações de uma família de judeus asquenazes (figura 38A). Os indivíduos afetados desta família apresentavam o mesmo tipo de perda auditiva, sendo neurossensorial congênita bilateral severa/profunda (figura 38B).

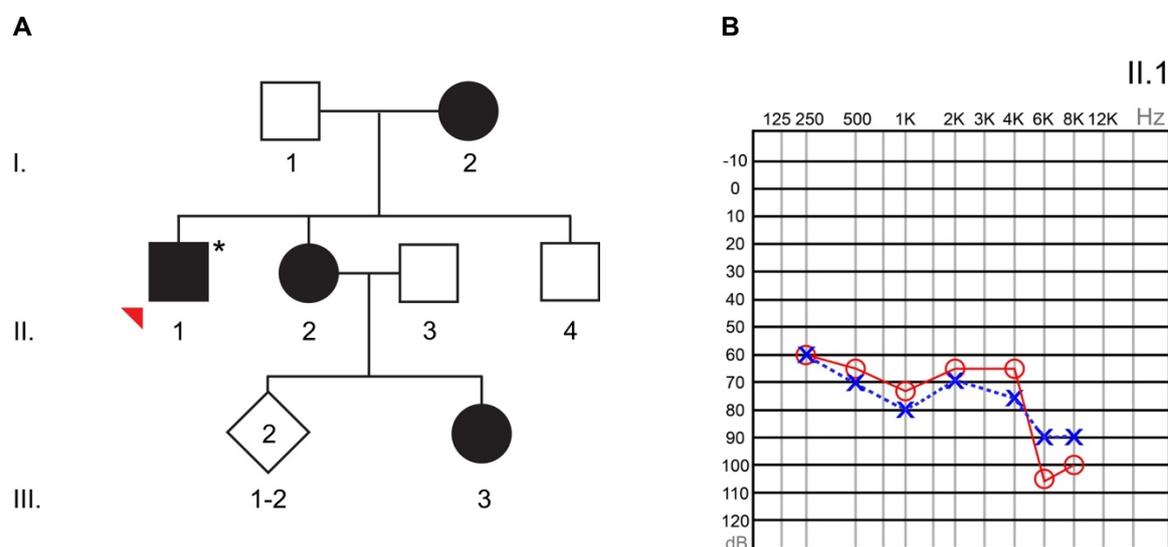


Figura 38. Informações sobre a família *Isr03*. **A:** Heredograma da família. O asterisco indica quais pacientes participaram da pesquisa. O probando II:1, seta vermelha, foi sequenciado pelo painel *HEar-Seq v3*; **B:** Audiometria tonal por via aérea do indivíduo II:1, indicando perda auditiva severa/profunda. “O” vermelho: orelha direita; “X” azul: orelha esquerda.

A principal hipótese considerada para o estudo desta família foi de herança autossômica dominante apresentado pelo histórico familiar e informações clínicas. Assim, foram filtradas possíveis variantes candidatas presentes em pelo menos um dos alelos. A principal variante candidata correspondia a uma inserção de 35 nucleotídeos entre o nucleotídeo 681 e 682 do transcrito NM_002051.2 do gene *GATA3* (OMIM 131320), validada por sequenciamento de Sanger (figura 39A). Este gene está associado à síndrome de *Barakat*, também conhecida como Síndrome *HDR* (OMIM 146255), uma rara síndrome autossômica dominante. Esta é caracterizada pela presença de hipoparatiroidismo, perda auditiva neurossensorial e anomalias renais.

A variante candidata identificada, c.681_682insACCACCCCATCAGCA CTCACCCGCCCTACGTGCCC (p.Glu228Thrfs*37), nunca antes relatada na literatura, altera completamente a sequência de aminoácidos após a posição 228, inserindo um códon de terminação prematura 37 aminoácidos após a variante (figura 39B).

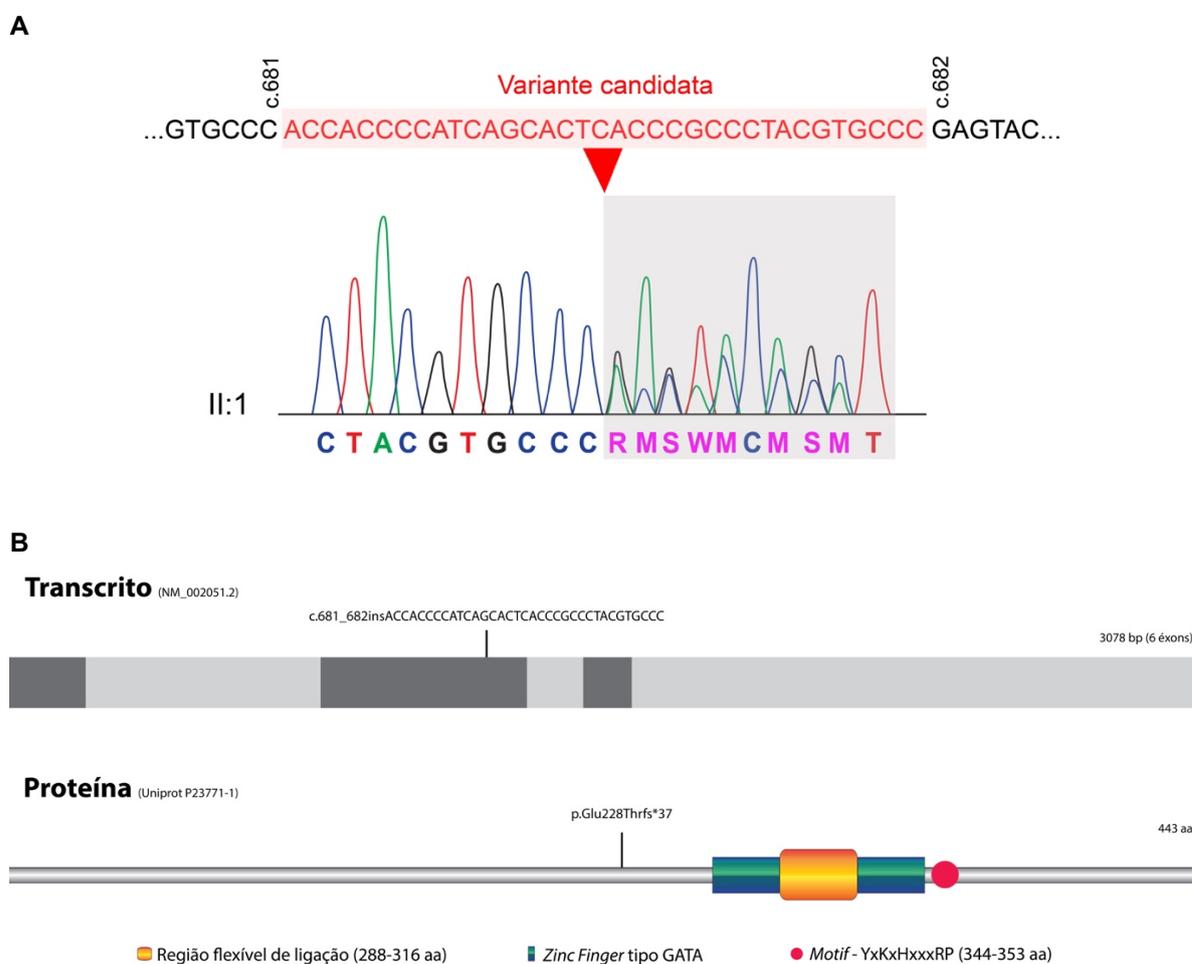


Figura 39. Esquematização do transcrito do gene *GATA3* e a variante identificada na família *Isr03*, assim como sua proteína canônica. **A:** Eletroferograma da região sequenciada do gene *GATA3* para validação da variante c.681_682insACCACCCCATCAGCACTCACCCGCCCTACGTGCCC no indivíduo II:1; **B:** Esquematização do transcrito e proteína proveniente do gene *GATA3* e a variante encontrada no indivíduo II:1 da família *Isr03* (Elaborado pelo autor).

O gene *GATA3* é expresso no cérebro, rins, paratireoide e orelha interna no estágio embrionário, apresentando sua principal isoforma (NM_002051.2) com 443 aminoácidos (Uniprot P23771-1) (DEBACKER; CATALA; LABASTIE, 1999). Formado por seis éxons, este gene pertence à família de fatores de transcrição *GATA*, apresenta dois domínios transativadores (*TA1* e *TA2*) e dois domínios *zinc finger*

conservados: um *zinc finger* próximo da região C-terminal (*ZnF2*), essencial para a interação com a molécula de DNA, e outro próximo à região N-terminal (*ZnF1*), que auxilia na estabilização da interação com o DNA, assim como na interação com outro complexo proteico de proteínas *zinc finger*, denominado *FOG* (do inglês *Friends of GATA*). Mutações neste gene são classificadas de três maneiras de acordo com o efeito na ligação com DNA. A primeira compreende as alterações que abolem completamente a interação com DNA devido à variações no *ZnF2*, correspondendo a 90% dos casos de mutações no gene *GATA3* e síndrome *HDR*. A segunda classificação, geralmente afetando o *ZnF1*, corresponde às alterações que interferem na afinidade e estabilidade da interação com o DNA. Já a última divisão compreende as alterações que afetam o complexo *FOG* (NESBIT et al., 2004; YANG et al., 1994).

A variante candidata identificada nesta família ocorria anteriormente à ambos *zinc fingers* (*ZnF1* e *ZnF2*). Porém, a inserção pela variante de um códon prematuro após o resíduo 265 da sequência da proteína, acaba por extinguir tanto o *ZnF1*, quanto o *ZnF2*. Como relatado anteriormente, a ausência destes dois domínios irá resultar em um fenótipo sindrômico (síndrome de *HDR*) devido à haploinsuficiência do gene *GATA3*, uma vez que não haverá a interação com a molécula de DNA (VAN ESCH et al., 2000). Esta hipótese foi fortalecida pela presença de anomalias renais no probando (II:1), assim como o histórico médico de transplante de rim realizado na mãe do indivíduo afetado (I:2), que também apresenta perda auditiva (figura 40). Infelizmente, por se tratar de uma família com amostra de DNA coletada há mais de 10 anos pelo laboratório da professora Karen B. Avraham, não obtivemos êxito em contatar a família para solicitar mais amostra de DNA, assim como de seus demais indivíduos.

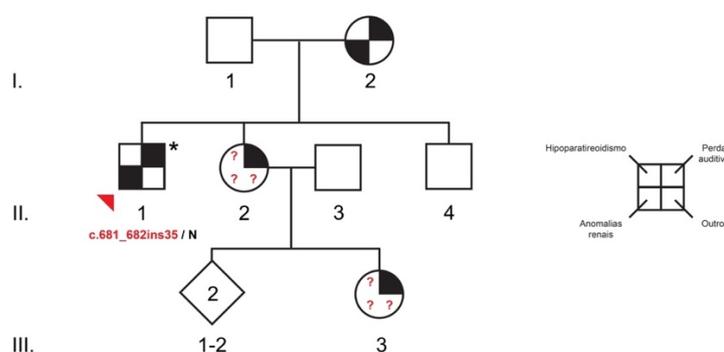


Figura 40. Heredograma contendo os resultados da análise do gene *GATA3* na família *Isr03*.

Por se tratar de uma variante nunca antes descrita, a análise de frequência da variante foi realizada, por *PCR* (figura 41), em 150 indivíduos judeus asquenazes, 143 indivíduos de diversas populações e 154 indivíduos com perda auditiva comprovada, mas de etiologia desconhecida. Do total de 894 cromossomos analisados (447 indivíduos), nenhum alelo apresentou a variante encontrada candidata da família *Isr03*.

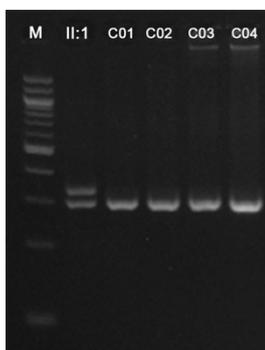


Figura 41. Gel de agarose 2% corado com brometo de Etídeo referente ao estudo da frequência da variante c.681_682insACCACCCCATCAGCACTCACCCGCCCTACGTGCCC do gene *GATA3*. *M*: Marcador molecular 1 Kb Plus DNA Ladder (Thermo Fisher Scientific, EUA).

A presença da nova variante c.681_682insACCACCCCATCAGCACTCACCCGCCCTACGTGCCC em heterozigose foi confirmada como causadora da perda auditiva síndrômica (Síndrome de *HDR*) na família *Isr03*. Devido à indisponibilidade de contato com a família, não foi possível realizar coleta de sangue de demais indivíduos da família e o aconselhamento genético, comprometendo a orientação sobre a probabilidade de reincidência de sintomas relacionados à síndrome de *HDR* tanto nos irmãos do probando, quanto nas novas gerações.

Este achado foi registrado no banco de dados *ClinVar* (National Center for Biotechnology Information, EUA) com o número de acesso 236031, disponível em <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/variation/236031>, sendo também depositado no banco de dados *dbSNP* (National Center for Biotechnology Information, EUA) com o número *rs878853222*.

4.1.4. Família *Isr04*

Esta família, com descendência iraniana e iemenita, apresentou cinco indivíduos com perda auditiva neurosensorial progressiva bilateral profunda, iniciando-se entre 12 e 17 anos de idade (figura 42).

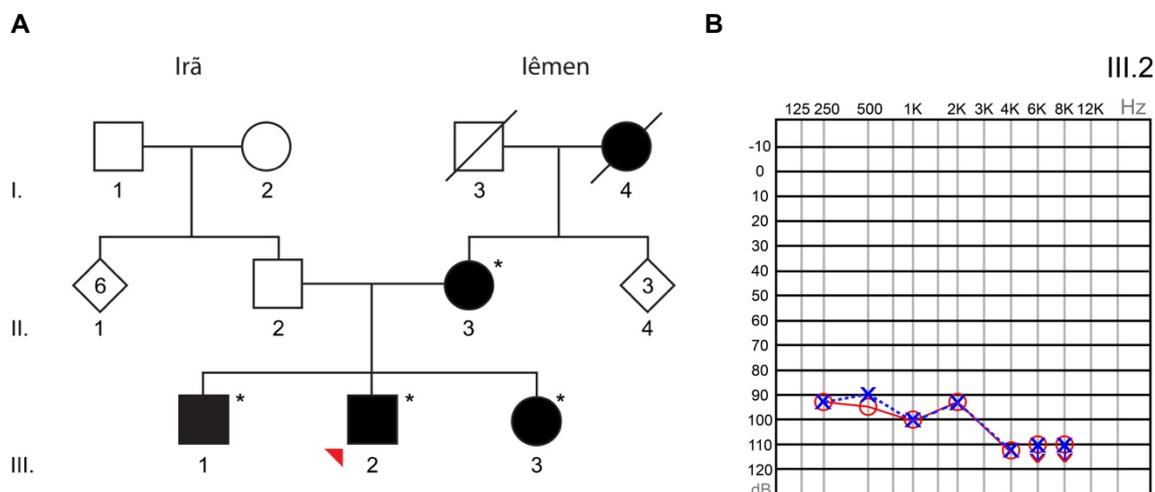


Figura 42. Heredograma da família *Isr04*. **A:** O asterisco indica quais indivíduos o laboratório detinha a amostra de DNA. O probando (III:2), indicado pela seta vermelha, foi submetido ao sequenciamento paralelo massivo pelo painel *HEar-Seq v3*; **B:** Audiometria tonal por via aérea do indivíduo III:2, indicando perda auditiva neurosensorial bilateral profunda. “O” vermelho: orelha direita; “X” azul: orelha esquerda.

A seleção da variante candidata ocorreu baseado na principal hipótese deste ser um caso de perda auditiva autossômica dominante devido ao histórico familiar e médico. Esta análise foi realizada inicialmente pela aluna de mestrado Maria Birkan, sob supervisão da professora Karen B. Avraham (Universidade de Tel Aviv, Israel).

A aluna identificou cinco possíveis variantes candidatas (tabela 19) que poderiam ser a causa do fenótipo nesta família.

Tabela 19. Variantes candidatas identificadas na família *Isr04* e principais resultados das análises de predição *in silico*.

Gene e Transcrito	Variante (cDNA)	Variante (Proteína)	MAF	Sift	PolyPhen (hVar)	Mutation Taster	PhyloP	GERP++	Genótipo
<i>CELSR1</i>	c.G4243A	p.Gly1415Arg	-	0 P	1 D	0,95 D	2,387	5,1	0/1:5,14

NM_014246									
LRP2	c.G13250A	p.Gly4417Asp	0,005969	0,11 T	0,885 P	0,98 D	2,552	5,44	0/1:195,204
MAP1A	c.C6752T	p.Ala2251Val	0,01377	0,07 T	0,638 P	0,57 D	2,241	4,32	0/1:111,107
NOTCH1	c.G1862A	p.Arg621His	0,001377	0,13 T	0,988 D	0,99 D	2,426	5,24	0/1:3,5
SLC12A6	<i>Splicing</i> c.139+1G>A	ΔÉxon3	-	-	-	-	2,335	5,02	0/1:177,134

MAF: Minor Allele Frequency (Menor Frequência Alélica)

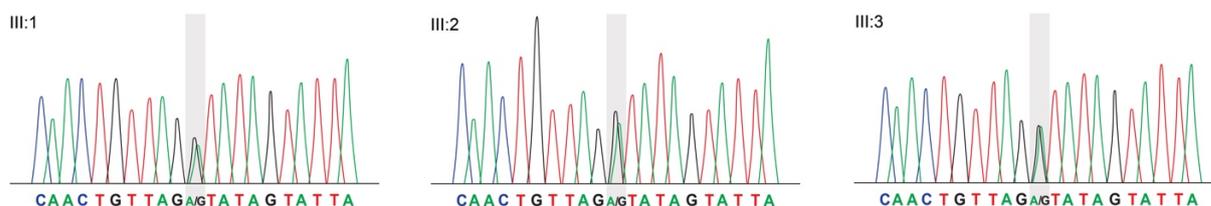
P: Patogênico

D: Disease causing (Causador de patologia)

T: Tolerado

Todas as variantes candidatas estavam presentes em heterozigose e tiveram a segregação analisada na família. Porém, como indicado no heredograma contendo os resultados de segregação (figura 43), apenas a variante c.139+1G>A, no gene *SLC12A6*, estava segregando com a perda auditiva.

A



B

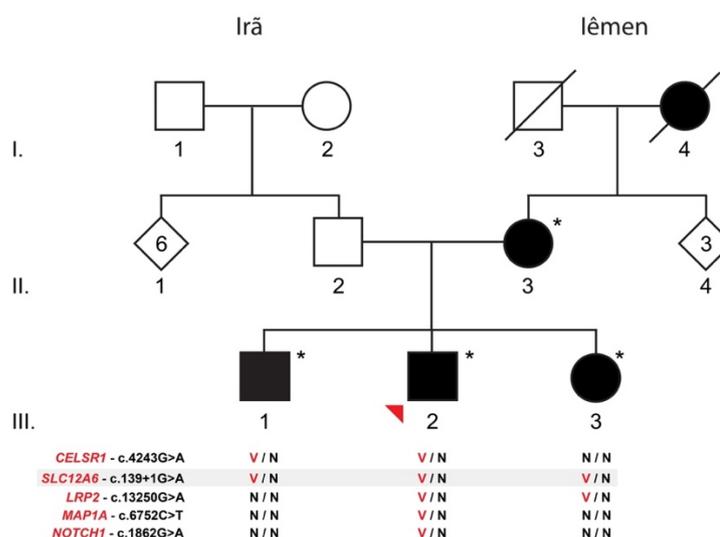


Figura 43. Resultados da análise de segregação da variante na família *Isr04*. **A:** Eletroferogramas dos indivíduos da família *Isr04*, confirmando a variante c.139+1G>A em heterozigose nos afetados (III:1, III:2 e III:3); **B:** Resultados de segregação das variantes candidatas na família *Isr04*.

Posteriormente, a mãe dos indivíduos (II:3), também afetada com o mesmo padrão de perda auditiva, teve seu DNA coletado e analisado para a variante no gene *SLC12A6*, sendo identificada também em heterozigose.

As proteínas da família *SLC12* são proteínas de membrana que medeiam o co-transporte de K^+ e *Cl*. Também conhecida como família CCC, é subdividida em dois grupos, a família *NCC* e um segundo grupo com quatro genes que codificam proteínas co-transportadoras K^+ e *Cl*, recebendo o nome de *KCC1*, *KCC2*, *KCC3* e *KCC4*. As proteínas da família *SLC12* apresentam 12 regiões transmembranares, a extremidade N-terminal curta e um C-terminal longo (GAMBA, 2005). O gene *SLC12A6* (OMIM 604878) codifica a proteína *KCC3* (do inglês *K⁺Cl Cotransporter-3*) responsável pelo decréscimo da concentração de cloreto citoplasmático através da formação do complexo K^+Cl (RIVERA et al., 1999). Na orelha interna, esta proteína é expressa nas células ciliadas e células de suporte de *Deiter*. Esta última secreta o K^+ proveniente das CCE para a cortilinfia, que recicla estes íons através da estria vascular até a endolinfa (BOETTGER et al., 2002, 2003). Acredita-se que a variante candidata c.139+1G>A afete esta ciclagem de potássio, fundamental para o processo de mecanotransdução.

Mutações neste gene foram associados à síndrome de *Andermann* (OMIM 218000), uma patologia neurológica rara e complexa caracterizada pela neuropatia sensori-motor progressiva e agenesia parcial ou completa do corpo caloso no cérebro (SALIN-CANTEGREL et al., 2011). Em camundongos, o primeiro estudo envolvendo esta família de proteínas envolveu o *knockout* do gene *KCC4*, causando perda auditiva profunda. Posteriormente, um estudo envolvendo camundongos *knockout* para o gene *KCC3* confirmou o fenótipo de perda auditiva progressiva, apresentando continua degeneração das células ciliadas da cóclea (BOETTGER et al., 2002, 2003),

Análises *in silico* foram realizadas para identificar possível efeito patogênico da variante. A troca da guanina por uma adenina no primeiro nucleotídeo do íntron 3 do gene *SLC12A6* ocorre no sítio doador de *splicing* (5'SS, do inglês *Splice Donor Site*), uma região presente no início dos íntrons de organismos vertebrados (figura 44). Sem esta sequência conservada (GT), pode ocorrer um efeito denominado *splicing* alternativo, onde diferentes isoformas de um mesmo gene são geradas.

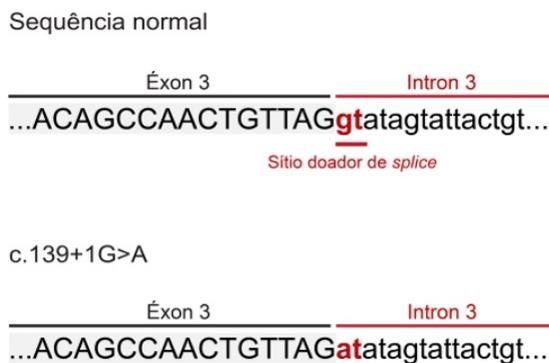


Figura 44. Representação da possível exclusão do sítio doador de *splicing* causado pela variante candidata na família *Isr04* (Elaborado pelo autor).

O processo de *splicing* alternativo necessita do reconhecimento correto das regiões codificantes (éxons), permitindo assim a síntese do mRNA. Dentre os processos, dois são os principais mecanismos de reconhecimento utilizados pela maquinaria de *splicing*. No primeiro deles, comum em células eucariotas de organismos menos complexos, os fatores de *splicing* *U1 snRNP* reconhece o sítio doador de *splicing* na região 5' (*5' Splice Donor Site*) do íntron, enquanto os fatores *U2AF* e *U2 snRNP* reconhecem/interagem com a sequência de pirimidinas na posição 3' do íntron (trato polipirimidínico) e com o ponto de ramificação (*BS*, do inglês *Branch Site*). Isso irá permitir a formação do complexo de *splicing*, que removerá o íntron do pré-mRNA. O outro mecanismo ocorre pelo reconhecimento do éxon, sendo o mecanismo mais comum de remoção de íntrons em células eucariotas de organismos mais complexos. Neste, proteínas ricas em serina e arginina (do inglês *SR proteins*) interagem com regiões facilitadoras de *splicing* (*ESE*, do inglês *Exonic Splicing Enhancers*), recrutando os fatores de *splicing* *U1* para o sítio doador de *splicing* no final do éxon, enquanto o fator *U2AF* interage com trato pirimidínico no início deste mesmo éxon. Este processo cria um complexo de reconhecimento denominado “*cross-exon*”, posicionando a maquinaria de *splicing* nos devidos sítios doador e aceitor de *splicing*, processando o transcrito (AST, 2004; RUSKIN; ZAMORE; GREEN, 1988).

Assim sendo, foram consideradas três hipóteses para as análises *in silico* do efeito da variante c.139+1G>A no gene *SLC12A6* (figura 45). Na primeira e mais provável delas, ocorreria a exclusão por completo dos 45 pb do terceiro éxon. Devido ao comprimento deste ser múltiplo de três, não ocorreria a troca no quadro de leitura dos códons, gerando uma proteína com 1.076 aminoácidos. Na segunda hipótese ocorreria a retenção do terceiro íntron, com 14.324 pb, no transcrito. Este fenômeno

poderia inserir um códon de terminação prematuro logo após o resíduo 106 do polipeptídeo. Já a última hipótese corresponde à utilização de outro sítio de *splicing* reconhecido pela maquinaria envolvida na transcrição, podendo ser identificado apenas por estudos funcionais.

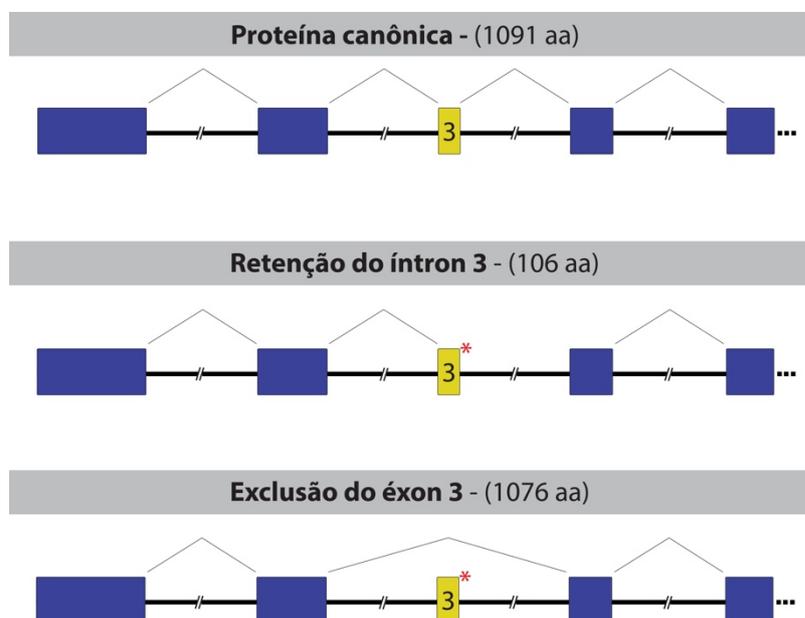


Figura 45. Esquemática do possível efeito da variante c.139+1G>A no gene *SLC12A6*. O local da variante está indicado pelo asterisco vermelho. Para esta análise, foi utilizada a isoforma Q9UHW9-5 do gene *SLC12A6* (Elaborado pelo autor).

Análises complementares referentes ao efeito da variante nos sítios de *splicing* foram realizadas utilizando as ferramentas *Human Splice Finder 3.0* (DESMET et al., 2009), *Sroogle* (SCHWARTZ; HALL; AST, 2009), *SpliceAid 2* (PIVA et al., 2012) e *Fruitfly* (REESE et al., 1997). Para isso, os sítios de *splicing* tanto da sequência normal quanto da sequência contendo a variante foram checados. Impreterivelmente, todas as análises *in silico* apontaram à abolição do sítio doador de *splicing* causado pela variante, assim como a região facilitadora de *splicing* reconhecida pela proteína *ZRANB2*. Os *zinc fingers* que compõem esta proteína do tipo *SR-like* são responsáveis pelo reconhecimento da sequência *AGguau* do sítio doador de *splicing* das moléculas de RNA fita simples, permitindo o processamento correto do pré-mRNA (LOUGHLIN et al., 2009).

Para comprovar o efeito predito, os indivíduos da família foram convocados novamente e suas amostras foram coletadas para a extração do *mRNA*. Por meio do *RT-PCR*, o cDNA dos familiares foi sintetizado, utilizando um *primer forward*,

complementar a sequência do éxon 2, e um *primer reverse*, complementar a sequência contida no éxon 6. Assim, o mRNA contendo o terceiro éxon apresentou o fragmento de 339 pb, enquanto a ausência deste éxon gerou fragmentos de 294 pb (figura 46A). Todos estes resultados foram validados por sequenciamento de Sanger (figura 46B).

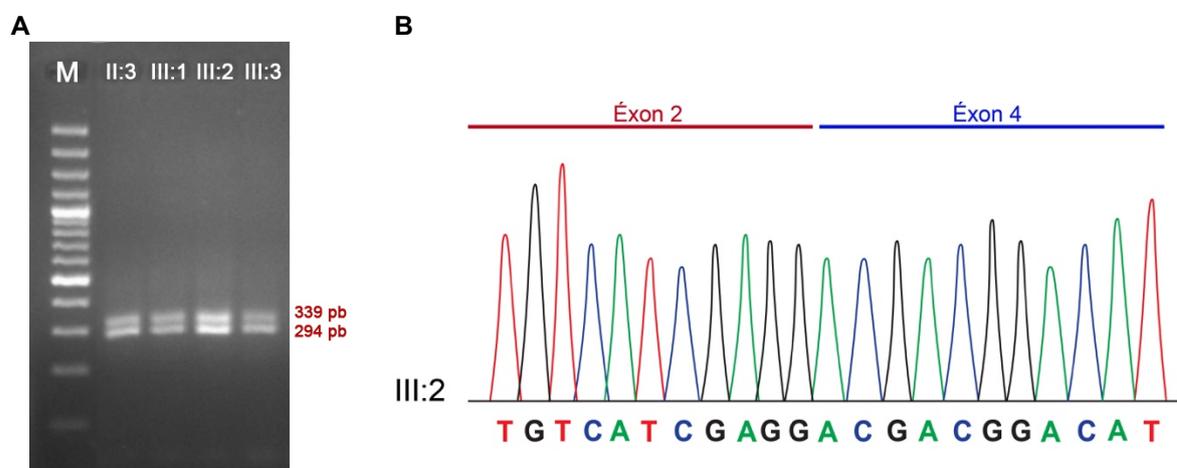


Figura 46. Análise do fragmento de cDNA da família *Isr04* para detecção da ausência do éxon 3 no transcrito do gene *SLC12A4*. **A:** Primeira banda (339 pb) representa o alelo normal, já a segunda banda (294 pb) representa o transcrito gerado pelo alelo contendo a variante c.193+1G>A. *M:* Marcador molecular *1 kb Plus DNA Ladder* (Thermo Fisher Scientific, EUA); **B:** Sequenciamento de Sanger do fragmento de cDNA amplificado por *RT-PCR*, confirmando a exclusão do éxon 3 do transcrito.

Por se tratar de uma variante nunca antes descrita, a análise de frequência da variante foi realizada, por *RFLP-PCR* e utilizando a endonuclease *EcoRV*, em 155 indivíduos iemenitas, 130 indivíduos de diversas populações e 137 indivíduos com perda auditiva comprovada, mas de etiologia desconhecida. Nenhum indivíduo apresentou a variante candidata da família *Isr04*.

Objetivando analisar o efeito da variante em células *in vitro*, dois plasmídeos *pcDNA 3.1* tiveram o cDNA do gene *SLC12A6* clonado, sendo o plasmídeo contendo a sequência normal marcado por *GFP*, enquanto que a sequência com a variante foi clonada com um plasmídeo contendo o marcador *mCherry*. Os plasmídeos foram transfectados em células *COS7*, permitindo a análise da localização sub celular da proteína afetada. Para isso, foram transfectados (i) o plasmídeo *pEGFP_SLC12A6_Nor*, (ii) o plasmídeo *pmCherry_SLC12A6_Δexon3* e (iii) ambos plasmídeos. Com isso, foi possível visualizar a localização da proteína

normal (sendo usada como um marcador para membrana citoplasmática) e comparar a localização da proteína sem o terceiro éxon. Após a realização dos experimentos em duplicata técnica e triplicata biológica, foi possível verificar a proteína contendo a variante candidata na membrana citoplasmática e no retículo endoplasmático, assim como a proteína normal (figura 47).

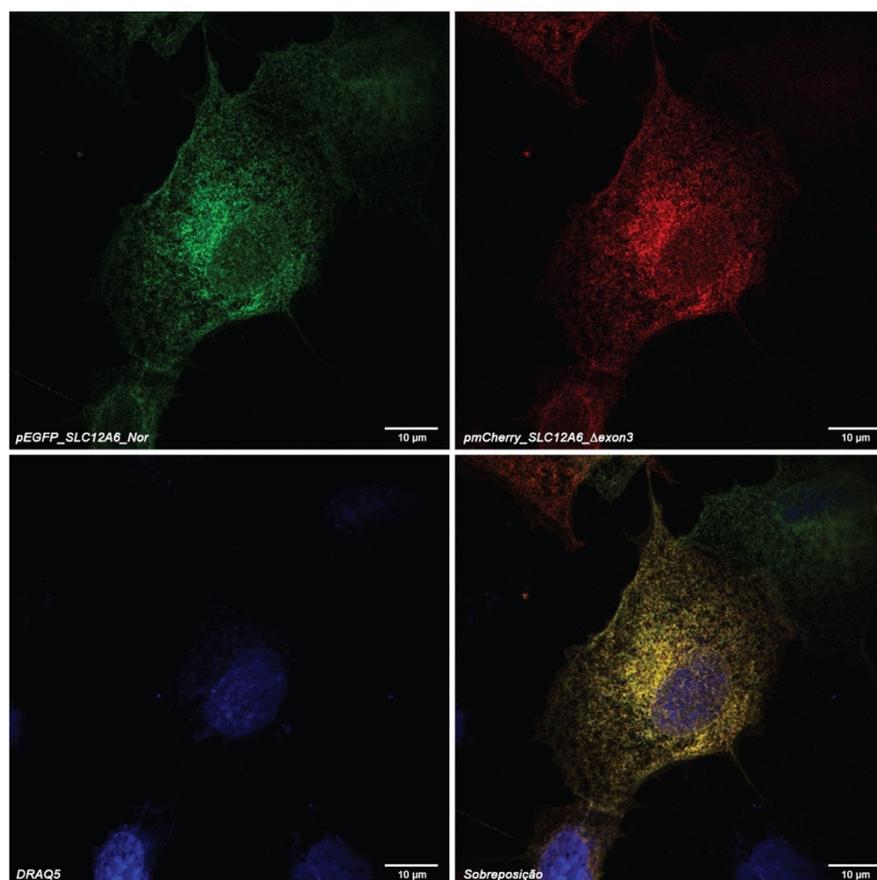


Figura 47. Microscopia confocal de células *COS7*. Tanto o alelo normal (*EGFP*/verde) quanto o contendo a variante (*mCherry*/vermelho) estão localizados no interior da célula e na membrana citoplasmática. *DRAQ5* representar o núcleo celular.

Os canais K^+/Cl^- formam dímeros com diferentes isoformas e proteínas da mesma família. Este fenômeno foi identificado previamente em um estudo envolvendo dímeros formado por duas proteínas, *SLC12A6* e *KCC2*, sendo a primeira normal e a segunda um polipeptídeo não funcional. Isto permitiu a observação do efeito dominante negativo causado pela polipeptídeo *KCC2* não funcional (DING; PONCE-CORIA; DELPIRE, 2013). Assim, no nosso caso estudado, há a possibilidade da

proteína sem o éxon 3 estar afetando a disponibilidade da proteína normal, assim como sua função.

Experimentos eletrofisiológicos foram realizados para examinar o fluxo dos íons de cloreto. Este experimento foi realizado pela aluna Maria Birkan em colaboração com o laboratório do Prof. Bernard Attali, do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da Universidade de Tel Aviv (Tel Aviv, Israel). Para isso, foram utilizadas células de ovário de *hamster* (*CHO*, do inglês *Chinese Hamster Ovary*), conhecidas por não gerar nenhum tipo de corrente endógena. Ambos plasmídeos (normal e com a variante) foram transfectados com *CIC-2_Δ_16-61*. Esta estratégia teve de ser adotada uma vez que a proteína *SLC12A6* não é considerada uma bomba eletrogênica, pois permite a passagem tanto de íons de cloreto (Cl^-) quanto de potássio (K^+). Assim sendo, o uso de *CIC-2_Δ_16-61* manteve as proteínas de membrana constitutivamente abertas, permitindo a análise de corrente neste experimento. As correntes foram medidas por protocolo de rampa de tensão, onde houve o avanço de -100mV a + 20mV (400msec), com potencial de retenção de -40mV, permitindo observar o potencial iônico reverso e comparar a concentração iônica intra e extracelular. Em uma única célula foi possível verificar que o potencial *VCl* estava hiper-polarizado a partir de -38mV (proteína normal) até -44mV (proteína contendo a variante) (figura 48A), permitindo identificar uma maior passagem de Cl^- pela proteína contendo a variante. Após análise dos resultados de 18 células pode-se concluir que a média *VCl* da proteína normal e da proteína contendo a variante foi de -35.4 ± 1.37 e -41.7 ± 1.69 pA, respectivamente ($p=0.015$) (figura 48B).

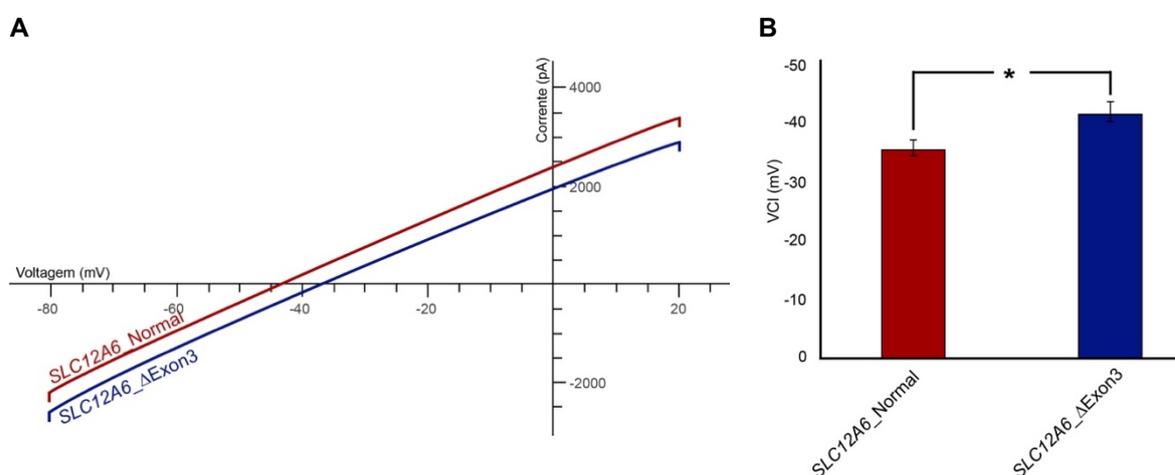


Figura 48. Análise eletrofisiológica da proteína *SLC12A6* normal e contendo a variante c.139+1G>A. **A:** Resultados da análise de rampa de tensão (de -80mV até 20mV); **B:** Valores médios do potencial

reverso de cloreto (mV±SEM) de 18 células *CHO* expressando a proteína normal (n=9) ou sem o terceiro éxon (n=9) (P<0,05).

Este ganho de função pela proteína sem o terceiro éxon pode aumentar a concentração extracelular de K^+ , desestabilizando o potencial de resistência da membrana e causar danos significativos em neurônios e células ciliadas (JOHNSTONE et al., 1989).

Observando ambos experimentos, a provável resposta para o efeito da variante estaria na função reduzida devido à menor disponibilidade destes canais na membrana citoplasmática. Em uma tentativa de suprir este efeito, a variante candidata, assim como outras proteínas de membrana, estaria permitindo maior fluxo de Cl^- e K^+ (ganho de função), interferindo na homeostase iônica de K^+ da orelha interna, fundamental para o processo de mecanotransdução.

Mutações neste gene estão associadas à síndrome de Andermann, porém o diagnóstico clínico nesta família excluiu tal possibilidade. Outro fator que corrobora com a hipótese da variante causar o fenótipo é devido à perda auditiva progressiva, identificada em camundongos *knockout* para este gene (BOETTGER et al., 2002, 2003).

Assim sendo, as análises permitiram a associação de um novo gene com a perda auditiva em humanos, sendo o gene responsável pelo fenótipo da família *Isr04*. Demais estudos estão em andamento para melhor suporte destes resultados.

4.1.5. Família *Isr05*

A família *Isr05*, proveniente da Síria, apresentava quatro gerações com alguns casos de consanguinidade (figura 49A). Três indivíduos da última geração desta família apresentavam perda auditiva congênita bilateral profunda (figura 49B), com ausência das ondas no exame de potenciais evocados auditivos de tronco encefálico, indicando uma possível neuropatia auditiva.

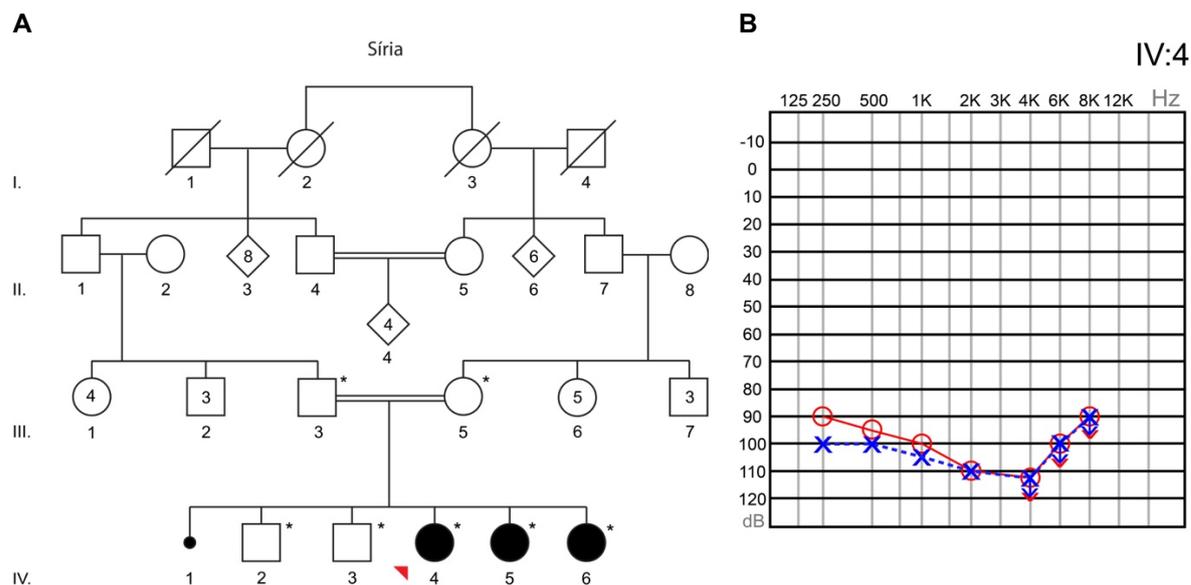


Figura 49. Informações sobre a família *Isr05*. **A:** Heredograma da família. Os asteriscos indicam indivíduos que participaram da pesquisa. O probando IV:4, indicado pela seta vermelha, foi submetido ao sequenciamento paralelo massivo pelo painel *HEar-Seq v3*; **B:** Audiometria tonal por via aérea do indivíduo IV:4, indicando perda auditiva bilateral profunda. “O” vermelho: orelha direita; “X” azul: orelha esquerda.

Por se tratar de uma família com casos de casamento consanguíneo, inclusive entre os pais dos indivíduos afetados, a principal hipótese foi da variante causadora do fenótipo estar segregando com o padrão autossômico recessivo. Além desta informação, o diagnóstico clínico dos pacientes afetados era de neuropatia auditiva. Assim sendo, foram analisadas possíveis variantes candidatas no principal gene causador deste tipo de fenótipo, o gene *OTOF*, associado ao locus DFNB9.

O sequenciamento paralelo massivo do indivíduo IV:4 não apresentou nenhuma variante me homozigose no gene *OTOF*. Porém, este indivíduo apresentou duas variantes em heterozigose composta (tabela 20), ambas ocorrendo em sítios de *splicing*.

Tabela 20. Variantes candidatas identificadas na família *Isr05* e principais resultados das análises de predição *in silico*.

Gene e Transcrito	Variante (cDNA)	PhyloP	Genótipo
<i>OTOF</i>	c.4227+1G>T	1,1018	0/1:155,174
<i>NM_194248</i>	c.5193-1G>A	1,105	0/1:55,56

Presente na região cromossômica 2p22-p23, o gene *OTOF* apresenta 101.496 pb arranjados em 48 éxons, sendo os primeiros 19 éxons comuns a todas isoformas, que podem variar devido ao *splicing* alternativo. A sua maior isoforma, também considerada canônica, apresenta um transcrito com 7156 pb e uma proteína de 1997 aminoácidos (*Uniprot ID*: Q9HC101). Este gene codifica a proteína citosólica denominada Otoferlina, expressa no cérebro, no sistema vestibular e nas células ciliadas internas e externas (YASUNAGA et al., 2000). Pertencente à família das Ferlinas, a Otoferlina consiste em uma região transmembrânica e seis domínios citoplasmáticos C2 (A-F) (figura 50). Estima-se que esta proteína apresente papel importante nas sinapses entre as células ciliadas internas e o nervo auditivo, além de interagir com íons de cálcio, implicando na exocitose e fusão das vesículas sinápticas dependentes de cálcio (DULON et al., 2009; ROUX et al., 2006).

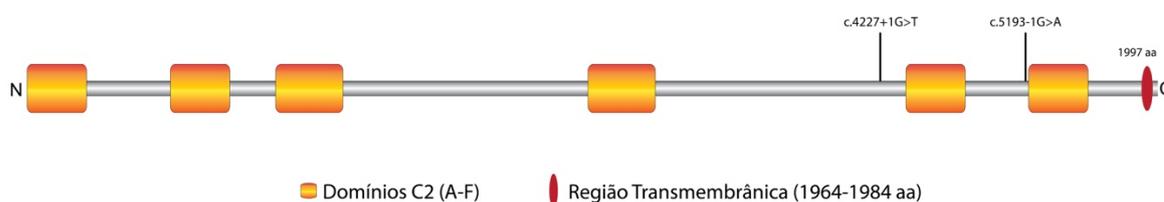


Figura 50. Esquematização das variantes candidatas da família *Isr05* na Otoferlina (Isoforma canônica – *Uniprot ID*: Q9HC10-1) (Elaborado pelo autor).

Mutações neste gene estão associados ao locus DFNB9 e apresentam fenótipo de perda auditiva congênita bilateral severa/profunda. Até o momento, mais de 115 mutações já foram relatadas neste gene, na grande maioria sendo casos identificados em uma única família (STENSON et al., 2017).

A variante c.5193-1G>A (*rs111033373*) já havia sido relatada e associada ao locus DFNB9 pelo laboratório de medicina molecular do grupo *Partners Healthcare Personalized Medicine*. Esta variante encontra-se no último nucleotídeo do íntron 41. Embora não haja estudo funcional para esta variante, acredita-se que possa causar a perda do sítio acceptor de *splicing* (3'SS, do inglês 3' Splice Site) (figura 51).

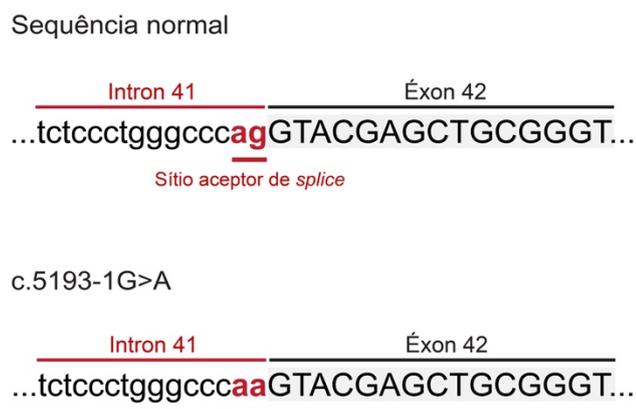


Figura 51. Representação da predição de exclusão do sítio acceptor de *splicing* causado pela variante c.5193-1G>A na família *Isr05* (Elaborado pelo autor).

Análises complementares referentes ao efeito da variante nos sítios de *splicing* foram realizadas utilizando as ferramentas *Human Splice Finder 3.0* (DESMET et al., 2009), *Sroogle* (SCHWARTZ; HALL; AST, 2009), *SpliceAid 2* (PIVA et al., 2012) e *Fruitfly* (REESE et al., 1997). Para isso, os sítios de *splicing* tanto da sequência normal quanto da sequência contendo a variante foram checados. Assim como no estudo da variante candidata da família *Isr04*, todas as análises *in silico* apontaram à abolição do sítio acceptor de *splicing* causado pela variante, principalmente a região facilitadora de *splicing* reconhecida pela proteína *ZRANB2*. Os *zinc fingers* que compõem esta proteína do tipo *SR-like* são responsáveis pelo reconhecimento da sequência *AGguau* do sítio doador de *splicing* das moléculas de RNA fita simples, permitindo o processamento correto do pré-mRNA (LOUGHLIN et al., 2009).

A provável exclusão do sítio acceptor de *splicing* permitiu-nos criar três possíveis hipóteses para o efeito da variante c.5193-1G>A (figura 52). Na primeira delas, haveria a remoção do éxon por completo. Devido este éxon apresentar 99 nucleotídeos, a sua remoção não alteraria o quadro de leitura da proteína. Assim, a isoforma gerada seria curta, com 33 aminoácidos a menos quando comparada à versão canônica. A segunda, embora menos provável, ocorreria a retenção do íntron 41 no transcrito. Por se tratar de um íntron com 1301 pb, a sua inserção no transcrito trocava o quadro de leitura da proteína a ser traduzida, inserindo um códon prematuro de parada da tradução após o resíduo 1731 (p.Tyr1732*). Esta posição corresponde ao último aminoácido do éxon 41, ou seja, as primeiras três bases nitrogenadas do

íntron 41 (UGA), correspondem à um códon de terminação. A terceira hipótese, e que não pode ser predita, seria a utilização de regiões alternativas de *splicing* alternativo.

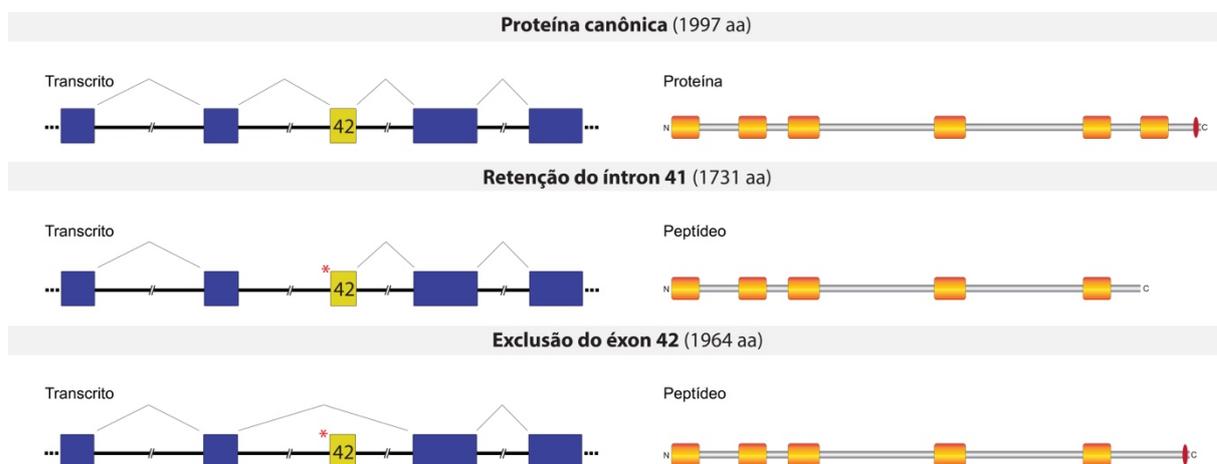


Figura 52. Esquematização do possível efeito da variante c.5193-1G>A no gene *OTOF* (Uniprot ID: Q9HC101). O local da variante está indicado pelo asterisco vermelho (Elaborado pelo autor).

A segunda variante identificada no indivíduo afetado desta família, c.4227+1G>T, não havia sido relatada na literatura ou em banco de dados públicos até o momento. Assim como a variante c.5193-1G>A, esta variante foi analisada manualmente e pelas ferramentas de predição *in silico* de *splicing*. Tanto o *Human Splice Finder 3.0* (DESMET et al., 2009), quanto *Sroogle* (SCHWARTZ; HALL; AST, 2009), *SpliceAid 2* (PIVA et al., 2012) e *Fruitfly* (REESE et al., 1997) indicaram, como resultado de sua predição, a abolição do sítio doador de *splicing* do íntron 34 (figura 53) devido à alteração da região AAGGUG. Esta sequência é fundamental para o reconhecimento e interação da proteína *SR SF2/ASF*, assim como das ribonucleoproteínas nucleares heterogêneas (*hnRNP*, do inglês *heterogeneous nuclear ribonucleoproteins*) *hnRNP A1*, *hnRNP H1*, *hnRNP H2*, *hnRNP F* e *hnRNP H3*, que interagem com o pré-mRNA antes da formação do espliceossomo (MASUDA et al., 2008; ROOKE et al., 2003).

A análise de segregação de ambas variantes nesta família indicou a presença em heterozigose composta apenas nos indivíduos afetados (IV:4, IV:5 e IV:6). Os progenitores III:3 e III:5 apresentaram apenas uma das variantes em heterozigose. Os indivíduos IV:2 e IV:3 não apresentavam perda auditiva, porém o indivíduo IV:3 era portador da mutação c.5193-1G>A (figura 55).

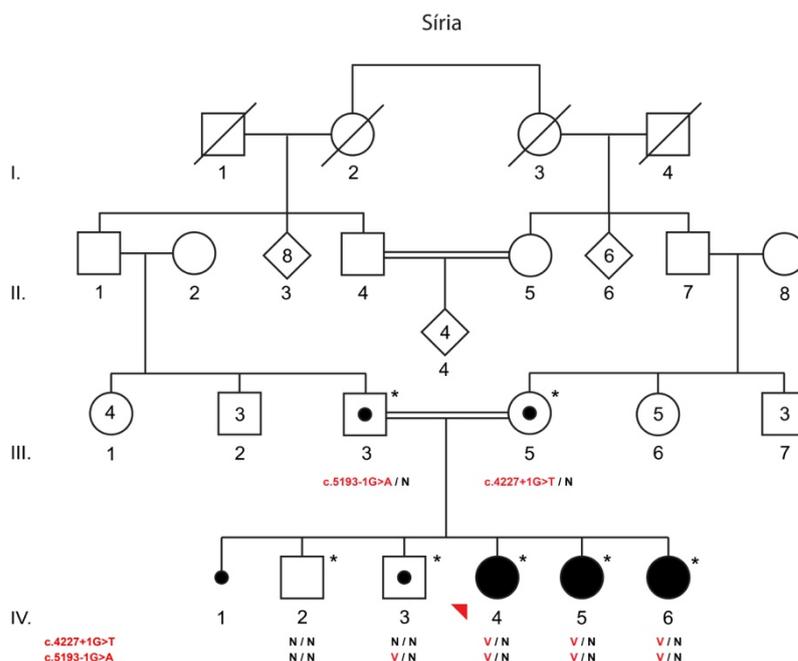


Figura 55. Resultados de segregação das variantes candidatas no gene *OTOF* na família *Isr05*.

De acordo com a predição *in silico* da variante candidata c.4227+1G>T, o transcrito poderia gerar um polipeptídeo mais curto, quando comparado a sequência canônica. Independente da predição, sendo a inclusão do íntron 34 no transcrito ou a exclusão do éxon 34, o polipeptídeo sofreria a redução de 2 domínios C2 (C2E e C2F), além de perder a região transmembrânica, próximo à região C-terminal. Já no caso da variante c.5193-1G>A, a inclusão do íntron 41 geraria um polipeptídeo de 1731 aminoácidos, excluindo o último domínio C2, e a região transmembrânica. A exclusão completa do éxon 42 também causaria efeitos no último domínio C2. Isto pois, na versão canônica da proteína, o primeiro resíduo deste éxon encontra-se na posição 1730. Assim, a remoção de seus 33 aminoácidos (1730-1763 aa) removeria a porção inicial do domínio C2F (1733-1863 aa), o que poderia afetar a funcionalidade de ligação com Ca^{2+} . Não é de se descartar que ambas variantes gerem um polipeptídeo não funcional, sendo degradado posteriormente. Para comprovar tais efeitos, demais estudos necessitam ser realizados.

Devido as análises de efeito da variante c.4277+1G>T indicar o encurtamento da proteína, espera-se que esta variante apresente efeito deletério para a patologia. Considerando a exclusão dos dois domínios C2, a capacidade da proteína em interagir com Ca^{2+} seria debilitada. A somar com este efeito, este polipeptídeo gerado não apresentaria região transmembrânica, o que indicaria a ausência deste do seu local esperado, e como consequência, a ausência de função desta isoforma.

Tendo conhecimento que a variante c.5193-1G>A em homozigose apresenta patogenicidade já foi associada à DFNB9, poderíamos esperar duas possibilidades: (i) a inclusão do íntron 41, com a codificação de um polipeptídeo truncado com apenas 1731 e (ii) a presença de uma isoforma com cinco dos seis domínios C2. No primeiro caso, a proteína não estaria ancorada com a membrana citoplasmática, não desempenhando assim a sua função. Considerando este efeito, mais o efeito da isoforma da variante c.4227+1G>T, não haveria qualquer função da proteína Otoferlina, resultado assim na neuropatia auditiva. Ao se levar em consideração o segundo caso (ii), o indivíduo afetado desta família teria uma isoforma não funcional (c.4227+1G>T) e uma isoforma com atividade de ligação com Ca^{2+} reduzida, não suprimindo a necessidade do tecido (efeito de haploinsuficiência) e causando o fenótipo de neuropatia auditiva. Embora todos os resultados apontem para o efeito patogênico associado a heterozigose composta de ambas variantes, estudos funcionais necessitam ser realizados para a confirmação, além da caracterização se os transcritos estão sendo traduzidos. Tais estudos estão em andamento, e nenhum resultado parcial foi obtido até o momento.

Ambas variantes tiveram sua frequência analisada para identificar se estas poderiam estar presentes em indivíduos não afetados, ou até mesmo identificar novos portadores. Para isso, foram analisados 105 indivíduos sírios, 106 indivíduos de diversas populações e 120 indivíduos com perda auditiva comprovada, mas de etiologia desconhecida. A análise da variante c.4227+1G>T foi realizada por *RFLP-PCR* e a endonuclease *HincII*. Indivíduos sem a variante não apresentavam o sítio de restrição desta variante, já os indivíduos com a variante apresentavam um sítio de restrição, gerando fragmentos de 27 pb e 190 pb (figura 56). Para a análise da variante c.5193-1G>A, os indivíduos foram analisados por sequenciamento de Sanger. Nenhum dos 331 controles (662 cromossomos) apresentou as variantes candidatas da família *Isr05*.

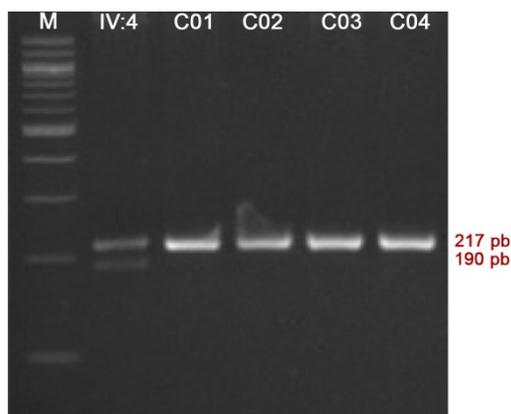


Figura 56. Resultados do *RFLP-PCR* para checagem da frequência da variante c.4227+1G>T do gene *OTOF*. Indivíduos com a variante tiveram o fragmento de 217pb digeridos em dois fragmentos (190pb e 27pb). Indivíduos normais não apresentaram o sítio de restrição da enzima *HincII*. *C0**: Controles. *M*: Marcador molecular *1 Kb Plus DNA Ladder* (Thermo Fisher Scientific, EUA).

A presença de ambas variantes candidatas em heterozigose composta nesta família foi confirmada como causadora da neuropatia auditiva na família *Isr05*. Este achado foi registrado no banco de dados *ClinVar* (National Center for Biotechnology Information, EUA) com o número de acesso 424809, disponível em <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/variation/424809>. A nova variante identificada nesta família, c.4227+1G>T, foi depositado no banco de dados *dbSNP* (National Center for Biotechnology Information, EUA) com o número *rs397515601*.

4.1.6. Família *Isr06*

A família *Isr06*, composta por cinco gerações de judeus asquenazes da Bielorrússia, apresentou cinco indivíduos com o mesmo padrão de perda auditiva não-sindrômica moderadamente severa pós-lingual (segunda década de vida) (figura 57).

A validação das variantes por sequenciamento de Sanger permitiu concluir que as variantes adjacentes na verdade correspondiam à uma única variante, anotada erroneamente. Esta variante, c.1473_1473+2delGGTinsC, excluía a última guanina do éxon 14, assim como os dois primeiros nucleotídeos do íntron 14, GT (sítio doador de *splicing*). Além disso, nesta mesma posição houve a inserção de uma citosina (figura 58A). A análise desta variante nos demais indivíduos da família permitiu identificar a segregação da perda auditiva com o genótipo (figura 58B).

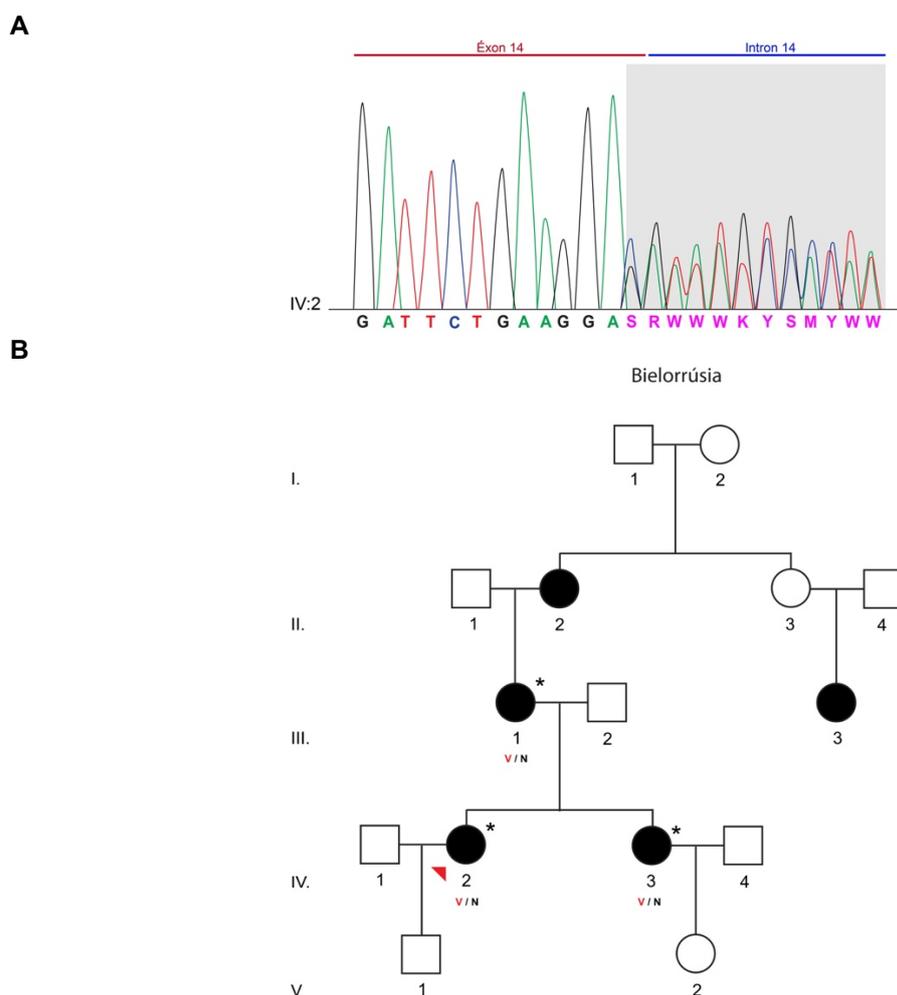


Figura 58. Resultados de validação e segregação da variante c.1473_1473+2delGGTinsC no gene *MYO6*. **A:** Eletroferograma da sequência abrangendo o éxon 14 e íntron 14 do indivíduo IV:2 da família *Isr06*; **B:** Resultados de segregação da variante candidata no gene *MYO6* na família *Isr06*.

As proteínas pertencentes à família das miosinas não-convencionais têm como função a movimentação pelos filamentos intracelulares de actina por meio da hidrólise de *ATP*. Proteínas desta família são subdivididas em pelo menos 24 classes.

Dentre os domínios funcionais, estão a porção motora (N-terminal), relacionada à interação com actina e movimentação, o domínio regulatório, também conhecido como pescoço (do inglês *neck region*), relacionada à intensificação da função pelos domínios presentes e a porção C-terminal, também conhecida como cauda, responsável pela interação com as moléculas alvos a serem transportadas (*CBD*, do inglês *Cargo Binding Domain*) (figura 59). Outra região importante encontrada em miosinas não convencionais é denominada *coiled-coil*. Esta se localiza na região medial da proteína, sendo conhecida por facilitar sua dimerização e oligomerização (ROCK et al., 2001; SPINK et al., 2008; SYAMALADEVI; SPUDICH; SOWDHAMINI, 2012).

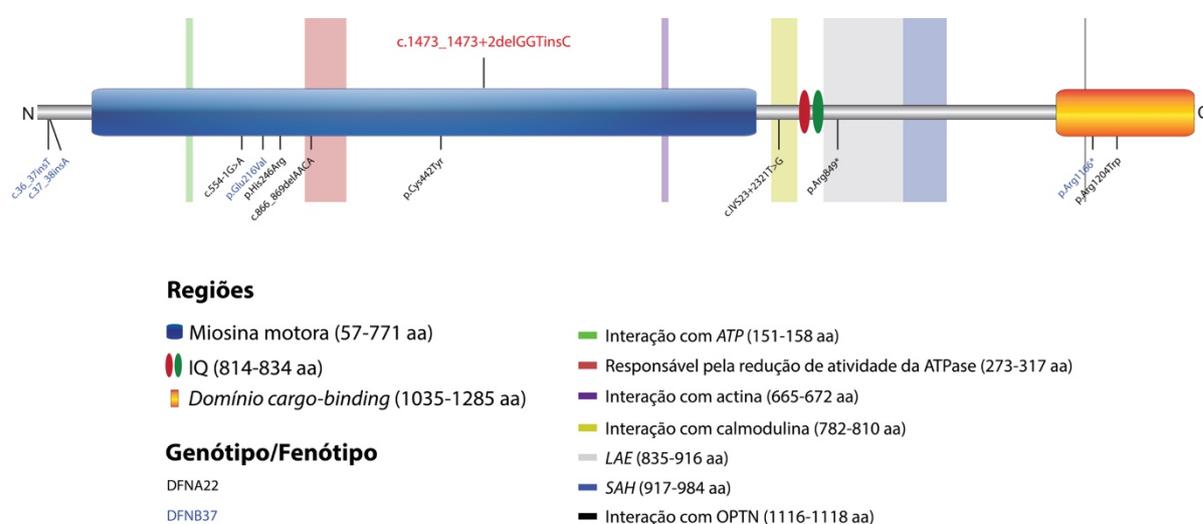


Figura 59. Representação da proteína miosina VI e suas regiões. As variantes já descritas para este gene estão posicionadas na porção inferior do esquema (Elaborado pelo autor).

A Miosina VI, codificada pelo gene *MYO6*, apresenta 1285 aminoácidos (*Uniprot ID*: Q9UM54-3), sendo expressa na região basal dos cílios das CCE e CCI. Como as demais miosinas, esta hidrolisa a molécula de *ATP* e se movimenta pelos filamentos intracelulares de actina. A Miosina VI está envolvida em processos de endocitose, movimentação celular, e reciclagem de metabólitos, sendo diferenciada das demais miosinas motoras por ser a única a se mover na direção da extremidade negativa dos filamentos de actina-F, facilitando a movimentação da RNA polimerase (SYAMALADEVI; SPUDICH; SOWDHAMINI, 2012; WELLS et al., 1999).

Mesmo predita em não apresentar a região *coiled-coil*, a Miosina VI é conhecida por formar homo dímeros. Um estudo envolvendo esta proteína identificou

que sua dimerização se inicia pela interação de dois domínios *CBD*, promovendo a dimerização mais intensa entre os resíduos 913 e 940. Nesta região encontra-se um complexo de três estruturas α -hélices (835-916 aa) denominada *LAE* (do inglês *Lever Arm Extension*), compactadas na forma de monômeros, porém estendidas quando em dímeros. Acredita-se que a forma compacta da Miosina VI está relacionada a sua maior mobilidade devido ao seu tamanho. Outro domínio presente nesta região é o *SAH* (do inglês *single alpha-helix*). Adjacente à *LAE*, este apresenta 63 aminoácidos de comprimento (917-984 aa) e sua rígida estrutura α -hélice simples serve como extensão da cauda da proteína (figura 60) (BABOOLAL et al., 2009; MUKHERJEA et al., 2009; ROCK et al., 2001; SPINK et al., 2008; SYAMALADEVI; SPUDICH; SOWDHAMINI, 2012).

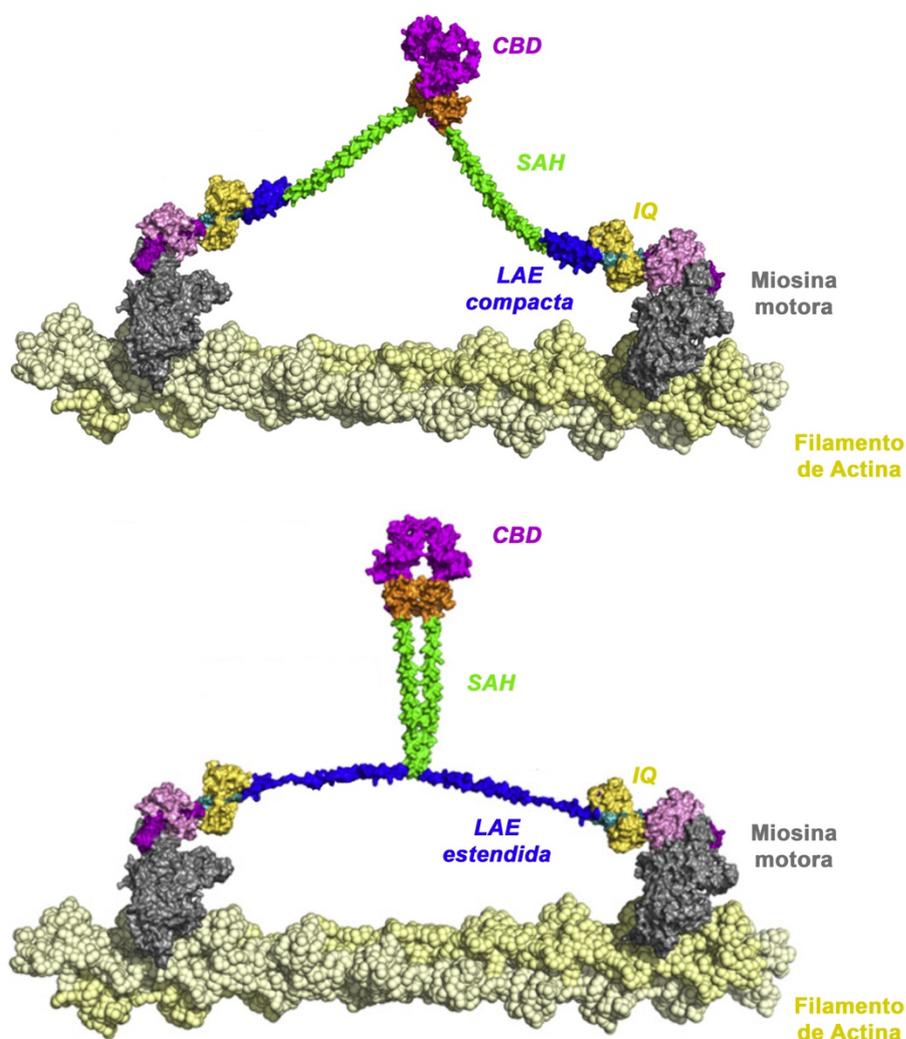


Figura 60. Dimerização da Miosina VI. Processo inicia-se com o reconhecimento do domínio *CBD*, estendendo à região *LAE-SAH* (modificado de MUKHERJEA et al. 2009).

A sua primeira associação com perda auditiva ocorreu em camundongos *Snell's walter (sv) KO* (do inglês *knockout*) para o gene *MYO6*. Nestes, com apenas 12 dias pós-natais, foi possível identificar disfunções vestibulares e perda auditiva profunda causada pela falta total da Miosina VI, fundamental pela integridade e manutenção estrutural dos estereocílios das células cocleares (AVRAHAM et al., 1995). Em humanos, este gene foi associado primeiramente com o padrão de herança autossômico dominante (DFNA22) causado pela mutação c.1325G>A (p.Cys442Tyr) em uma família italiana com perda auditiva severa/profunda progressiva. Esta mutação afeta o resíduo Cis442, região conservada do domínio motor da miosina VI. Por meio de modelagem molecular foi possível predizer o efeito patogênico da mutação devido à desestabilização da proteína e sua perda parcial ou até mesmo completa de função causada por haploinsuficiência ou pelo efeito negativo-dominante (MELCHIONDA et al., 2001). Dois anos após este achado, um estudo envolvendo três famílias paquistanesas com perda auditiva profunda congênita permitiu associar o gene *MYO6* também ao padrão de herança autossômico recessivo em humanos, presente no locus DFNB37 (AHMED et al., 2003b).

Atualmente, se tem conhecimento de 11 mutações no gene *MYO6* em humanos que são responsáveis por perda auditiva autossômica dominante ou recessiva (tabela 22). Além do mais, três modelos de camundongos (*Snell's walter*, *Tailchaser* e *Charlie*) contendo alterações no gene ortólogo da *MYO6* em humanos também estão associados à perda auditiva (AVRAHAM et al., 1995; HERTZANO et al., 2008; WILLIAMS et al., 2013).

Tabela 22. Mutações no gene *MYO6* relacionados à perda auditiva em humanos.

Fenótipo	Variante (cDNA)	Variante (Proteína)	Referência
DFNA22	c.737A>G	p.His246Arg	(MOHIDDIN et al., 2004)
	c.554-1G>A	PTP	(VOLK et al., 2013)
	c.866_869delAACA	PTP	(DVD, 2017)
	c.1325G>A	p.Cys442Tyr	(MELCHIONDA et al., 2001)
	c.2545C>T	p.Arg849* (PTP)	(SANGGAARD et al., 2008)
	c.IVS23+2321T>G	PTP	(HILGERT et al., 2008)
	c.3610C>T	p.Arg1204Trp	(OONK et al., 2013)
DFNB37	c.36_37insT	PTP	(AHMED et al., 2003b)

da proteína *SR SF2/ASF*, assim como das ribonucleoproteínas nucleares heterogêneas *hnRNP H1*, *hnRNP H2* e das demais proteínas *RBM5* (motif ***AGguaa***), *Sam68* e *SLM-2* (motif ***uaau***). Todo este complexo proteico é fundamental para a formação do pré-espliceossomo, que regula o processo de *splicing* alternativo (FARINA; FATTORUSSO; PELLECCIA, 2011; FERACCI et al., 2016; MASUDA et al., 2008; ROOKE et al., 2003; SCHAUB; LOPEZ; CAPUTI, 2007).

A provável exclusão do sítio doador de *splicing* permitiu-nos criar três possíveis hipóteses para o efeito da variante c.1473_1473+2delGGTinsC (figura 62). Na primeira delas, haveria a remoção do éxon 14 por completo. Devido este éxon apresentar 92 nucleotídeos, a sua remoção alteraria o quadro de leitura da proteína, gerando um polipeptídeo com apenas 472 aminoácidos (p.Glu461Glyfs*12). A segunda, embora menos provável, ocorreria a retenção do íntron 14 no transcrito. Por se tratar de um íntron com 2029 pb, a sua inserção no transcrito trocava o quadro de leitura da proteína a ser traduzida, inserindo um códon prematuro de parada na sequência canônica, gerando um polipeptídeo com 499 aminoácidos (p.Glu492Valfs*8). Esta posição corresponde à oitava trinca de nucleotídeos do íntron 14 (UAA), correspondente à um códon de terminação. A terceira hipótese, e que não pode ser predita, seria a utilização de regiões alternativas de *splicing* alternativo.

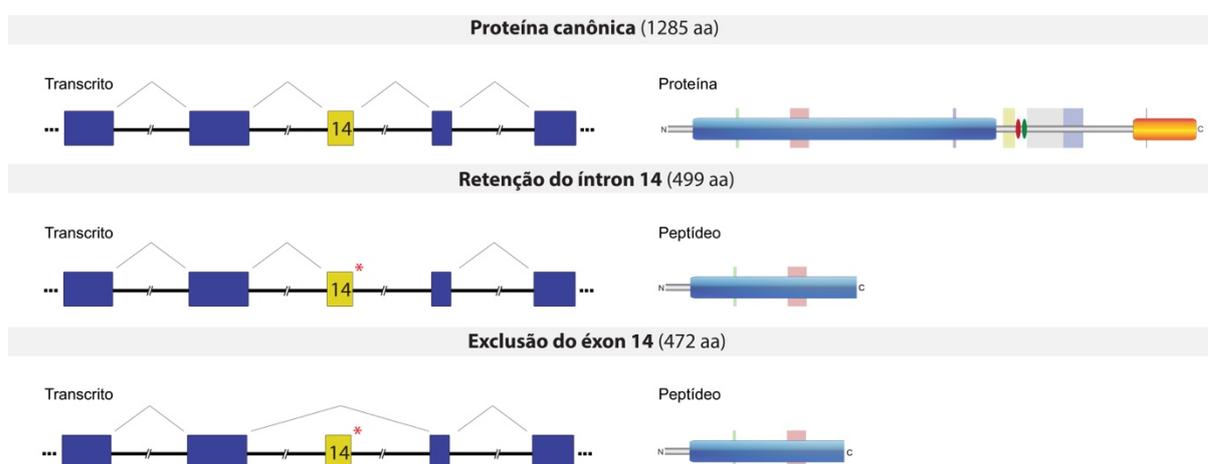


Figura 62. Esquematização do possível efeito da variante c.1473_1473+2delGGTinsC no gene *MYO6*. O local da variante é indicado pelo asterisco vermelho (Elaborado pelo autor).

A análise do efeito da variante candidata foi realizada por meio do sistema *CRISPR/Cas9* e *HDR* (do inglês *Homology Directed Repair*), permitindo inserir com sucesso apenas a variante c.1473_1473+2delGGTinsC gene endógeno *MYO6*. Para

a análise do transcrito contendo a variante, foi realizada a síntese do cDNA referente ao mRNA de células *HEK293T*. A identificação de possível exclusão do éxon 14 ou inclusão do íntron 14 foi realizada por meio sequenciamento de Sanger e *PCR* em tempo real, utilizando combinações de *primers* previamente customizados (figura 28) para identificar a sequência contida no transcrito. Para isso, foram realizadas três reações, (i) utilizando os *primers* 12-13Ex_Fw e 12-13Ex_Rv, (ii) 13-14Ex_Fw e 13-14Ex-Rv e (iii) 13-14Ex_Fw e 15Ex_Rv. O sequenciamento de Sanger do cDNA oriundo do mRNA, assim como a análise por *PCR* em tempo real do transcrito (em duplicata técnica e em triplicata biológica), permitiu verificar a ausência do éxon 14 no transcrito contendo a variante c.1473_1473+2delGGTinsC, além de ter a transcrição reduzida para 1/3 quando comparada ao transcrito contendo a sequência normal (gráfico 2).

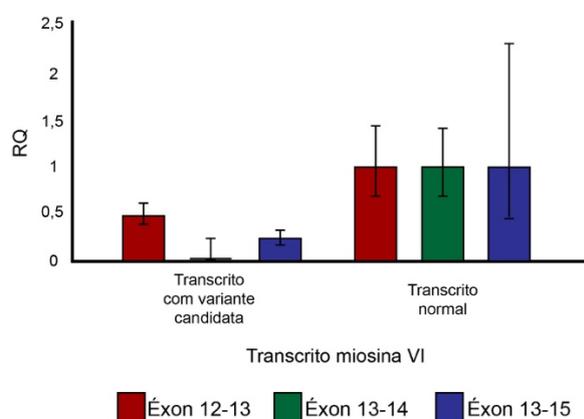


Gráfico 2. Resultados de expressão gênica do transcrito Miosina VI. O transcrito contendo a variante candidata não apresentou amplificação do éxon 14 quando comparado com o transcrito normal.

Como apresentado, o transcrito contendo a variante c.1473_1473+2delGGTinsC acaba por excluir o éxon 14, alterando assim o quadro de leitura, gerando um polipeptídeo de apenas 472 aminoácidos. Considerando o mecanismo de degradação mediada por mutação sem sentido do mRNA em eucariotos (do inglês *nonsense-mediated decay*), espera-se que este transcrito seja degradado ou, caso contrário, codifique um polipeptídeo sem função similar à Miosina VI. A provável redução na expressão de transcrito contendo a variante pode ser explicada pelo fato deste mRNA estar degradado, porém não completamente.

O polipeptídeo truncado de apenas 472 aminoácidos resultaria na extinção da região responsável pela interação dos dímeros (*CBD*, *LAE* e *SAH*), presente na

porção C-terminal da Miosina VI, impossibilitando a interação entre *CBD* de monômeros e a complementar dimerização pela região *LAE/SAH*. Outro fator está relacionado às alterações na porção motora das miosinas. Mutações nesta região podem afetar drasticamente a interação de miosinas com *ATP*, reduzindo ou anulando sua função (BABOOLAL et al., 2009; MUKHERJEA et al., 2009; ROCK et al., 2001; SPINK et al., 2008; SYAMALADEVI; SPUDICH; SOWDHAMINI, 2012).

Assim sendo, pelo fato da Miosina VI ser a única desta família a se mover na direção da extremidade negativa dos filamentos de actina-F, é de se esperar que a redução na sua disponibilidade possa não ser suprida por outro membro desta família, causando o fenótipo de perda auditiva em indivíduos heterozigotos para a variante devido à haploinsuficiência ou efeito dominante negativo (MELCHIONDA et al., 2001; SYAMALADEVI; SPUDICH; SOWDHAMINI, 2012).

Por se tratar de uma variante nova, realizou-se o estudo de frequência da variante. A análise foi realizada por meio da técnica de *RFLP-PCR* utilizando a endonuclease *Mfe* I. Assim, indivíduos com a sequência normal não apresentavam o sítio de restrição, sendo identificados por fragmento de 256 bp. Já os indivíduos contendo a variante apresentavam um sítio de restrição, digerindo o fragmento em dois menores (118 pb e 138 pb) (figura 63). Foram analisados 154 indivíduos judeus asquenazes, 155 indivíduos de diversas populações e 136 indivíduos com perda auditiva comprovada, mas de etiologia desconhecida. Nenhum dos 445 controles (890 cromossomos) apresentou a variante c.1473_1473+2delGGTinsC no gene *MYO6*.

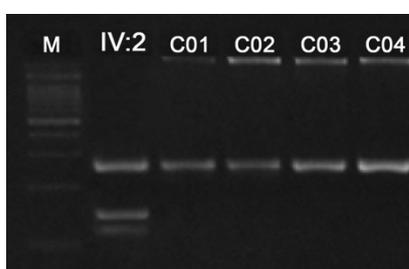


Figura 63. Visualização dos resultados de *RFLP-PCR* da variante candidata da família *Isr06*. O indivíduo com a variante candidata apresentou as bandas 118 pb e 138 pb, enquanto o indivíduo normal apresentou apenas um fragmento com 256 pb. *C0**: Controles. *M*: Marcador molecular *1 kb Plus DNA Ladder* (Thermo Fisher Scientific, EUA).

A presença da nova variante c.1473_1473+2delGGTinsC em heterozigose foi confirmada como a causadora do fenótipo de perda auditiva não-sindrômica autossômica dominante (DFNA22) na família *Isr06*.

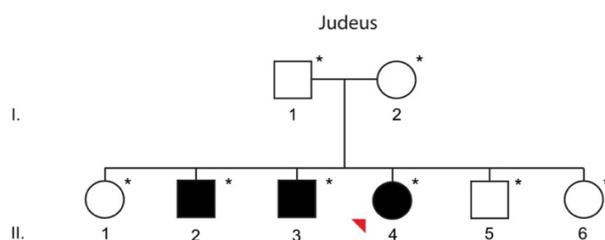
Este achado foi registrado no banco de dados *ClinVar* (National Center for Biotechnology Information, EUA) com o número de acesso 236034 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/variation/236034>), sendo também depositado no banco de dados *dbSNP* (National Center for Biotechnology Information, EUA) com o número *rs878853225*.

4.1.7. Família *Isr08* e *Isr09*

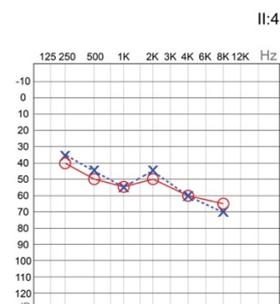
As famílias *Isr08* e *Isr09* apresentaram a mesma variante candidata, além do mesmo fenótipo. Assim sendo, estas serão apresentadas neste mesmo item.

A família *Isr08*, descendente de judeus asquenazes e composta por duas gerações, apresentou perda auditiva congênita neurosensorial bilateral leve/moderada em três indivíduos (figura 64A-64B). Já a família *Isr09*, também descendente de judeus asquenazes e egípcios, apresentou apenas um indivíduo com perda auditiva similar ao da família *Isr08* (figura 64C-64D).

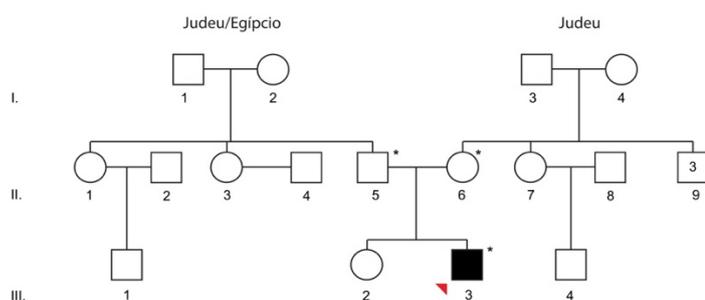
A



B



C



D

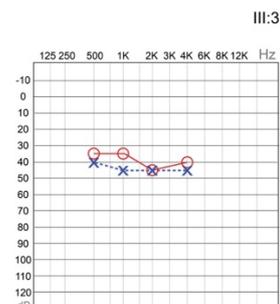


Figura 64. Informações das famílias *Isr08* e *Isr09*. **A:** Heredograma da família *Isr08*. O asterisco indica quais indivíduos participaram da pesquisa. O indivíduo enviado para sequenciamento paralelo massivo (II:4) está indicado pela seta vermelha; **B:** Audiometria tonal por via aérea do indivíduo II:4, indicando perda auditiva bilateral leve/moderada; **C:** Heredograma da família *Isr09*. O asterisco indica quais indivíduos participaram da pesquisa. O indivíduo enviado para sequenciamento paralelo massivo (III:3) está indicado pela seta vermelha; **D:** Audiometria tonal por via aérea do indivíduo III:3, indicando perda auditiva bilateral leve/moderada. “O” vermelho: orelha direita; “X” azul: orelha esquerda.

No caso das duas famílias, os indivíduos II:4 (*Isr08*) e III:3 (*Isr09*) foram submetidos ao sequenciamento paralelo massivo utilizando o painel *HEar-Seq v3*. Considerando o histórico familiar (ausência de perda auditiva nos pais), a principal hipótese foi de herança autossômica recessiva. Para isso, foram priorizadas variantes em homozigose e/ou heterozigose composta. Porém, nenhuma variante possivelmente candidata foi identificada em ambos alelos dos indivíduos sequenciados, tornando a principal busca por variantes em heterozigose composta que pudessem explicar o fenótipo. Neste caso, alterações no gene *STRC* foram consideradas como as principais variantes candidatas.

O gene *STRC* apresenta principal transcrito (NM_153700) de 5680 pb, sendo traduzido na proteína Esterocilina, de 1775 aminoácidos (*Uniprot ID: Q7RTU9-1*). Esta é uma proteína extracelular presente nas regiões apicais das CCE, apresentando duas funções: organização dos estereocílios do feixe ciliado e formação de regiões denominadas “coroas” (do inglês *crowns*); interação com a superfície inferior da membrana tectorial, permitindo assim o correto funcionamento das células CCE na amplificação do sinal sonoro. Alterações deste gene estão associadas com perda auditiva autossômica recessiva (DFNB16), onde estudos envolvendo camundongos *STRC^{-/-}/STRC^{-/-}* comprovaram a importância desta proteína, permitindo identificar a ausência de alinhamento entre os estereocílios das CCE, resultando em um feixe ciliado desorganizado (VERPY et al., 2001, 2008).

A primeira variante, c.4171C>G, resultava na troca do resíduo Arg1391 por uma glicina (p.Arg1391Gly) no gene *STRC*, presente em heterozigose em ambos indivíduos analisados. Os resultados das predições *in silico* indicaram esta variante como possivelmente patogênica, além desta já ter sido relatada como patogênica quando associada à outra variante em heterozigose composta ou grande deleções (FRANCEY et al., 2011).

A segunda variante identificada tratava-se de uma nova deleção de, aproximadamente, 0,1 Mb de comprimento na posição 15q15.3, região esta abrangendo quatro genes, dentre eles o gene *STRC* (figura 65). Outras grandes deleções, entre 70 e 100 kb de comprimento, já foram relatadas nesta região, sendo associadas tanto à casos não-sindrômicos de perda auditiva quanto sindrômicos (síndrome de surdez-infertilidade), causados principalmente pela deleção dos genes *STRC* (responsável pela perda auditiva neurossensorial bilateral leve/moderada) e *CATSPER2* (responsável pela infertilidade em pessoas do sexo masculino) (AVIDAN et al., 2003; HOPPMAN et al., 2013; KNIJNENBURG et al., 2009; ZHANG et al., 2007).

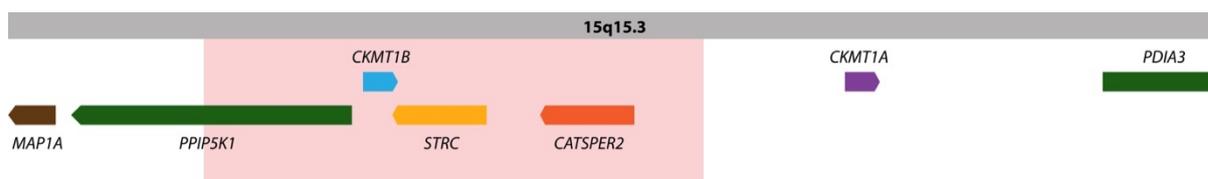
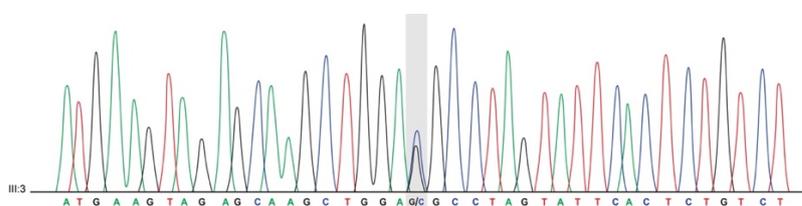


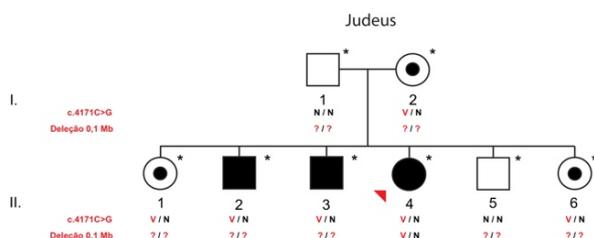
Figura 65. Banda 15q15.3, indicando a região excluída (em vermelho) pela deleção de, aproximadamente, 0,1 Mb identificada em heterozigose tanto na família *Isr08* quanto *Isr09* (Elaborado pelo autor).

A variante c.4171C>G foi validada nas famílias *Isr08* e *Isr09*, estando presente também em heterozigose em indivíduos com audição normal (figura 66). A deleção de 0,1 Mb foi verificada apenas nos probandos, e sua validação nos demais indivíduos das famílias, normais ou afetados, não foi finalizada a tempo hábil da escrita desta tese.

A



B



C

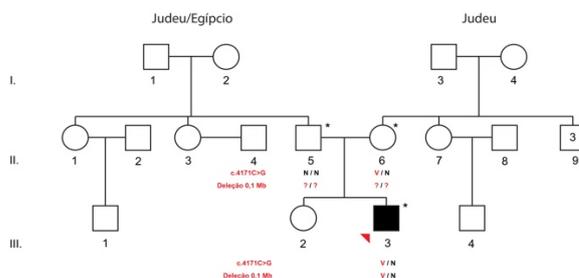


Figura 66. Resultados moleculares das famílias *Isr08* e *Isr09*. **A:** Eletroferograma do indivíduo III:3 da família *Isr09* indicando a mutação c.4171C>G em heterozigose no gene *STRC*. O mesmo padrão foi observado em todos indivíduos heterozigotos para esta mutação; **B:** Resultados das análises de segregação das variantes na família *Isr08*; **C:** Resultados das análises de segregação das variantes na família *Isr09*.

A variante c.4171C>G já havia sido relatada em duas famílias de judeus asquenazes com perda auditiva neurossensorial leve/moderada. Uma das famílias apresentava esta variante em homozigose em todos indivíduos afetados. Na outra família, a variante estava presente em heterozigose composta com uma grande deleção da região 15q15.3, incluindo o gene *STRC*. A constar, esta mutação esteve presente em 0,5% dos 182 judeus asquenazes analisados (FRANCEY et al., 2011).

Com tais resultados identificados nas famílias analisadas, assim como o levantamento da literatura científica envolvendo o locus DFNB16, foi sugerido que a presença da variante c.4171C>G em heterozigose composta com a nova deleção de, aproximadamente, 0,1 Mb são responsáveis pela perda auditiva não-sindrômica autossômica recessiva (DFNB16) nas famílias *Isr08* e *Isr09*.

Este achado foi registrado no banco de dados *ClinVar* (National Center for Biotechnology Information, EUA) com os números de acesso 165311 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/variation/165311>) e 236065 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/variation/236065>).

4.1.8. Família *Isr15*

Proveniente do Irã, a família persa *Isr15* apresentou diversos tipos de perda auditiva leve/moderada entre seus indivíduos, ocorrendo de forma não-sindrômica pós-lingual, uni ou bilateralmente. De seis gerações, 10 indivíduos reportaram algum tipo de perda auditiva (figura 67).

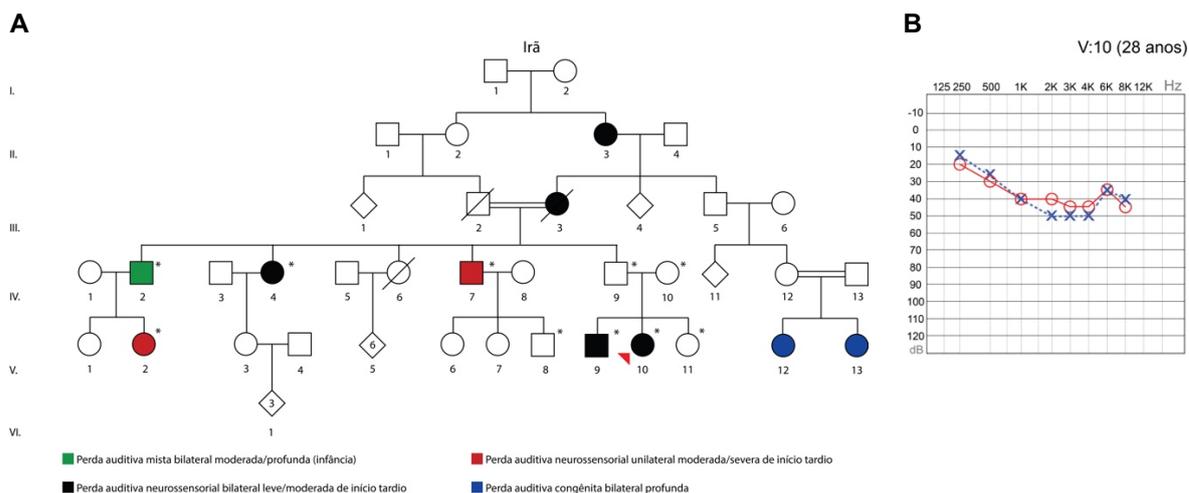


Figura 67. Informações sobre a família *Isr15*. **A:** Heredograma da família. O asterisco indica quais indivíduos participaram da pesquisa. O indivíduo sequenciado pelo painel *HEar-Seq v3* (V:10) está indicado pela seta vermelha; **B:** Audiometria tonal por via aérea do indivíduo V:10, indicando perda auditiva bilateral leve/moderada. “O” vermelho: orelha direita; “X” azul: orelha esquerda.

O indivíduo V:10, que apresentava perda auditiva bilateral neurosensorial leve/moderada, com início durante a adolescência, foi submetido ao sequenciamento paralelo massivo utilizando o painel *HEar-Seq v3*. Embora o fenótipo se assemelhe a casos de perda auditiva autossômico dominante, considerando o histórico familiar e a ausência da perda auditiva nos progenitores, a principal hipótese para análise foi relacionada à herança autossômica recessiva. Assim sendo, a priorização das variantes ocorreu com enfoque nas variantes presentes em homozigose ou heterozigose composta.

A variante c.703C>T, causando a troca do resíduo Arg235 por uma cisteína (p.Arg235Cys), no gene *CEACAM16*, esteve presente em homozigose e foi considerada a principal variante candidata nesta família. Todas análises *in silico* realizadas pelas ferramentas *SIFT* (0,003 D), *PolyPhen* (0,999 P) e *Mutation Taster* (0,99 D) indicaram esta variante como patogênica, assim como também ocorrendo na região conservada, conforme a ferramenta *GERP++* (5,24).

O gene *CEACAM16* apresenta principal isoforma com 1692 pb (NM_001039213), distribuídos em sete éxons, codificando a proteína de adesão *CEACAM16* (do inglês *CarcinoEmbryonic Antigen-related Cell Adhesion Molecule 16*) com 425 aminoácidos (*Uniprot ID: Q2WEN9*). Esta pertence à família de proteínas *CEACAM*, um grupo de glicoproteínas relacionadas às imunoglobulinas com diversas

funções, tais como: arquitetura/homeostase tecidual, crescimento e diferenciação celular, angiogênese e supressão tumoral. A proteína CEACAM16 é uma glicoproteína com dois domínios *Ig-like C2* (tipo 1 e 2) localizada na região apical dos maiores estereocílios das CCE. Esta região está fortemente conectada com a membrana de *Hardesty*, na superfície inferior da membrana tectorial, onde a proteína CEACAM16 interage com a α -tectorina. Além de ser secretada, esta proteína pode ser identificada na forma de monômeros (~50-75 kDa), dímeros (~150 kDa) ou tetrâmeros (>250 kDa) (ZHENG et al., 2011).

Indivíduos com alterações afetando as CCE geralmente apresentam perda auditiva de, aproximadamente, 50-60 dB. Isto pois, as CCE são responsáveis pela amplificação do som oriundo da orelha média, e sem estas, o sinal recebido pelas CCI seria inferior ao esperado (MÜLLER, 2008).

Apenas duas mutações no gene *CEACAM16* foram associados com perda auditiva, sendo ambas responsáveis pela perda não-sindrômica autossômica dominante (DFNA4B). A primeira, c.418A>C (p.Thr140Pro), foi relatada em uma família norte-americana com perda auditiva neurosensorial bilateral moderada pós-lingual (início na adolescência). Esta mutação afetava a região predita de glicosilação da proteína CEACAM16, envolvida nos processo pós-tradução, porém não altera a localização da proteína. Este efeito pode interferir na vida média da proteína, assim como alterar a adesão célula-célula. A segunda mutação, c.505G>A (p.Gly169Arg), foi identificada em uma família chinesa, também com perda auditiva bilateral neurosensorial progressiva de início entre a primeira e segunda década de vida. O aminoácido Gly169, presente no domínio *Ig-like C2*, uma região de *loop* na proteína. Assim sendo, a troca de uma glicina, o menor e mais flexível aminoácido, por uma arginina, com cinco carbonos, pode alterar a flexibilidade do *loop*, interferindo na conformação correta da proteína e na formação de oligômeros (WANG et al., 2015; ZHENG et al., 2011).

Embora associada apenas aos casos autossômicos dominantes, poucos estudos foram realizados com este gene. Assim sendo, a possibilidade deste gene estar associado à perda auditiva autossômica recessiva não pode ser descartada. A variante candidata na família *Isr15* foi validada no indivíduo V:10 por sequenciamento de Sanger, sendo também analisada nos demais indivíduos da família (figura 68).

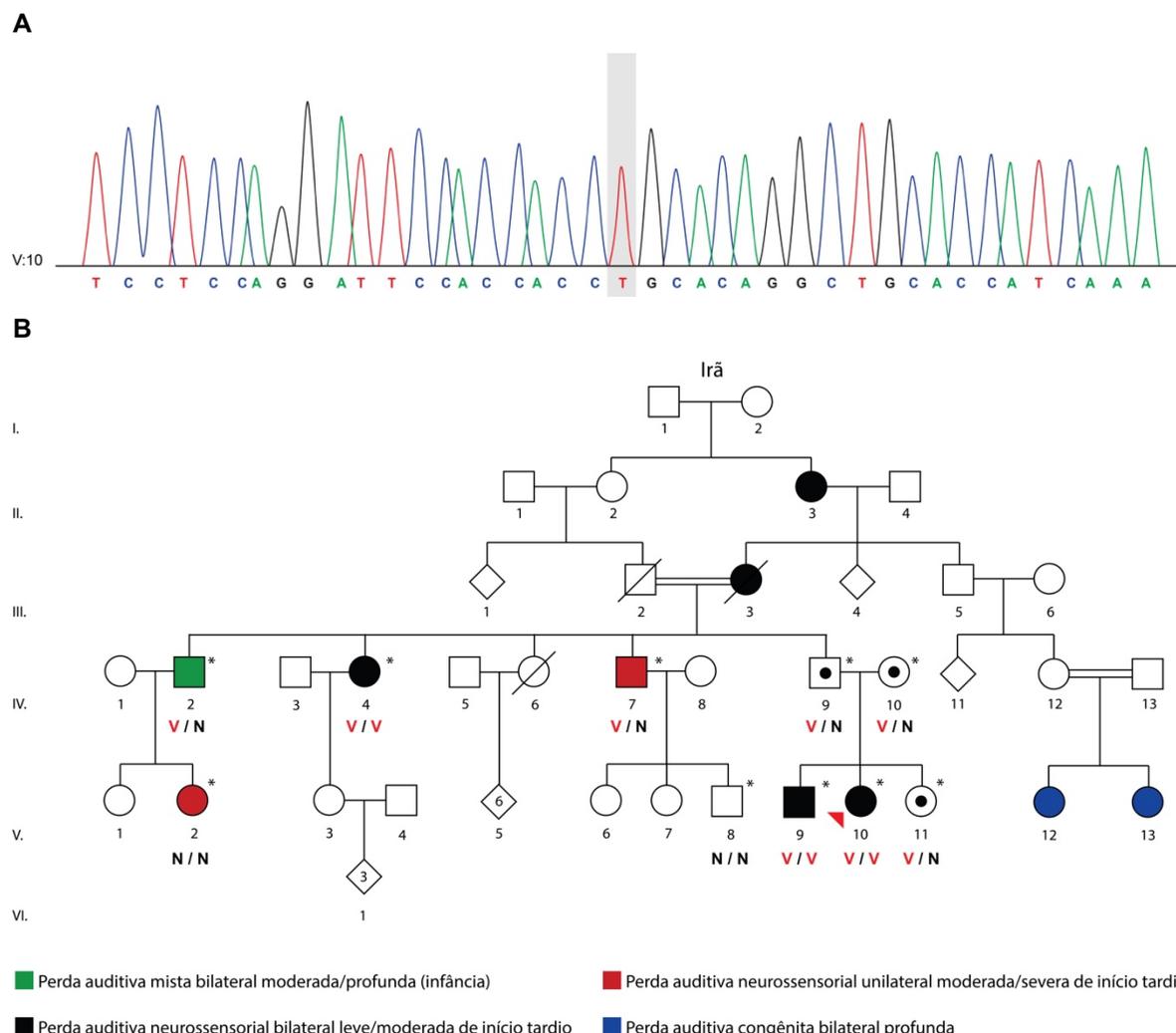


Figura 68. Resultados da análise da variante candidata na família *Isr15*. **A:** Eletroferograma contendo a variante c.703C>T em homozigose no gene *CEACAM16* do indivíduo V:10; **B:** Resultados de segregação da variante candidata na família *Isr15*.

Como identificado, esta variante estava presente não apenas em homozigose, mas também em heterozigose em indivíduos normais e afetados. Embora o gene *CEACAM16* esteja associado com perda auditiva não-sindrômica autossômica dominante (DFNA4), nem todos os indivíduos heterozigotos para a variante c.703C>T apresentaram perda auditiva conforme esperado. Entre os indivíduos heterozigotos, o fenótipo da perda auditiva foi variável: o indivíduo IV:2 apresentou perda auditiva mista desde sua infância; o indivíduo IV:7 apresentou perda auditiva unilateral súbita aos 40 anos de idade e os indivíduos IV:9, IV:10 e V:11 não apresentaram perda auditiva. Entre os indivíduos analisados com ambos alelos normais, o indivíduo V:2 apresentou perda auditiva unilateral de início tardio. Já os

indivíduos homozigotos para a variante analisada (IV:4, V:9 e V:10) apresentaram similaridade na perda auditiva, esta sendo bilateral leve/moderada pós-lingual.

Os indivíduos V:12 e V:13 apresentaram perda auditiva congênita profunda. Infelizmente não foi possível obter amostra de DNA destes indivíduos para checagem da variante candidata. Porém, devido ao fenótipo mais severo, e proveniente de outra união consanguínea, espera-se que a causa da perda auditiva nestes indivíduos possa ser diferente da encontrada na família *Isr15*.

Assim sendo, e considerando o quadro acima, acredita-se que o fenótipo de perda auditiva nos indivíduos V:2, V:12 e V:13, seja causado por diferentes variantes do que observado nos indivíduos IV:4, V:9 e V:10. A perda auditiva nos indivíduos IV:2 e IV:7, assim como a ausência do fenótipo nos indivíduos IV:9, IV:10 e V:11 podem indicar também que a variante c.703C>T esteja associada ao padrão de herança autossômico dominante (DFNA4B) com penetrância incompleta.

Por se tratar de uma variante nunca antes descrita na literatura, foi realizada a análise da frequência desta utilizando sequenciamento de Sanger. Ao todo, foram checados 135 indivíduos provenientes do Irã, 118 indivíduos de diversas etnias e 96 indivíduos com perda auditiva de etiologia desconhecida. Esta variante foi identificada em homozigose em outros três indivíduos iranianos com perda auditiva, segregando com o fenótipo aqui apresentado. Assim sendo, dos 698 cromossomos analisados, esta variante foi identificada em seis cromossomos (0,8596%), todos provenientes de indivíduos persas, o que nos leva a crer que esta variante possa ser comum nesta população devido ao efeito fundador.

A variante c.703C>T pode ser a primeira mutação associando o gene *CEACAM16* também com o padrão autossômico recessivo. A troca do resíduo Arg235 por uma cisteína pode abolir as interações eletrostáticas e de hidrogênio, alterando assim a conformação do *loop* presente no domínio *Ig-like C2*, afetando o posicionamento das folhas-beta adjacentes. Isto pode ocorrer pois arginina é um aminoácido de carga positiva, realizando interações com aminoácidos de carga negativa. Já a cisteína é um aminoácido hidrofóbico, interagindo apenas com outros aminoácidos hidrofóbicos. Além deste fato, muitas glicoproteínas apresentam sua especificidade exatamente na região do *loop*, tornando esta região importante nesta família de proteínas. Neste caso, a presença da variante em ambos alelos pode estar afetando a formação de oligômeros de *CEACAM16*, assim como a interação destes com a α -tectorina, na membrana tectorial. Embora esta variante candidata possa estar

causando perda auditiva autossômica recessiva, estudos funcionais precisam ser realizados para a confirmação do efeito patogênico e a associação deste gene com DFNB.

Este achado foi registrado no banco de dados *ClinVar* (National Center for Biotechnology Information, EUA) com o número de acesso 236048 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/variation/236048>), também depositado no banco de dados *dbSNP* (National Center for Biotechnology Information, EUA) com o número *rs746164064*.

4.1.9. Família *Isr19*

A família *Isr19*, descendente de marroquinos e iemenitas, apresentou três gerações com dois indivíduos afetados com perda auditiva neurossensorial congênita bilateral severa/profunda (figura 69).

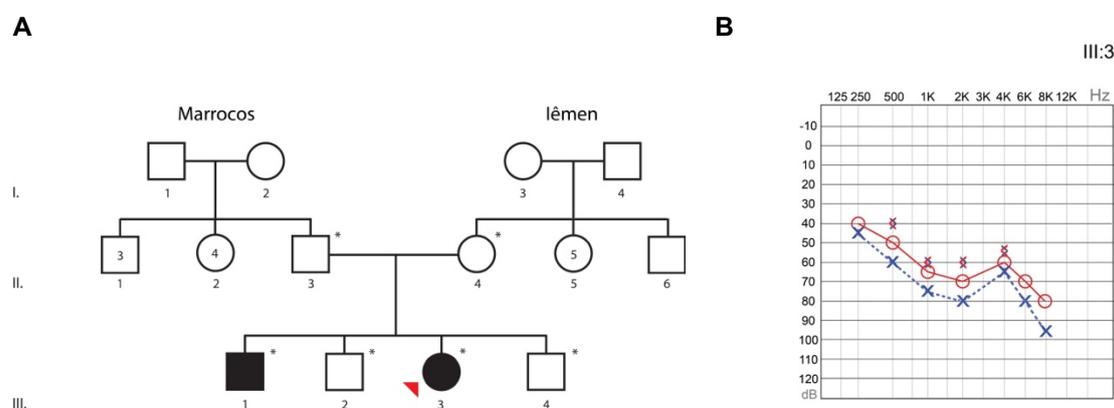


Figura 69. Informações sobre a família *Isr19*. **A:** Heredograma da família. O asterisco indica quais indivíduos participaram da pesquisa. O indivíduo III:3, indicado pela seta vermelha, foi submetido ao sequenciamento paralelo massivo; **B:** Audiometria do indivíduo III:3, indicando perda auditiva neurossensorial bilateral moderada/severa (orelha direita) e severa/profunda (orelha esquerda). Via aérea: “O” vermelho (orelha direita) e “X” azul (orelha esquerda); via óssea “<” vermelho (orelha direita) e “>” azul (orelha esquerda).

O indivíduo III:3 desta família foi submetido ao sequenciamento paralelo massivo pelo painel *HEar-Seq v3*. Por se tratar de um possível caso de herança autossômica recessiva, devido ao histórico familiar, foram priorizadas variantes em homozigose e/ou heterozigose composta que pudessem elucidar a etiologia. Após análise inicial, nenhuma variante candidata em homozigose foi identifica. Assim

sendo, a segunda estratégia adotada foi na priorização de variantes candidatas em heterozigose composta, permitindo destacar duas variantes no gene *COL11A2* como possíveis variantes candidatas. A primeira, uma transição (G/A) na posição 3385 do transcrito NM_080680, resulta na troca do resíduo Glicina1129 por uma arginina (p.Gly1129Arg). A outra variante identificada em heterozigose neste mesmo gene/transcrito correspondia à inserção de uma citosina na posição 966_967 do transcrito (c.966_967insC), resultando na troca do quadro de leitura na posição 323 e inserção de um códon de terminação prematura na posição 341 (p.Thr323Hisfs*19).

O gene *COL11A2* apresenta aproximadamente 28 kb de comprimento distribuídos em 66 éxons. É responsável por codificar o colágeno tipo XI - subunidade $\alpha 2$ (figura 70), sendo expresso em diversas células e tecidos, especialmente na membrana tectorial da orelha interna. Mutações neste gene já foram associadas à perda auditiva síndrômica (Síndromes de *Stickler* não ocular e *OSMED*) e não-síndrômica, podendo ser autossômica dominante (DFNA13) ou recessiva (DFNB53). Proteínas desta família apresentam *motif* de assinatura, uma repetição sequencial de aminoácidos G-X-Y, onde G representa uma Glicina, X e Y são, preferencialmente, uma Prolina e Hidroxiprolina, respectivamente. A região deste *motif* corresponde à tripla-hélice, necessário para a trimerização de moléculas de colágeno. Assim sendo, alteração neste *motif*, principalmente do resíduo de glicina, está associada à perda da flexibilidade desta região, sendo responsável por alterações significativas na função dos colágenos (CHEN et al., 2005; MCGUIRT et al., 1999; VIKKULA et al., 1995).

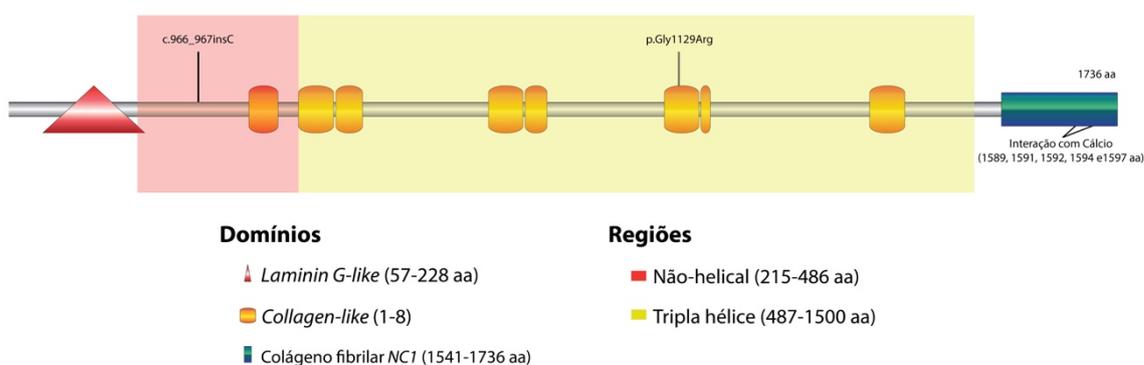


Figura 70. Representação da proteína codificada pelo gene *COL11A2* e suas regiões (Uniprot ID: P13942-1) (Elaborado pelo autor).

Ambas variantes foram validadas, por sequenciamento de Sanger, no probando (III:3) (figura 71).

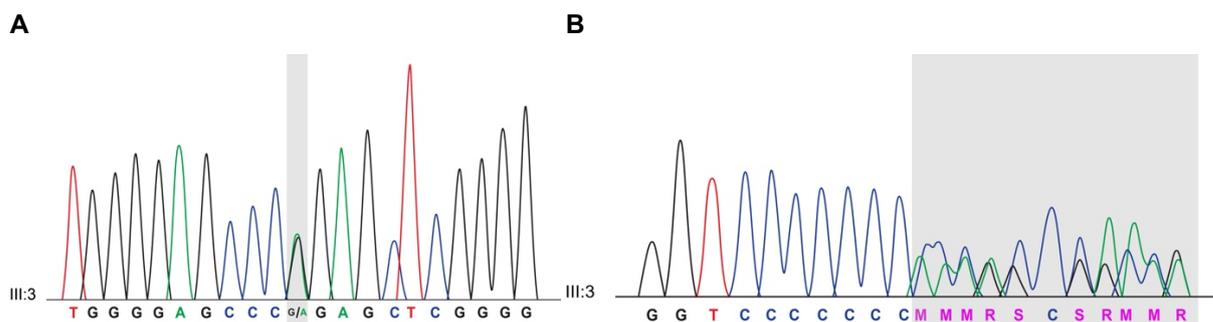


Figura 71. Eletroferogramas das variantes c.3385G>A (A) e c.966_967insC (B), indicando ambas variantes em heterozigose no gene *COL11A2* do indivíduo III:3.

A variante c.3385G>A afeta o resíduo Gli1129, presente dentro da região de tripla hélice do *COL11A2*, além de ser o primeiro resíduo do *motif* conservado característico desta família de proteínas, G-X-Y (figura 72). Os resultados das análises de predição *in silico* pelas ferramentas *SIFT* (0,01 D), *PolyPhen* (1 P) e *Mutation Taster* (0,999 D) indicaram esta como uma variante patogênica.

. . . GPVGPGAAGADGEP**G**ARGPQGHFGAKGDEGTR. . .

Figura 72. Representação da variante p.Gly1129Arg, alterando o primeiro resíduo do *motif* conservado do gene *COL11A2* (marcado em vermelho).

A outra variante candidata identificada no indivíduo III:3, c.966_967insC (rs748440351), é uma variante já relatada e associada à perda auditiva autossômica recessiva. A inserção de uma citosina na posição 966 do cDNA afeta o quadro de leitura do transcrito, inserindo um códon de terminação prematura na posição 341 do polipeptídeo (p.Thr323Hisfs*19). Esta alteração causa a exclusão parcialmente da região não-helical (215-486 aa) assim como a exclusão de todos os domínios *Collagen-like* presentes na região de tripla hélice (487-1500 aa) e a região C-terminal.

As variantes candidatas identificadas no indivíduo III:3 foram também triadas nos demais membros (normais e afetados) desta família, apresentando segregação com o fenótipo de perda auditiva quando presente em heterozigose composta (Figura 73).

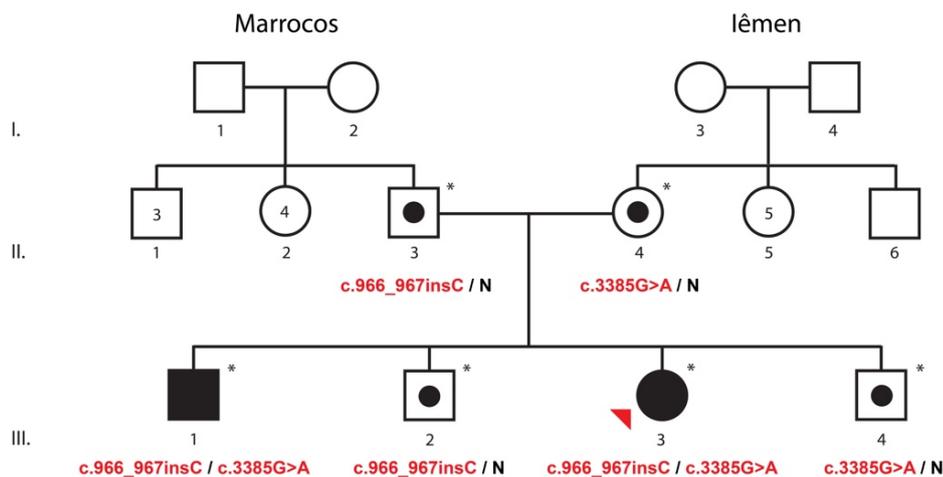


Figura 73. Resultados de validação e segregação das variantes candidatas no gene *COL11A2* na família *Isr19*.

Embora a mutação c.966_967insC já esteja relatada na literatura, a sua frequência na população estudada (Marrocos/Iêmen) era ausente. Assim sendo, foram analisados 108 indivíduos marroquinos/iemenitas para esta mutação, não sendo detectada em nenhum dos indivíduos controles. Pela variante c.3385G>A nunca antes ter sido relatada, análise de frequência foi realizada por meio de sequenciamento de Sanger. Foram analisados 108 indivíduos marroquinos/iemenitas, 105 indivíduos de diversas populações além de 123 indivíduos com perda auditiva de etiologia desconhecida. Dos 672 cromossomos analisados dos controles, esta variante não foi identificada em nenhum alelo.

Assim sendo, a presença das variantes c.966_967insC e c.3385G>A em heterozigose composta foram confirmadas como a causadora do fenótipo de perda auditiva não-sindrômica autossômica recessiva (DFNB53) na família *Isr19*.

4.1.10. Família *Bra01*

A família *Bra01*, proveniente da região sul do Brasil, era composta por indivíduos descendentes de italianos da região de Veneto. Nesta ampla família com cinco gerações, quatorze indivíduos apresentavam algum tipo de perda auditiva (figura 74A). A perda auditiva destes indivíduos obedecia certo padrão, sendo progressiva bilateral profunda em altas frequências, com início entre a infância e quarta década de vida, com uma rápida evolução para perda auditiva profunda em todas frequências em seis anos (figura 74B). Os únicos casos que não seguiam este padrão de perda

auditiva eram os indivíduos III:2 e IV:3, uma vez que apresentavam perda auditiva moderada apenas em altas frequências.

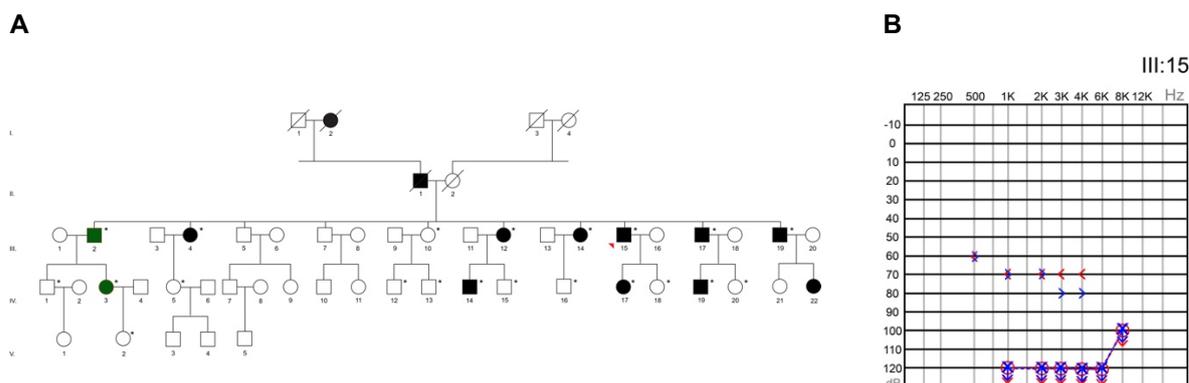


Figura 74. Informações referentes à família *Bra01*. **A:** Heredograma da família. O asterisco indica quais indivíduos participaram da pesquisa. O indivíduo submetido ao WES (III:15) está indicado pela seta vermelha; **B:** Audiometria do indivíduo III:15, indicando perda auditiva mista bilateral profunda e limiar de via óssea com perda auditiva moderadamente severa. Via aérea: “O” vermelho (orelha direita) e “X” azul (orelha esquerda); Via óssea “<” vermelho (orelha direita) e “>” azul (orelha esquerda).

O patriarca desta família (II:1) apresentou início de problemas auditivos com 45 anos de idade, conforme relatado pelos familiares. De doze indivíduos, cinco (III:12, III:14, III:15, III:17 e III:19) receberam implante coclear com cirurgia realizada pelo Hospital das Clínicas da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), Brasil. Todos os cinco indivíduos tiveram melhoras significativas na audição, ficando aptos novamente a comunicar pela linguagem falada.

Todos os indivíduos desta família não apresentaram qualquer variante na triagem molecular primária envolvendo os genes nucleares *GJB2*, *GJB6* e mitocondrial *MTRNR1*. Assim, o indivíduo III:15 foi submetido ao sequenciamento completo do exoma. Este tinha 55 anos de idade e apresentava perda auditiva mista (Figura 74B), tendo iniciada com 36 anos de idade. Sua audição foi afetada inicialmente na orelha direita. Com 41 anos ele começou a fazer o uso de aparelhos auditivos, mas aos 42 anos de idade tornou-se surdo de ambas orelhas. Aos 46 anos ele recebeu o implante coclear, voltando a se comunicar pela linguagem falada novamente.

Após o sequenciamento paralelo massivo, todas as variantes foram filtradas, priorizando variantes presentes em genes associados aos mecanismos de audição em camundongos e humanos presentes no painel *HEar-Seq v3*. Como

resultado, a variante p.Arg705His, no gene *MYH9*, foi identificada como principal variante candidata (tabela 23).

Tabela 23. Variante candidata identificada na família *Bra01* e principais resultados das análises de predição *in silico*.

Gene e Transcrito	Variante (cDNA)	Variante (Proteína)	Sift	PolyPhen (hVar)	Mutation Taster	PhyloP	GERP++	Genótipo
MYH9 NM_014246	c. 2114G>A	p.Arg705His	0 P	1 D	0,99 D	2,71	5,46	0/1:108,100

P: Patogênico

D: *Disease causing* (Causador de patologia)

T: Tolerado

O gene *MYH9*, apresenta a principal isoforma de 7501 pb distribuídos em 41 éxons (40 codificantes), codificando a miosina não-muscular de cadeia pesada A, uma miosina classe II (*NMHC-IIA*, do inglês *Nonmuscle Myosin Heavy-Chain II-A*). Esta é composta por um peptídeo de 1960 aminoácidos de peso molecular de 220 kDa (*Uniprot ID: P35579-1*), sendo expresso em células não-musculares de diversos tecidos. Esta proteína apresenta um par de cadeias pesadas, além de dois pares de cadeia leve, onde encontram-se a região motora (81-776 aa), a região de interação com actina (654-676 aa), um domínio *IQ* (779-808 aa) e uma região *coiled-coil* (837-1926 aa) (figura 75). Dentre as funções desta proteína estão a polaridade celular, morfogênese e citocinese durante o desenvolvimento, além de outras atividades de mobilidade. A ausência desta proteína durante o desenvolvimento embrionário de camundongos é letal (SIMONS et al., 1991; WEI; LALWANI; MHATRE, 2010).

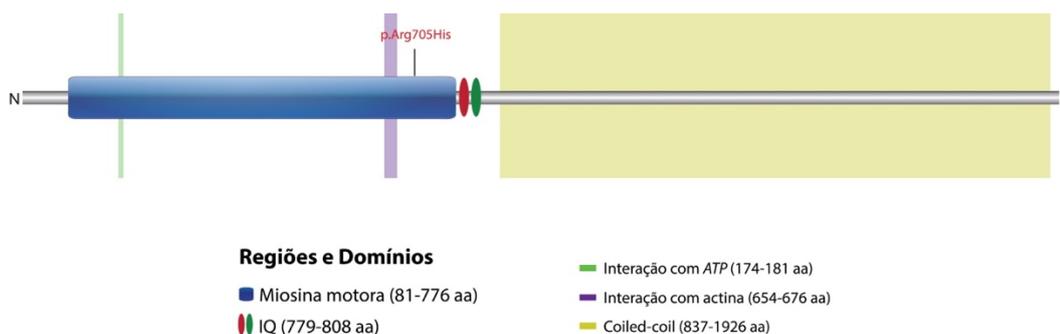


Figura 75. Esquemática da mutação p.Arg705His na miosina não-muscular de cadeia pesada A (*NMHC-IIA*) (Isoforma canônica - *Uniprot ID: P35579-1*) (Elaborado pelo autor).

A *NMHC-IIA* foi a primeira miosina convencional de cadeia pesada a ser associada à perda auditiva (DFNA17). Este locus foi identificado em uma família norte-americana com 10 indivíduos apresentando perda auditiva não-sindrômica em altas frequências com início aos 10 anos, progredindo para perda auditiva bilateral moderada para severa na terceira década de vida. Posteriormente, o gene *MYH9* foi identificado, dentre os 163 presentes neste locus, como o responsável pela perda auditiva devido à presença da variante c.2114G>A (p.Arg705His) no éxon 16 dos indivíduos afetados, mas ausente nos indivíduos com audição normal. Esta mutação também foi identificada em uma família de cinco gerações proveniente da Austrália. Os indivíduos afetados desta família apresentaram perda auditiva bilateral não-sindrômica progressiva em frequências médias e altas, iniciando entre os seis anos e a segunda década de vida. Na terceira década de vida, a perda auditiva destes indivíduos havia se agravado para severa/profunda em todas as frequências. Cinco indivíduos desta família receberam implante coclear uni ou bilateral, apresentando melhoras nos limiares auditivos, melhorando a capacidade de comunicação falada (HILDEBRAND et al., 2006; LALWANI et al., 2000).

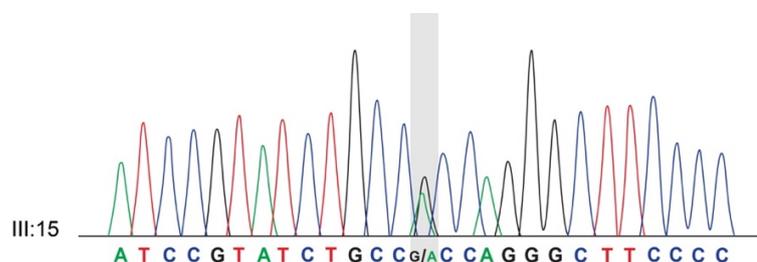
Estudos funcionais demonstraram que, na orelha interna, a *NMHC-IIA* é expressa nas células ciliadas externas (CCE) do órgão de Corti, na região sub-central do ligamento espiral e na membrana de *Reissner*, confirmando sua possível associação com os mecanismos de audição. Já a mutação p.Arg705His teve sua patogenicidade verificada pela análise estrutural da proteína, assim como o efeito causado *in vitro*. Esta mutação ocorre em uma região altamente conservada e funcionalmente crítica da proteína, a porção C-terminal do domínio motor. O resíduo Arg705 está presente na região de ligação (do inglês *linker region*) abrangendo 16 aminoácidos e contem dois grupos tiol, C704 (*SH1*) e C694 (*SH2*). Acredita-se que ambas α -hélices dos grupos *SH1* e *SH2* são fundamentais para a mudança conformacional da proteína que ocorre na região motora durante a hidrólise de *ATP*. Estudos *in vivo* e *in vitro* puderam comprovar a necessidade dos grupos *SH1* e *SH2* íntegros para a função correta da cabeça motora da miosina, principalmente para a atividade da *ATPase*. Assim sendo, acredita-se que a mutação p.Arg705His pode alterar a conformação do grupo *SH1*, afetando a flexibilidade e movimento, abolindo a função mecânica do domínio motor da miosina. Além destes resultados, outros estudos puderam demonstrar os efeitos na citocinese causado por esta mutação, aumentando em 10 vezes o número de células multinucleadas, quando comparada

com células normais, além de afetar o citoesqueleto e o formato celular, gerando o dobro de projeções celulares longas e finas (do latim *filopodium*). Com as análises, foi possível identificar o efeito dominante negativo causado pela mutação p.Arg705His, resultando na alteração do formato celular, fundamental para o órgão de Corti, que necessita de fina sintonia para desempenhar sua função correta no processo auditivo (LALWANI et al., 2000; PATTERSON et al., 1997; SUZUKI et al., 1997; WEI; LALWANI; MHATRE, 2010).

Esta variante teve sua frequência analisada na população brasileira utilizando os dois bancos de dados públicos de exoma, *BIPMed* e o *ABraOM*. O *BIPMed* dispõe do sequenciamento completo e variantes anotadas de 106 indivíduos. O *ABraOM* contém o resultado do sequenciamento completo do exoma de 609 indivíduos idosos saudáveis da cidade de São Paulo. A mutação não foi identificada em nenhum, dos 1430 cromossomos presentes nos bancos de dados.

Além de sua patogenicidade e similaridade dos resultados clínicos da família *Bra01* com as famílias norte-americana e australiana relatadas cima, a mutação p.Arg705His foi considerada a variante candidata para esta família. Para isso, tanto indivíduos afetados quanto normais da família *Bra01* foram analisados, por meio de sequenciamento de Sanger (figura 76A), identificando a segregação da mesma com o fenótipo de perda auditiva. Apenas três casos o fenótipo não correspondeu ao esperado. Em dois casos, III:2 e IV:3 (ambos sem a mutação), foram relatados padrões de perda auditiva diferentes do apresentado pelos demais nove indivíduos afetados e com a mutação. Por não dispor de mais informações destes indivíduos, não foi possível realizar demais análises para elucidar a etiologia da perda auditiva. Já no último caso (IV:18), embora a mutação esteja presente em heterozigose, o indivíduo apresenta audição normal. Porém, vale ressaltar que este padrão de perda auditiva se inicia tardiamente e este indivíduo encontra-se na adolescência, podendo vir ainda a desenvolver perda auditiva (figura 76B).

A



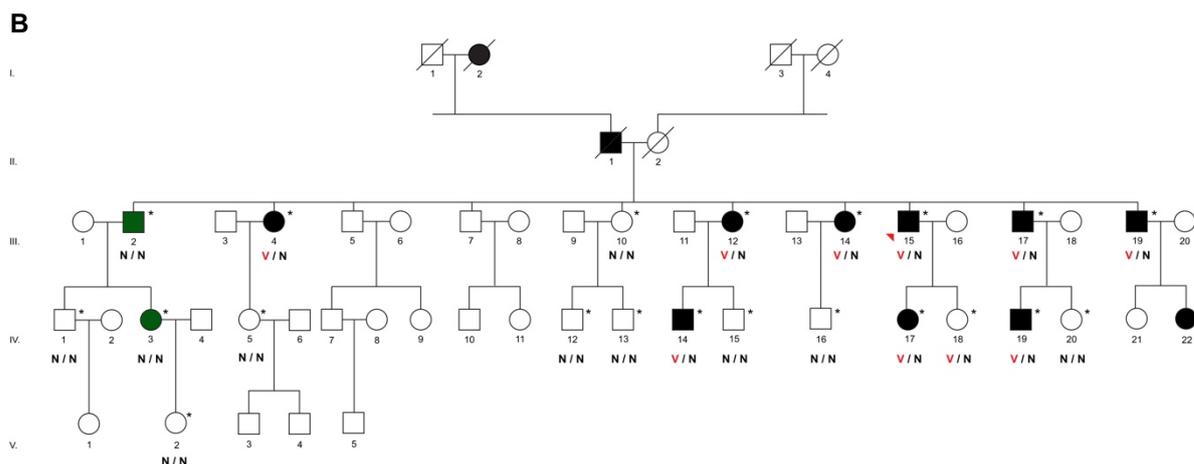


Figura 76. Resultados dos estudos envolvendo a família *Bra01*. **A:** Resultados do sequenciamento do indivíduo III:15, confirmando a mutação c.2114G>A, no gene *MYH9*, em heterozigose; **B:** Heredograma contendo os resultados de segregação da perda auditiva e variante na família *Bra01*. V: c.2114G>A; N: Normal.

Este foi o terceiro achado envolvendo esta mutação, sendo responsável pela perda auditiva não-sindrômica autossômica dominante (DFNA17) na família *Bra01*.

4.1.11. Família *Bra02*

A família *Bra02*, da região sul do Brasil, apresentava três gerações com perda auditiva neurossensorial, onde nos indivíduos II:2 e III:2 a perda era progressiva, iniciando-se antes dos quatro anos, bilateral moderadamente severa (figura 77). Esta família era composta por descendentes alemães que migraram para o Brasil no início do século XX.

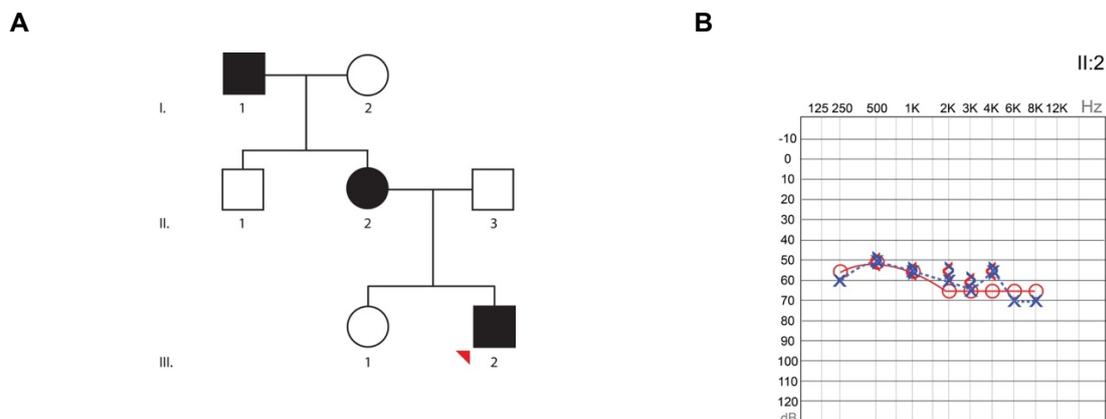


Figura 77. Informações referentes à família *Bra02*. **A:** Heredograma da família *Bra02*. Seta vermelha indica o indivíduo submetido ao WES. **B:** Audiometria do indivíduo II:2, indicando perda auditiva

neurossensorial bilateral moderadamente severa. Via aérea: “O” vermelho (orelha direita) e “X” azul (orelha esquerda); Via óssea “<” vermelho (orelha direita) e “>” azul (orelha esquerda).

Após a triagem molecular primária envolvendo os genes *GJB2*, *GJB6* e *MTRNR1*, o probando teve seu exoma sequenciado por completo. Das mais de 150 mil variantes identificadas, a principal variante candidata estava presente no gene *GATA3* (tabela 24).

Tabela 24. Variante candidata identificada na família *Bra02* e principais resultados das análises de predição *in silico*.

Gene e Transcrito	Variante (cDNA)	Variante (Proteína)	Sift	Mutation Taster	PhyloP	GERP++	Genótipo
GATA3 NM_001002295	c.1099C>T	p.Arg367*	1 T	1 A	2,336	5,26	0/1:4,4

A: *Automatic_disease causing* (Causador de patologia anotado automaticamente)

T: Tolerado

Embora a predição *in silico* envolvendo a ferramenta *SIFT* indicasse que a variante não era patogênica, outras ferramentas de anotações indicavam o contrário. Este gene, *GATA3*, assim como esta mutação, estão associados à síndrome de *Barakat* (OMIM 146255), também conhecida como Síndrome *HDR* (do inglês *Hypoparathyroidism, Deafness e Renal abnormalities*). Esta rara síndrome foi relatada primeiramente na década de 70, sendo associada ao padrão de herança autossômico dominante e a alterações no gene *GATA3* (BARAKAT et al., 1977; BILOUS et al., 1992; HASEGAWA et al., 1997; VAN BEELEN et al., 2014).

Dentre os sintomas identificados nos indivíduos afetados na família, é de se esperar a presença da tríade que nomeia a síndrome (HDR). O hipoparatiroidismo, referente ao *H*, pode variar de hipocalcemia assintomática a parestesias, com níveis do hormônio *PTH* baixos ou indetectáveis. A perda auditiva (*D*, do inglês *Deafness*) de indivíduos afetados por esta síndrome é o efeito mais consistente, sendo congênita ou de início precoce, neurossensorial e bilateral, variando entre moderada à severa em todas frequências, porém mais evidente nas mais altas. Já entre as anormalidades renais (*R*), com penetrância variada, estão as

displasias, hipoplasia e aplasia renais em um ou ambos rins (VAN BEELEN et al., 2014; VAN ESCH et al., 2000).

A síndrome *HDR* é caracterizada pela presença de pelo menos dois dos sintomas apresentados acima, além das alterações no gene *GATA3* que possa confirmar tal síndrome. Mesmo entre indivíduos de uma mesma família com a mesma mutação, é comum observar variação do fenótipo de síndrome *HDR*, assim como a severidade e a idade de início dos sintomas. A razão desta heterogeneidade fenotípica da síndrome ainda não foi esclarecida, porém estudos funcionais envolvendo o gene *GATA3* sugerem que tais efeitos são causados por meio da haploinsuficiência deste gene afetado (FERRARIS et al., 2009; HASEGAWA et al., 1997; MUROYA et al., 2001; OHTA et al., 2011; VAN ESCH et al., 2000).

O gene *GATA3* (NCBI ID: 2625) apresenta seis éxons e é transcrito em duas isoformas, uma originando uma proteína de 443 aminoácidos (NM_002051.2) e outra de 444 aminoácidos (NM_001002295.1). Esta proteína codificada pertence à família *GATA* de ativadores transcricionais, sendo classificada como um fator de transcrição do tipo *Zinc Finger*. Mutações neste gene são divididas em três grupos, de acordo com efeito que elas têm na interação do a molécula de DNA. A primeira classe, abrangendo 90% das mutações, estão as mutações que abolem a interação com o DNA, provavelmente devido às anomalias no *ZnF2*. A segunda classe corresponde às mutações que afetam a estabilidade da interação com o DNA, afetando principalmente o *ZnF1*. Na última classe encontram-se as mutações que não afetam na interação ou estabilidade de interação com o DNA, mas abolem a interação do complexo *FOG* (NESBIT et al., 2004; YANG et al., 1994).

Atualmente, se tem conhecimento de mais de 50 mutações responsáveis pela síndrome *HDR* devido à haploinsuficiência do gene *GATA3*. Dentre elas, a mutação c.1099C>T causa a troca do resíduo Arg367 por um códon de terminação prematura (p.Arg367*), encurtando a proteína em 77 aminoácidos. Embora esta ocorra após o *ZnF2*, esta mutação abole a porção C-terminal da proteína, essencial para a interação com a molécula de DNA (NESBIT et al., 2004; OMICHINSKI et al., 1993; STENSON et al., 2017; VAN ESCH et al., 2000) (figura 78).

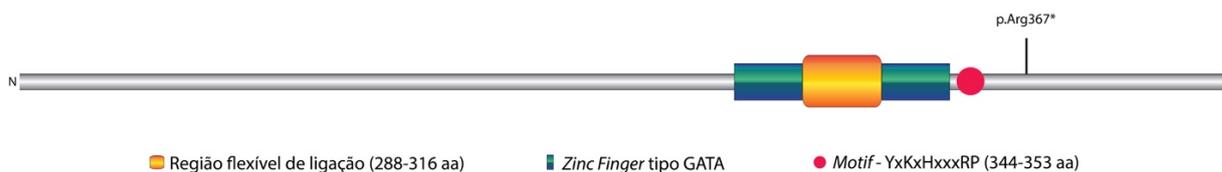


Figura 78. Representação da estrutura da proteína GATA3, indicando o local da mutação p.Arg367* (Elaborado pelo autor).

A mutação c.1099C>T foi relatada, primeiramente, em dois indivíduos de uma família japonesa. A mutação estava ausente nos pais e na irmã do indivíduo afetado, indicando ser uma mutação *de novo*. O indivíduo contendo a mutação apresentava todas as três manifestações clínicas (*HDR*) da síndrome, porém sua filha, que também apresentou a mutação em heterozigose, apresentava apenas perda auditiva. O segundo caso desta mutação ocorreu em uma família do norte europeu. O indivíduo afetado apresentava apenas problemas de hipoparatiroidismo e perda auditiva, mas nenhuma anomalia renal. Novamente, os pais biológicos do indivíduo não apresentavam a mutação, sendo considerado um caso *de novo*, assim como o caso anterior. O terceiro caso desta mutação foi relatada em dois indivíduos de uma família chinesa, ambos apresentando apenas hipoparatiroidismo e perda auditiva. Os pais biológicos dos indivíduos, confirmados por teste de paternidade envolvendo quatro marcadores polimórficos (*STR*), não apresentaram a mutação, sugerindo este ser um caso de mosaicismo nas células germinativas pela improbabilidade da mesma mutação *de novo* ocorrer duas vezes na mesma família. Este fato não pode ser comprovado experimentalmente. Já o último caso desta mutação relatada envolvia uma família turca. O indivíduo afetado, de apenas dois meses de idade, apresentou hipoparatiroidismo e anormalidades renais, porém não apresentou perda auditiva. Vale ressaltar que, o fato do indivíduo afetado não apresentar perda auditiva não representa que ele não venha desenvolver nos estágios iniciais de sua infância, como observado em alguns casos envolvendo esta síndrome. Novamente, a mutação nesta família turca foi caracterizada como *de novo* (DÖNERAY et al., 2015; MUROYA et al., 2001; NESBIT et al., 2004; SUN et al., 2009). Todos os dados referentes aos resultados clínicos destes casos estão sumarizados na tabela 25.

Tabela 25. Resultados prévios envolvendo a mutação p.Arg367* e síndrome HDR.

Caso	Hipoparatiroidismo (H)				Perda auditiva (D)		Anomalias renais (R)		Referência
	Diagnóstico (início)	Cálcio (mg/dL)	Fosfato (mg/dL)	PTH (pg/mL)	Diagnóstico (início)	Fenótipo	Diagnóstico (início)	Fenótipo	
5	2 meses	6.4	7.2	7	-	-	2 meses	Proteinúria leve e hematuria	(DÓNERAY et al., 2015)
4	10 anos	6.5	9.1	1.6	3 anos	Bilateral	10 anos	Proteinúria leve	(SUN et al., 2009)
3	5 anos	8	-	3	5 anos	não informado	-	-	(SUN et al., 2009)
2	13 anos	4.2**	-	6	< 1 ano	Bilateral (R>L)	-	-	(NESBIT et al., 2004)
1	3 anos	8.1**	3.5**	não detectado	Provavelmente* (infância)	não examinado	Provavelmente 2ª década	Proteinúria e hematuria	(MUROYA et al., 2001)

* Utilização de aparelhos auditivos

** Valores convertidos de mmol/L para mg/dL

A mutação identificada pelo sequenciamento paralelo massivo foi validada por sequenciamento de Sanger. Porém, durante a análise de segregação da variante com os indivíduos da família, o avô materno (I:1) do probando, que também havia relatado perda auditiva, não apresentou a mutação c.1099C>T. Assim sendo, todos os testes foram refeitos, porém os resultados se mantiveram invariáveis. Para excluir possível troca de material genético durante a extração de DNA, nova coleta de sangue periférico foi realizada em todos indivíduos, assim como a extração de seu material genético, seguidos de análise de segregação. Porém, os resultados continuaram os mesmos, estando a mutação p.Arg367* presente apenas nos indivíduos II:2 e III:2, mas não no indivíduo I:1 como se esperava (figura 79).

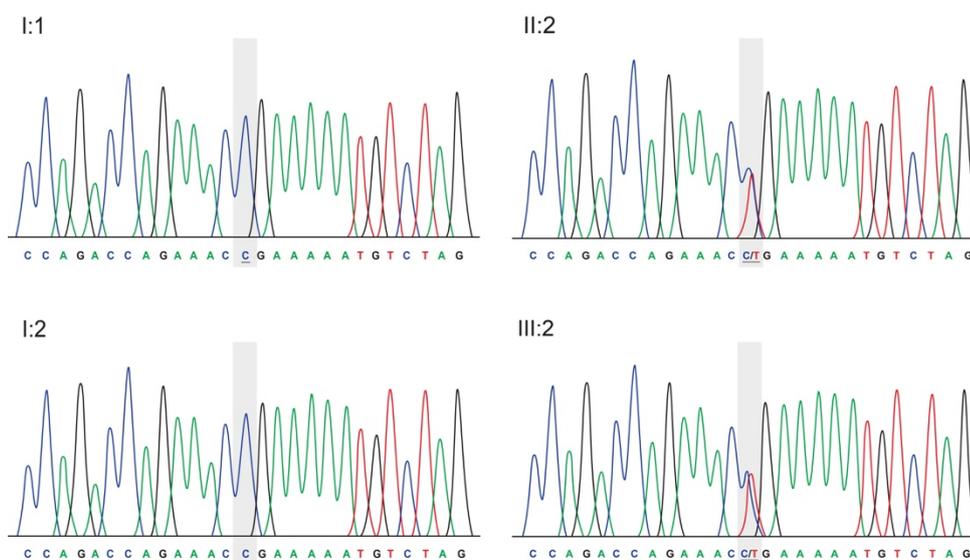


Figura 79. Resultados do sequenciamento de Sanger da mutação c.1099C>T no gene *GATA3*, indicando possível caso de mutação *de novo*. Avós maternos (I:1 e I:2) do probando não apresentam a mutação candidata, porém mãe (II:2) e probando (III:2), apresentam a mutação em heterozigose. O local da mutação encontra-se em destaque (caixa cinza).

Suspeitou-se então desta mutação também se tratar de um caso *de novo*, assim como nos casos relatados, pelo fato da perda auditiva do avô materno não respeitar o padrão da perda observado nos outros dois afetados. Para verificar a paternidade do indivíduo I:1 e confirmar a mutação *de novo*, nove marcadores polimórficos (*STR*) foram utilizados. Analisando nove microssatélites dos indivíduos I:1, I:2, II:1 e II:2 foi possível confirmar a paternidade, assim como o caso de mutação *de novo* ocorrido no indivíduo II:2 (tabela 26).

Tabela 26. Resultados da análise de paternidade na família *Bra02*.

	I:1	I:2	II:1	II:2
D18S51				
AGAA	14/20	17/18	17/20	14/17
CSF1PO				
AGAT	10/11	12/13	10/12	10/12
D7S820				
GATA	10/10	8/10	8/10	10/10
D5S818				
AGAT	10/11	12/13	11/13	11/13
D8S1179				
TCTA	8/14	12/13	12/14	12/14
D3S1358				
TCTA	1/1	1/1	1/1	1/1
TCTG	3/3	3/3	3/3	3/3
TCTA	12/14	12/12	12/14	12/12
D21S11				
TCTA	6/7	4/5	4/6	5/7
TCTG	5/5	6/6	5/6	5/6
TCTA	3/3	3/3	3/3	3/3
TA	1/1	1/1	1/1	1/1
TCTA	3/3	3/3	3/3	3/3
TCA	1/1	1/1	1/1	1/1
TCTA	2/2	2/2	2/2	2/2
TCCATA	1/1	1/1	1/1	1/1
TCTA	10/11	12/12	11/12	10/12
TH01				
AATG	6/6	6/6	6/6	6/6
ATG	-	1/1	-	-
AATG	-	3/3	-	-
FGA				
TTTC	3/3	3/3	3/3	3/3
TTTTTCT	1/1	1/1	1/1	1/1
CTTT	12/15	12/14	12/14	12/12
CTCC	1/1	1/1	1/1	1/1
TTCC	2/4	2/2	2/2	2/2

X/Y, onde X: alelo 1 e Y: alelo 2.

Embora todos indícios relatados na literatura relacionavam esta mutação com perda auditiva sindrômica (síndrome *HDR*) os indivíduos desta família foram encaminhados para análise molecular como casos de perda auditiva isolado, ou seja, não-sindrômico. Perante os resultados moleculares identificados, novos exames clínicos foram solicitados para os indivíduos I:1, II:2 e III:2, objetivando verificar a existência hipoparatiroidismo e problemas renais na família, assim como identificar a diferença de perda auditiva entre os indivíduos com e sem a mutação.

Para análise de possível hipoparatiroidismo, foram solicitadas dosagens dos níveis de cálcio, fosfato e hormônio da paratireoide (*PTH*) para os indivíduos II:2 e III:2. O indivíduo II:2 apresentou níveis normais de cálcio (9 mg/dL, valores normais: 8,8-11 mg/dL), fosfato (4,1 mg/dL, valores normais para adultos: 2,5-5,6 mg/dL) e *PTH* (19 pg/mL, valores normais: 4-58 pg/mL). O probando (III:2) também apresentou a ausência de hipoparatiroidismo com resultados normais de cálcio (9,2 mg/dL, valores normais: 8,8-11 mg/dL), fosfato (4,9 mg/dL, valores normais para crianças: 4-7 mg/dL) e *PTH* (12 pg/mL, valores normais: 4-58pg/mL). Os exames prévios destes dois pacientes também foram solicitados e comparados, não apresentando variações significativas.

Para a análise da perda auditiva, foram realizados novos testes audiológicos nos indivíduos I:1, II:2 e III:2 (figura 80). Tanto o indivíduo II:2 quanto o probando (III:2) utilizam aparelhos de amplificação em ambas orelhas para o auxílio da audição e realizam testes semestrais desde a identificação da perda auditiva. O indivíduo II:2 foi diagnosticado com perda auditiva bilateral neurossensorial moderadamente severa ainda na infância (quatro anos de idade). Atualmente, o indivíduo II:2 encontra-se com 34 anos de idade e os valores da perda auditiva continuam inalterados, indicando esta se tratar de um caso não progressivo. O probando (III:2) foi diagnosticado com 11 meses de idade com o mesmo padrão moderadamente severo de perda auditiva identificado na sua progenitora. Já o indivíduo I:1, que também relatou problemas auditivos, apresentou perda auditiva bilateral severa/profunda apenas em altas frequências, mais especificamente a 4 kHz, tendo uma melhora na audição a 8 kHz. Este é um típico caso de perda auditiva causada por exposição ao ruído, suportado pela ocupação do indivíduo I:1. Nesta avaliação pudemos concluir que a perda auditiva do indivíduos II: e III:2, ambos heterozigotos para a mutação p.Arg367*, são similares e decorrentes de fatores

genéticos. Porém, o indivíduo I:1 apresentou perda auditiva por outros fatores, neste caso, ambientais.

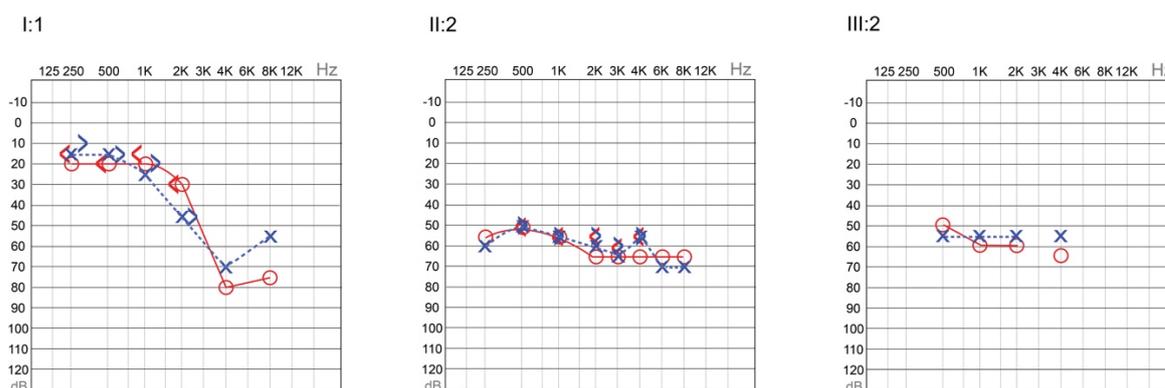


Figura 80. Audiometrias atuais dos indivíduos I:1, II:2 e III:2, indicando perda auditiva bilateral em altas frequências (induzida por ruído) no indivíduo I:1, e perda auditiva bilateral neurossensorial moderadamente severa nos indivíduos II:2 e III:2 (resultados da mutação p.Arg367*). Via aérea: “O” vermelho (orelha direita) e “X” azul (orelha esquerda); Via óssea “<” vermelho (orelha direita) e “>” azul (orelha esquerda).

Alterações na função renal dos indivíduos II:2 e III:2 não foi detectada por análises de sangue. O indivíduo II:2 apenas reportou casos de cálculos renais iniciando aos 33 anos de idade, o que não é considerado uma anormalidade renal compatível com a síndrome *HDR*. Porém, o indivíduo III:2 apresenta agenesia renal unilateral, com ausência do rim direito, diagnosticado intrauterinamente com 28 semanas de gestação. Embora o probando não apresente o rim direito, foi possível identificar que o rim esquerdo apresenta função normal, compensando o efeito da agenesia renal.

A agenesia renal direita, a perda auditiva e os resultados moleculares, permitiram confirmar o caso de perda auditiva sindrômica nesta família, sendo o primeiro caso de Síndrome *de Barakat* causada pela mutação p.Arg367* no gene *GATA3* com ausência de hipoparatiroidismo (figura 81). Além disso, este foi o primeiro caso desta síndrome identificado na população brasileira e o primeiro caso desta mutação no continente americano.

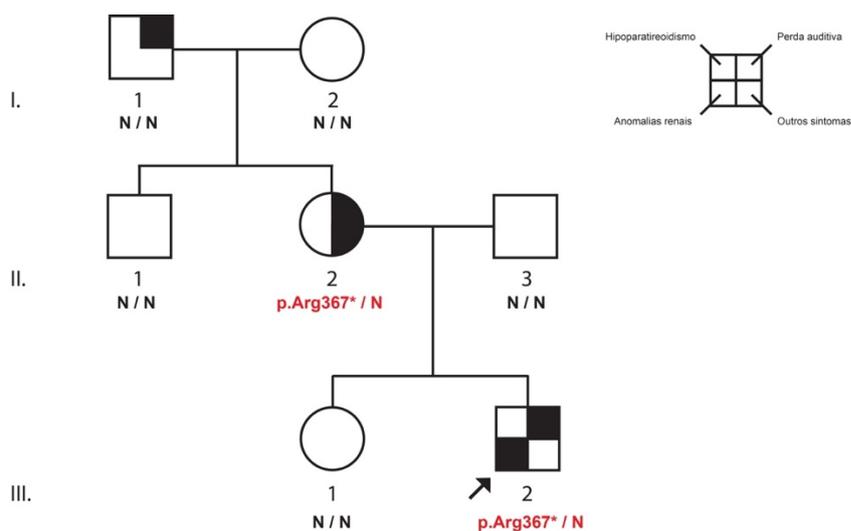


Figura 81. Segregação da mutação c.1099C>T no gene *GATA3* na família *Bra02*.

4.2. Estudo de famílias não concluídos com o uso de sequenciamento paralelo massivo

Dos 25 casos estudados pela tecnologia de painel de captura, 20 foram realizados utilizando o painel *HEar-Seq v3*, contendo 284 genes associados à perda auditiva em humanos e camundongos. Os cinco casos restantes foram analisados por meio do sequenciamento completo do exoma (*WES*).

Das famílias analisadas por meio do painel *HEar-Seq v3*, 10 tiveram o diagnóstico molecular concluído, enquanto que a outra metade permaneceu com etiologia desconhecida. Este alto número de casos inconclusivos pode estar associado à três principais fatores. O primeiro seria devido à perda auditiva nas famílias estudadas ser causada por nenhum dos 284 genes contidos no painel ou em regiões não capturadas pelo painel. A utilização de painéis de captura é ideal para patologias de padrão de herança genético bem estudado e definido, o que não é o caso da perda auditiva. Outro fator importante está no fato da família optar por não mais participar da pesquisa cedendo novas amostras de DNA por motivos particulares, o que é de direito garantido pelo termo de consentimento livre e esclarecido. O último fator está relacionado à falha na localização, por telefone ou e-mail, da família para solicitar novos exames ou amostra de DNA. Nestas três situações, o estudo das famílias ou foram descontinuados ou tiveram suas amostras recomendadas ao sequenciamento completo do exoma.

O caso das famílias submetidas ao *WES* e com resultados inconclusivos pode ser explicado pela perda auditiva na família ser decorrente de outros fatores que não genéticos, pelo fato da causa estar em regiões não sequenciadas pelo *WES* ou até mesmo da causa repousar em genes que não foram, até o momento, associados a nenhum tipo de perda auditiva, uma vez que a priorização inicial das variantes ocorreu nos 284 genes contidos no painel *HEar-seq v3*. Para estas famílias, os resultados provenientes do *WES* ainda continuam sendo analisados em busca de algum gene ou variante que possa explicar o fenótipo

4.2.1. Casos inconclusivos utilizando o painel *HEar-Seq v3*

4.2.1.1. Família *Isr07*

A família *Isr07*, de descendência árabe, apresentou duas gerações de indivíduos com perda auditiva bilateral profunda (II:4 e III:3) (figura 82).

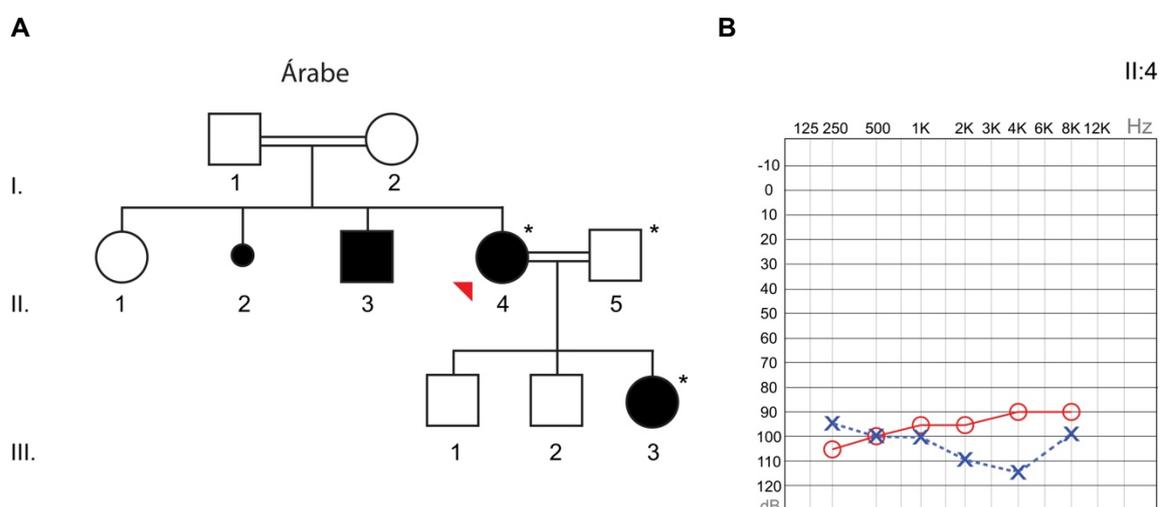


Figura 82. Informações referentes à família *Isr07*. **A:** Heredograma da família *Isr07*. Seta vermelha indica probando submetido ao sequenciamento paralelo massivo pelo painel *HEar-Seq v3*; **B:** Audiometria tonal por via aérea do indivíduo II:4, indicando perda auditiva bilateral profunda. “O” vermelho: orelha direita; “X” azul: orelha esquerda.

Por se tratar de uma família com múltiplos casamentos consanguíneos, a principal hipótese adotada teve no padrão de herança autossômico recessivo. Para isso, após o sequenciamento paralelo massivo, foram objetivadas como variantes

candidatas presentes em homozigose ou em heterozigose composta. A variante candidata foi identificada em homozigose no gene *USH2A* (tabela 27).

Tabela 27. Variante candidata da família *Isr07* e principais resultados das análises de predição *in silico*.

Gene e Transcrito	Variante (cDNA)	Variante (Proteína)	Sift	PolyPhen (hVar)	Mutation Taster	PhyloP	Genótipo
<i>USH2A</i> <i>NM_206933</i>	c.3914C>T	p.Pro1305Leu	0,02 D	0,997 D	0,99 D	1,395	1/1:2,398

D: *Disease causing* (Causador de patologia)

Embora esta variante no gene *USH2A* fosse uma ótima variante candidata, ao analisar a segregação da variante na família, por sequenciamento de Sanger, foi possível identificar que ela não estava segregando com o fenótipo de perda auditiva na família. Isto pois, a matriarca (II:4), homozigota para a variante, apresentava o mesmo padrão de perda auditiva que sua filha (III:3), esta heterozigota para a variante (figura 83).

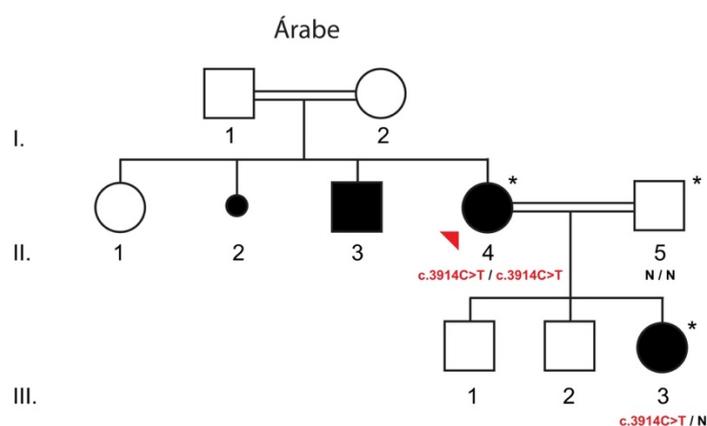


Figura 83. Segregação da variante candidata c.3914C>T no gene *USH2A* na família *Isr07*.

Demais variantes candidatas foram estudadas respeitando os diversos padrões de herança, porém nenhuma destas apresentou-se potencialmente patogênica.

Com tais resultados inconclusos, foi recomendando o sequenciamento completo do exoma (WES), dos indivíduos II:5 e III:3. Porém, no momento da conclusão desta tese, os indivíduos não haviam sido sequenciados, classificando tal família como um caso de perda auditiva de etiologia desconhecida.

4.2.1.2. Família *Isr10*

A família de judeus asquenazes *Isr10* apresentou perda auditiva congênita severa/profunda em dois indivíduos (Figura 84).

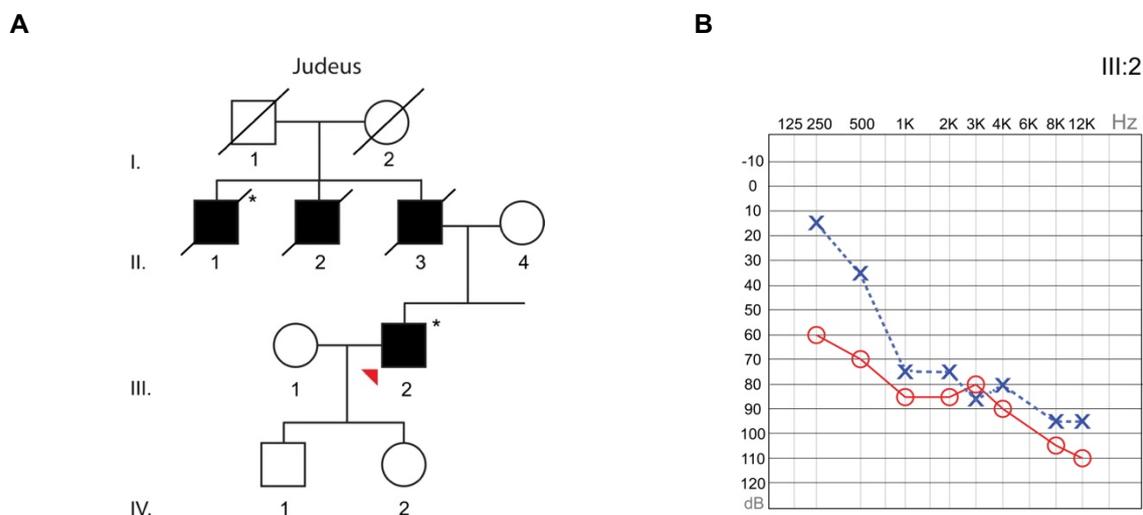


Figura 84. Informações referentes à família *Isr10*. **A:** Heredograma da família *Isr10*. Seta vermelha indica indivíduo submetido ao sequenciamento paralelo massivo. Asteriscos indicam quais indivíduos participaram da pesquisa; **B:** Audiometria tonal por via aérea do indivíduo III:2, indicando perda auditiva bilateral severa/profunda. “O” vermelho: orelha direita; “X” azul: orelha esquerda.

Pelo fato da perda auditiva na família ser congênita e severa/profunda, assim como estar presente em todos filhos da primeira geração, que não apresenta perda auditiva, especulou-se tratar de um caso de herança autossômica recessiva. Porém, após o sequenciamento massivo do indivíduo III:2, nenhuma variante potencialmente patogênica foi identificada em homozigose. Novas estratégias foram adotadas, considerando inclusive variantes em apenas um dos alelos, porém nenhuma variante candidata foi identificada. Com tais resultados, esta família foi indicada para a realização do sequenciamento completo do exoma para identificação de novos possíveis genes associados à perda auditiva.

4.2.1.3. Família *Isr11*

Esta família, composta por judeus asquenazes, apresentou dois indivíduos (figura 85) com perda auditiva bilateral moderada e progressiva.

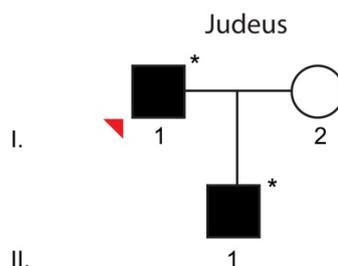


Figura 85. Heredograma da família *Isr11*. Seta vermelha indica indivíduo submetido ao sequenciamento paralelo massivo. Asteriscos indicam indivíduos participantes da pesquisa.

Considerando a perda auditiva moderada progressiva, assim como o histórico familiar, houve a suspeita da causa genética ser autossômica dominante. Para isso, foram analisadas variantes possivelmente patogênicas resultantes da análise pelo painel *HEar-Seq v3*. A principal variante candidata identificada foi identificada no gene *DFNB59*. Embora tivesse sido associado à perda auditiva autossômica recessiva, não se descartou a possibilidade deste gene e variante apresentar efeitos deletérios quando presente em apenas um alelo (tabela 28).

Tabela 28. Variante candidata da família *Isr11* e principais resultados das análises de predição *in silico*.

Gene e Transcrito	Variante (cDNA)	Variante (Proteína)	Sift	PolyPhen (hVar)	Mutation Taster	PhyloP	Genótipo
<i>DFNB59</i> NM_001042702	c.86A>G	p.Asp29Gly	0,02 D	0,999 D	0,98 D	2,323	0/1:204,195

D: Disease causing (Causador de patologia)

A variante teve a análise de segregação foi checada na família, segregando com o indivíduo II:1, também com perda auditiva. O gene *DFNB59* codifica a proteína Pejvakina e está associado à neuropatia auditiva (DELMAGHANI et al., 2006). Porém, nenhum dos dois indivíduos afetados foram classificados com neuropatia auditiva, o que exclui possível ação deste gene como causador também de perda auditiva autossômica dominante.

Com tais resultados, esta família foi indicada para a realização do sequenciamento completo do exoma para identificar novos possíveis genes associados à perda auditiva.

4.2.1.4. Família *Isr12*

Esta família de judeus asquenazes apresentou dois indivíduos com perda auditiva mista progressiva moderada/profunda (figura 86) e aqueduto vestibular alargado (AVA) afetando ambas as orelhas.

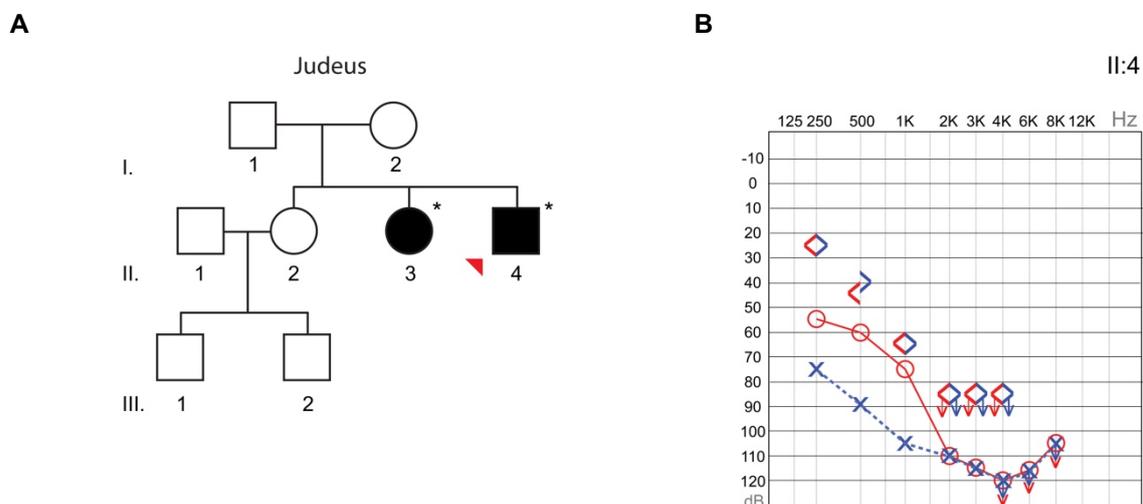


Figura 86. Informações sobre a família *Isr12*. **A:** Heredograma da família. Os asteriscos indicam indivíduos participaram da pesquisa. O probando II:4, indicado pela seta vermelha, foi submetido ao sequenciamento paralelo massivo pelo painel de captura; **B:** Audiometria por via aérea e óssea do indivíduo II:4, indicando perda auditiva mista moderada/profunda. Via aérea: “O” vermelho (orelha direita) e “X” azul (orelha esquerda); Via óssea “<” vermelho (orelha direita) e “>” azul (orelha esquerda).

Considerando o histórico familiar (ausência de perda auditiva nos progenitores), assim como o tipo de perda auditiva presente no probando, a principal hipótese utilizou o padrão de herança autossômico recessivo como possível esclarecimento do fenótipo, preferencialmente no gene *SLC26A4*, responsável pela DFNB4 e Síndrome de *Pendred*. Porém, após o sequenciamento paralelo massivo do indivíduo II:4, não foi identificada nenhuma variante no gene *SLC26A4*, assim como nenhuma outra variante potencialmente candidata como causadora da perda auditiva nesta família. Com tais resultados, esta família foi indicada para a realização do sequenciamento completo do exoma para identificar novos possíveis genes associados à perda auditiva.

4.2.1.5. Família *Isr13*

A família israelita descendente de árabes, com cinco gerações, apresentou três indivíduos provenientes de um casamento consanguíneo com perda auditiva neurossensorial progressiva moderadamente severa em ambas as orelhas (figura 87).

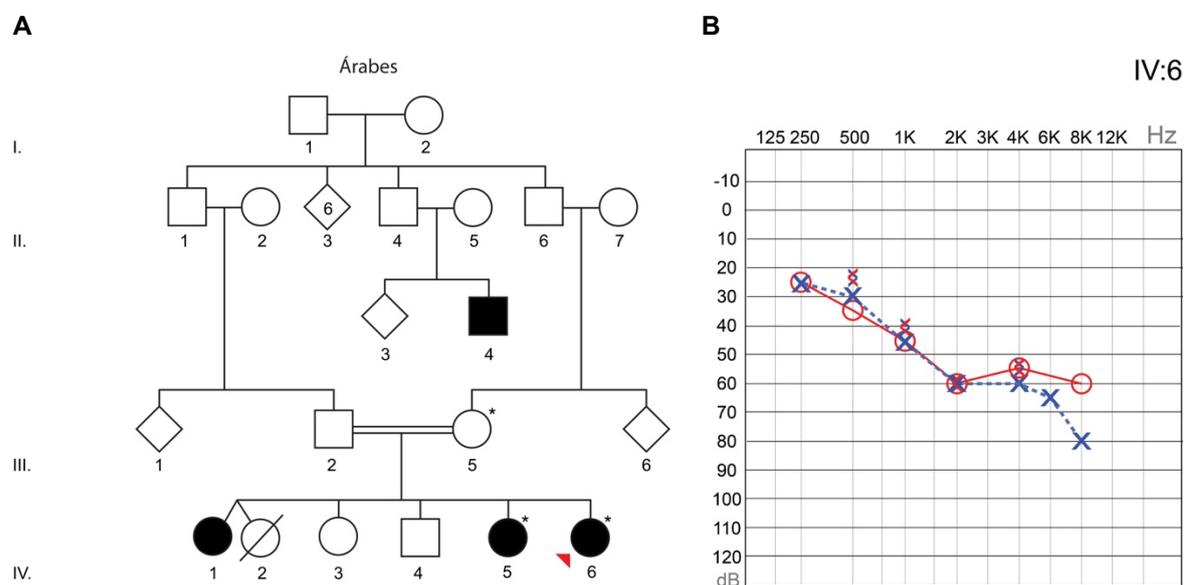


Figura 87. Informações sobre a família *Isr13*. **A:** Heredograma da família. Os asteriscos indicam indivíduos que participaram da pesquisa. O probando IV:6, indicado pela seta vermelha, foi submetido ao sequenciamento paralelo massivo pelo painel *HEar-Seq v3*; **B:** Audiometria tonal por via aérea e óssea do indivíduo IV:6, indicando perda auditiva mista moderadamente severa bilateral. Via aérea: “O” vermelho (orelha direita) e “X” azul (orelha esquerda); Via óssea “<” vermelho (orelha direita) e “>” azul (orelha esquerda).

Por tratar de casos provenientes de consanguinidade, a principal hipótese foi de herança autossômica recessiva como a responsável pela perda auditiva na família. Subsequente ao sequenciamento paralelo massivo pelo painel *HEar-Seq v3*, nenhuma variante candidata em homozigose foi identificada no indivíduo IV:6. A próxima estratégia adotada foi analisar as variantes em heterozigose composta. O gene *CDH23*, codificador da proteína Caderina 23 e associado tanto ao locus DFNB12 quanto à síndrome de Usher do tipo 1B, apresentou duas variantes em heterozigose que possivelmente pudessem elucidar o fenótipo devido à heterozigose composta (tabela 29).

Tabela 29. Variantes candidatas da família *Isr13* e principais resultados das análises de predição *in silico*.

Gene e Transcrito	Variante (cDNA)	Variante (Proteína)	MAF	Sift	PolyPhen (hVar)	Mutation Taster	PhyloP	Genótipo
CDH23	c.8513G>A	p.Arg2838His	-	0,56 T	0,023 B	0,99 D	2,643	0/1:43,50
NM_022124	c.9773A>C	p.Asp3258Ala	0,009183	0,03 D	0,167 B	0,34 N	1,996	0/1:10,10

MAF: Minor Allele Frequency (Menor Frequência Alélica)

T: Tolerado

B: Benigno

D: Disease causing (Causador de patologia)

Porém, após as análises de segregação das variantes, ambas foram identificadas também em heterozigose composta em um indivíduo com audição normal (III:5), além de estar ausente na irmã do probando (IV:5), a qual também apresentava perda auditiva (figura 88). Assim sendo, estas variantes não puderam esclarecer o fenótipo da perda auditiva nesta família por estarem em *cis* (no mesmo alelo), além de não segregarem com o fenótipo.

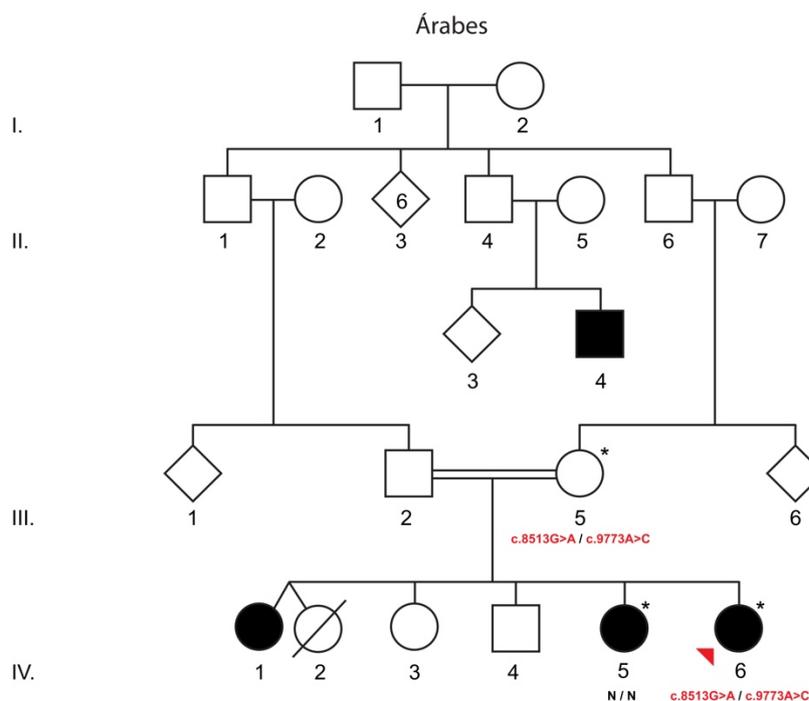


Figura 88. Segregação das variantes candidatas no gene *CDH23* na família *Isr13*.

Não havendo o esclarecimento da etiologia da perda auditiva, a família foi indicada para a realização do sequenciamento completo do exoma para identificar novos possíveis genes associados à perda auditiva.

4.2.1.6. Família *Isr14*

A família de árabes contendo duas gerações apresentou três indivíduos com perda auditiva mista, sendo neurossensorial bilateral severa/profunda e condutiva moderada/severa (figura 89).

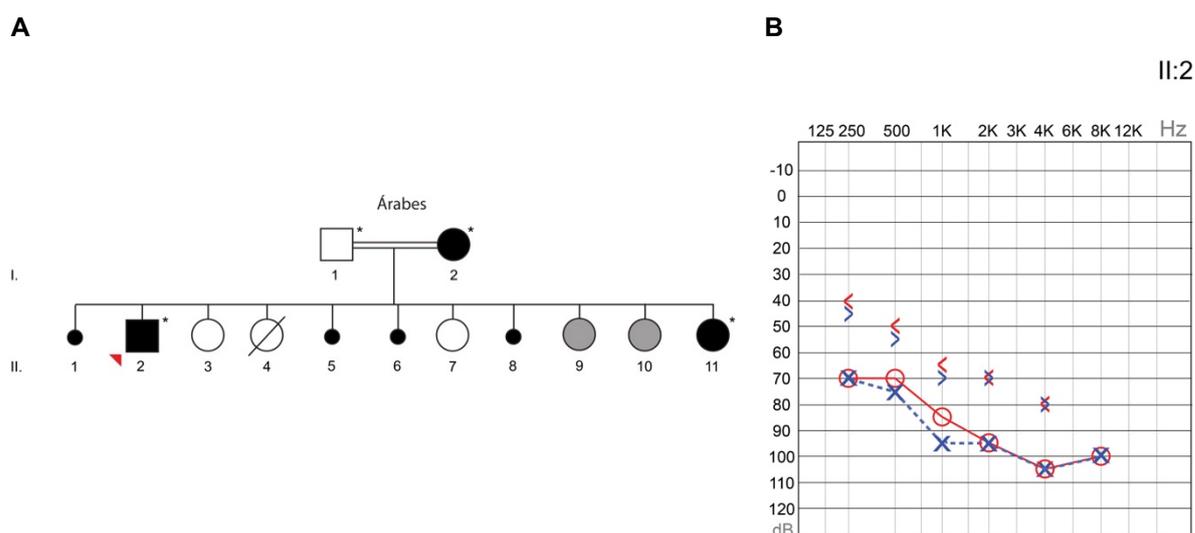


Figura 89. Informações sobre a família *Isr14*. **A:** Heredograma da família. Os asteriscos indicam os indivíduos que aceitaram participar da pesquisa. O probando (II:2), indicado pela seta vermelha, foi submetido ao sequenciamento pelo painel *HEar-Seq v3*. Os indivíduos II:9 e II:10 apresentavam osteogênese imperfeita; **B:** Audiometria tonal por via aérea e óssea do indivíduo II:2, indicando perda auditiva mista bilateral severa/profunda. Via aérea: “O” vermelho (orelha direita) e “X” azul (orelha esquerda); Via óssea “<” vermelho (orelha direita) e “>” azul (orelha esquerda).

O indivíduo II:2 foi submetido ao sequenciamento paralelo massivo pelo painel *HEar-Seq v3*. Por se tratar de um caso de consanguinidade na família, foram analisadas variantes em homozigose e/ou heterozigose composta que permitissem esclarecer a etiologia da perda auditiva. Porém, pelo indivíduo I:2 apresentar perda auditiva, também foi considerada a possibilidade de herança autossômica dominante, selecionando possíveis variantes candidatas em apenas um dos alelos.

Nenhuma variante candidata foi identificada em homozigose e heterozigose composta no indivíduo sequenciado. Assim sendo, foram analisadas possíveis variantes candidatas em heterozigose que pudesse explicar tal fenótipo, uma vez que a mãe dos indivíduos afetados também apresentava perda auditiva. Duas foram as variantes candidatas selecionadas como possivelmente patogênica. A primeira, c.487A>G (p.Met163Val), no gene *GJB2*, já havia sido relatada como patogênica na literatura. A segunda, c.857A>G (p.Tyr286Cys), no gene *KCNQ4* (DFNA2), não havia sido relatada previamente. Porém, ao analisar a segregação da variante na família, foi possível identificar que ambas variantes em heterozigose são provenientes do pai do probando (I:1), que apresentava audição normal, não suportando a hipótese destas variantes serem as possíveis responsáveis pelo fenótipo (figura 90).

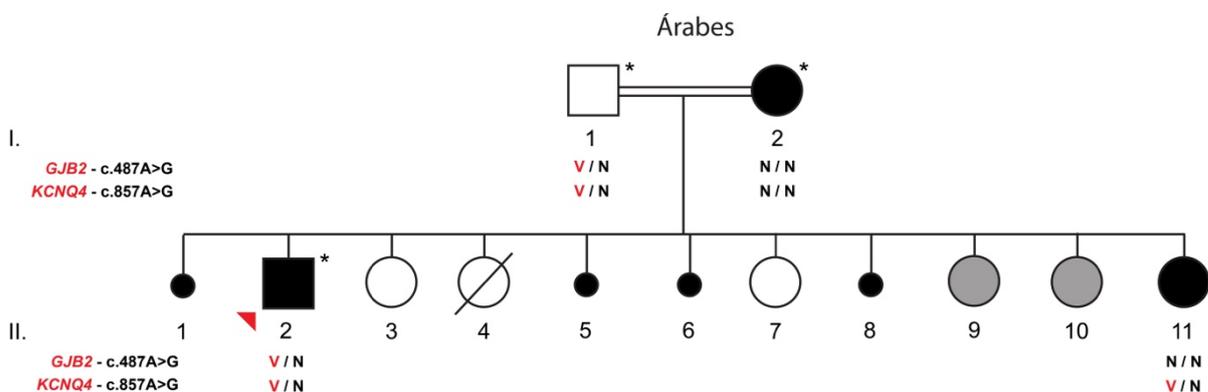


Figura 90. Segregação das variantes candidatas da família *Isr14*.

Não havendo o esclarecimento da etiologia da perda auditiva após o sequenciamento pelo painel *HEar-Seq*, a família foi indicada para a realização do sequenciamento completo do exoma para identificar novos possíveis genes associados à perda auditiva.

4.2.1.7. Família *Isr16*

Descendentes de judeus asquenazes, esta família apresentava um indivíduo com perda auditiva congênita bilateral severa/profunda (III:1) (figura 91) que foi submetido ao sequenciamento pelo painel *HEar-Seq* v3.

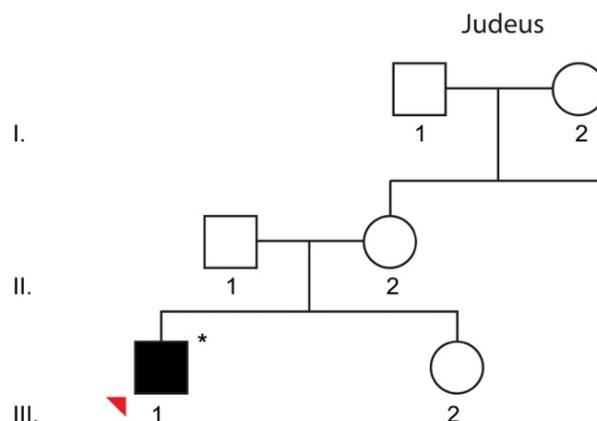


Figura 91. Heredograma da família *Isr16*. O asterisco indica qual amostra o laboratório detinha a amostra de DNA. O indivíduo III:1, indicado pela seta vermelha, foi submetido ao sequenciamento paralelo massivo pelo painel *HEar-Seq v3*.

Sendo os casos autossômico recessivos de perda auditiva (DFNB) caracterizados por perda auditiva congênita, geralmente causando um fenótipo mais severo, e levando em consideração o histórico familiar (ausência do fenótipo nos progenitores), foram analisadas tanto variantes em homozigose como em heterozigose composta que pudesse explicar o fenótipo nesta família. A possibilidade de herança autossômica dominante com penetrância incompleta não foi descartada. Como resultado, nenhuma variante candidata foi selecionada para demais análises nesta família, tendo os estudos descontinuados por não obter sucesso no contato com a família em busca de novas amostras de DNA para realizar a análise de segregação.

4.2.1.8. Família *Isr17*

Composta por cinco gerações de indivíduos provenientes do Iraque, três indivíduos apresentavam perda auditiva congênita (figura 92).

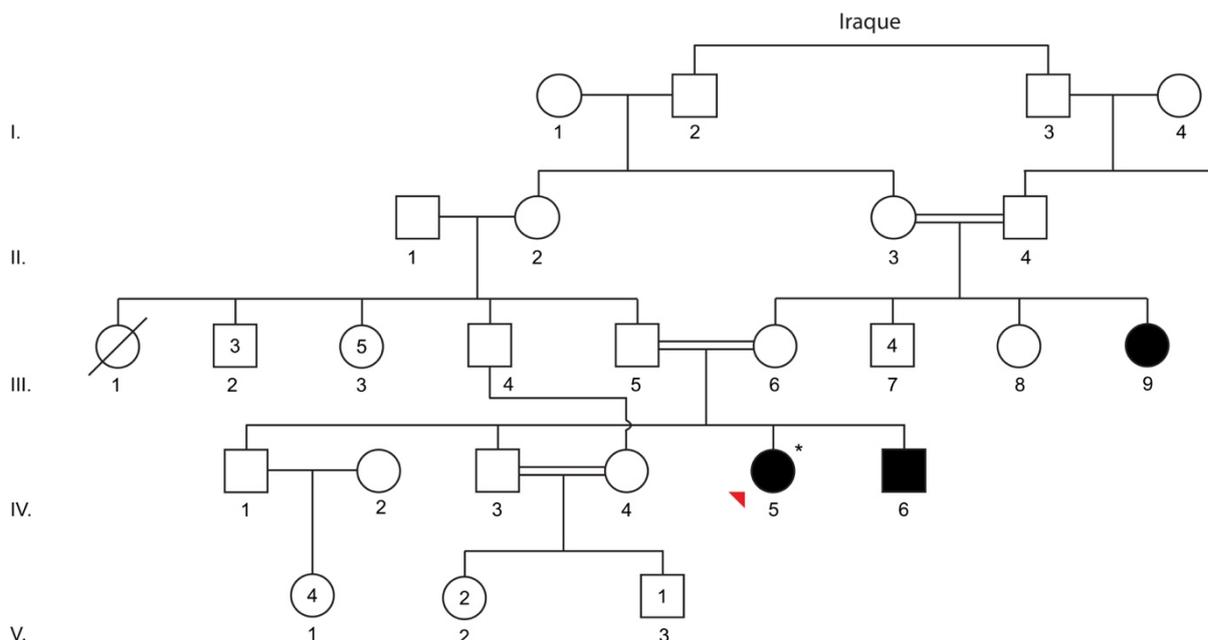


Figura 92. Heredograma da família *Isr17*. O asterisco indica qual amostra o laboratório detinha a amostra de DNA. O indivíduo IV:5, indicado pela seta vermelha, foi submetido ao sequenciamento paralelo massivo pelo painel *HEar-Seq v3*.

O indivíduo IV:5 foi submetido à análise da região codificante de 284 genes associados à perda auditiva. Por se tratar de uma família com diversos casamentos consanguíneos (inclusive no núcleo familiar estudado), a principal estratégia adotada para a priorização das variantes foi referente à herança autossômica recessiva, ou seja, variantes candidatas em homozigose ou heterozigose composta. Após o sequenciamento paralelo massivo, uma variante candidata presente em ambos alelos nesta família foi selecionada no gene *PCDH15* (tabela 30), associado com DFNB23 e síndrome de Usher tipo 1F (*USH1F*). Esta foi validada por sequenciamento de Sanger.

Tabela 30. Variante candidata da família *Isr17* e principais resultados das análises de predição *in silico*.

Gene	Variante (cDNA)	Variante (Proteína)	Sift	PolyPhen (hVar)	Mutation Taster	PhyloP	Genótipo
<i>PCDH15</i>	c.146T>C	p.Val49Ala	0,33 T	0,314 B	0,97 D	2,187	1/1:0,127

T: Tolerado

B: Benigno

D: Disease causing (Causador de patologia)

Por se tratar de uma variante nunca antes descrita, ela teve sua frequência analisada por *RFLP-PCR* e a endonuclease *PvuII*. Para esta análise, os fragmentos previamente amplificados de 220 pb foram digeridos. Indivíduos com a sequência normal não apresentavam o sítio de clivagem, porém indivíduos com a variante apresentavam um sítio de restrição, gerando dois fragmentos menores (27 pb e 193 pb). Foram analisados 127 indivíduos iraquianos, 143 indivíduos provenientes de diversas etnias e 147 indivíduos com perda auditiva de etiologia molecular desconhecida. A variante c.146T>C não foi identificada em nenhum dos 417 controles analisados (834 cromossomos).

Em análise subsequente, foi solicitada amostra de DNA de demais indivíduos da família para análise de segregação. Porém, a família decidiu por não mais participar dos estudos moleculares posteriores. Assim sendo, a análise desta família teve de ser descontinuada.

4.2.1.9. Família *Isr18*

A família *Isr18* compreendia indivíduos de descendência turca e síria. Composta por três gerações, apresentava três indivíduos com perda auditiva congênita bilateral severa (figura 93).

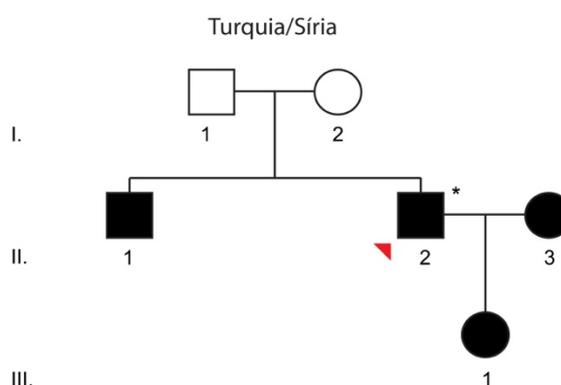


Figura 93. Heredograma da família *Isr18*. O asterisco indica qual amostra o laboratório detinha a amostra de DNA. O indivíduo II:2, indicado pela seta vermelha, foi submetido ao sequenciamento paralelo massivo pelo painel *HEar-Seq v3*.

O indivíduo II:2 foi submetido para análise da região codificante de 284 genes presentes no painel *HEar-Seq v3*. A principal estratégia adotada para a priorização das variantes foi referente à herança autossômica recessiva, uma vez que

a primeira geração da família não apresentou nenhum problema auditivo. Porém, foi considerada também a hipótese de herança autossômica dominante com penetrância incompleta. Após o sequenciamento paralelo massivo, uma nova variante c.7757A>G (p.Gln2586Arg), identificada em hemizigose no gene *DMD* foi considerada a principal candidata nesta família. Este gene é responsável pela Distrofia Muscular de Duchenne, a mais comum das distrofias, além da Distrofia Muscular de Becker. Mesmo sendo associado com este fenótipo mais severo, o locus do gene *DMD* já foi associado a um caso de perda auditiva neurosensorial (LALWANI et al., 1994; PFISTER et al., 1998). Assim sendo, esta variante foi validada por sequenciamento de Sanger.

Por se tratar de uma variante nunca antes relatada, esta teve sua frequência analisada por *RFLP-PCR* e a endonuclease *BsrBI*. Ao todo foram checados 127 indivíduos turcos, 133 indivíduos de diversas etnias e 118 indivíduos com perda auditiva de etiologia desconhecida. Dos 378 controles analisados, nenhum apresentou a variante em nenhum alelo.

Mais amostra de DNA dos demais indivíduos desta família, assim como testes clínicos complementares foram solicitados para a família, atentando também para algum tipo de distrofia presente. Porém a família, por motivos particulares, decidiu não prosseguir na pesquisa. Assim sendo, a análise desta família foi interrompida.

4.2.1.10. Família *Isr20*

A família *Isr20*, proveniente do Afeganistão, apresentou três indivíduos com perda auditiva mista progressiva bilateral leve/moderada (figura 94). Considerando o histórico familiar, a principal hipótese levantada para este caso correspondia ao padrão de herança autossômica dominante. Outro fator que reforçou esta hipótese estava no indivíduo I:2 apresentar o mesmo padrão de perda auditiva de que os indivíduos II:1 e II:2, porém com início tardio.

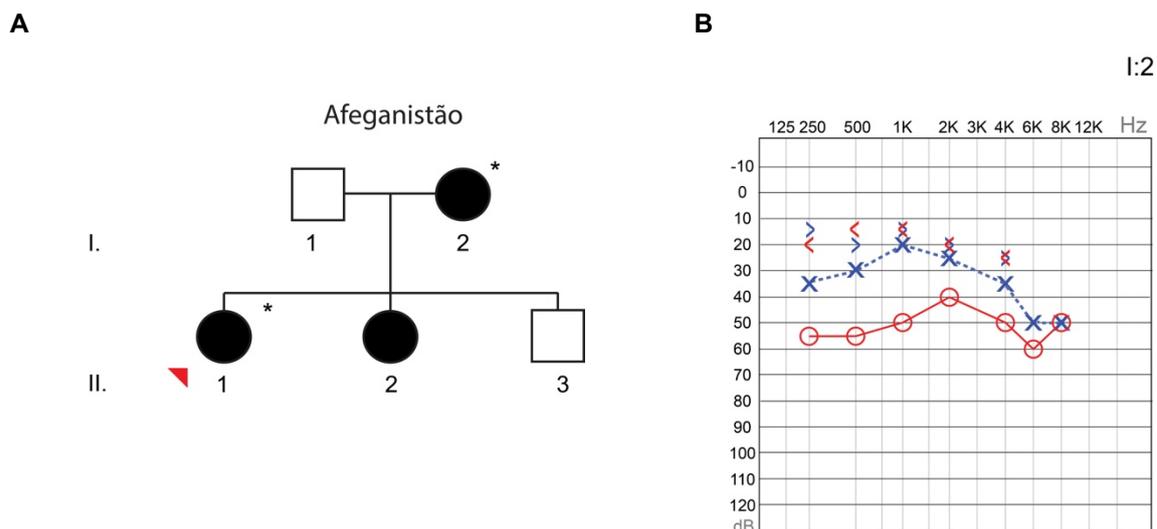


Figura 94. Informações sobre a família *Isr20*. **A:** Heredograma da família. Os asteriscos indicam quais indivíduos da família *Isr20* participaram da pesquisa. O indivíduo II:1, indicado pela seta vermelha, foi submetido ao sequenciamento paralelo massivo pelo painel *HEar-Seq v3*; **B:** Audiometria do indivíduo I:2, indicando perda auditiva mista bilateral leve/moderada, afetando principalmente a orelha direita. Via aérea: “O” vermelho (orelha direita) e “X” azul (orelha esquerda); Via óssea “<” vermelho (orelha direita) e “>” azul (orelha esquerda).

O indivíduo II:1 foi submetido ao sequenciamento massivo de 284 genes. Respeitando a hipótese inicial, foram analisadas as variantes identificadas neste indivíduo, identificando duas possíveis variantes candidatas, ambas em heterozigose (tabela 31).

Tabela 31. Variante candidata da família *Isr20* e principais resultados das análises de predição *in silico*.

Gene	Variante (cDNA)	Variante (Proteína)	MAF	Sift	PolyPhen (hVar)	Mutation Taster	PhyloP	Genótipo
FGFR1 NM_015850	c.386A>C	p.Asp129Ala	-	0,01 D	0,997 D	0,99 D	2,174	0/1:65,61
LRP2 NM_004525	c.10804A>T	p.Arg3602Thr	0,005969	0,28 T	0,935 D	0,99 D	1,278	0/1:212,181

MAF: *Minor Allele Frequency* (Menor Frequência Alélica)

T: Tolerado

D: *Disease causing* (Causador de patologia)

Porém, ao analisar a segregação das variantes por sequenciamento de Sanger na irmã afetada do probando (I:2), foi possível visualizar que ambas variantes estavam ausentes. Não havendo o esclarecimento da etiologia da perda auditiva após

o sequenciamento pelo painel *HEar-Seq v3*, a família foi indicada para a realização do sequenciamento completo do exoma para identificar novos possíveis genes associados à perda auditiva.

4.2.2. Casos inconclusivos utilizando o *WES*

Três famílias brasileiras (*Bra03*, *Bra04* e *Bra05*) que foram submetidos para o sequenciamento completo do exoma não tiveram a etiologia esclarecida. Após o sequenciamento paralelo massivo, a priorização ocorreu utilizando os 284 genes associados à perda auditiva contidos no painel *HEar-Seq 3*. Porém, nenhuma variante candidata contida nestes genes pode esclarecer o fenótipo. Assim sendo, duas podem ser as possíveis explicações para tais casos. A primeira corresponderia à uma limitação da técnica/*kit* utilizados, resultando na falta de cobertura de algumas regiões destes genes selecionados. A outra possibilidade estaria na causa da perda auditiva nestas famílias corresponder estar em novos genes nunca antes associados com perda auditiva em camundongos e humanos.

4.2.2.1. Família *Bra03*

Esta família brasileira, descendente de judeus asquenazes, apresentou três indivíduos com perda auditiva neurossensorial progressiva, sendo a mãe (I:2) e dois filhos (II:1 e II:2) (Figura 95). Todos afetados apresentam perda auditiva bilateral leve para severa, principalmente nas altas frequências. Em um dos indivíduos, I:2, este quadro se agravou com a idade (progressiva), evoluindo para perda auditiva moderada para profunda.

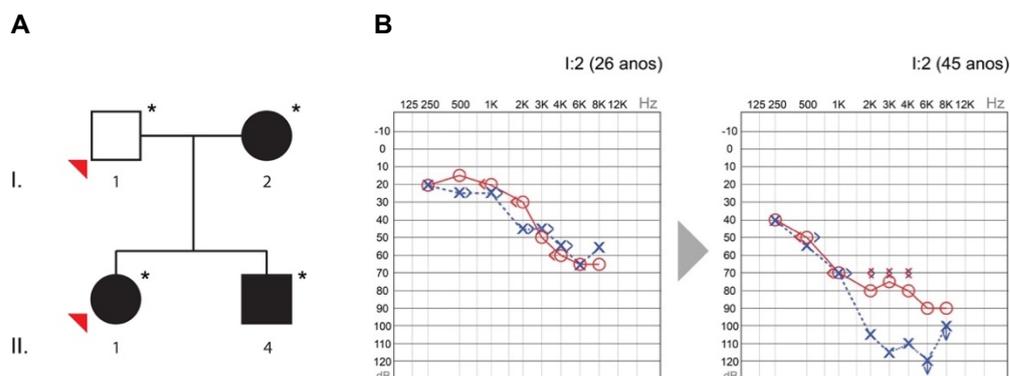


Figura 95. Informações da família *Bra03*. **A:** Heredograma da família. Indivíduos indicados com a seta vermelha foram sequenciados por meio do *WES*. Os asteriscos indicam os indivíduos que participaram da pesquisa; **B:** Audiometria do indivíduo I:2, indicando perda auditiva progressiva neurosensorial bilateral moderada/profunda, afetando principalmente a orelha esquerda. Via aérea: “O” vermelho (orelha direita) e “X” azul (orelha esquerda); Via óssea “<” vermelho (orelha direita) e “>” azul (orelha esquerda).

Nenhuma variante foi identificada no probando (II:1) durante a triagem molecular primária envolvendo os genes *GJB2*, *GJB6* e *MTRNR1*, tornando esta família apta para ter o exoma completo sequenciado.

Foram analisadas as variantes de 284 genes associados com perda auditiva (painel *HEar-seq v3* virtual), hipotetizando uma possível herança autossômica dominante (devido ao histórico familiar e o tipo de perda auditiva). Ao término da priorização das variantes, nenhuma foi selecionada como possível candidata. Assim, acredita-se que a causa da perda auditiva nesta família esteja em algum mecanismo relacionado à perda auditiva ainda não relatado.

4.2.2.2. Família *Bra04*

Nesta família brasileira de cinco gerações, 16 indivíduos foram relatados com perda auditiva bilateral (figura 96). Indivíduos provenientes do casamento entre III:3 e III:4 apresentaram perda auditiva bilateral leve/moderada.

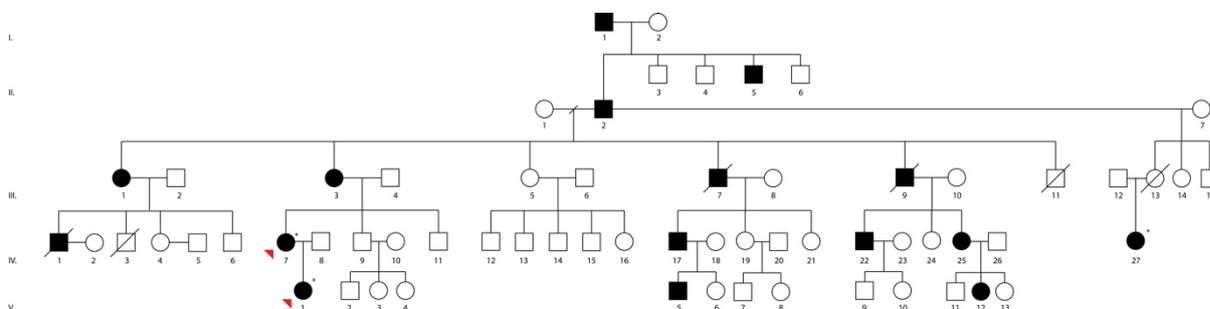


Figura 96. Heredograma da família *Bra04*. Indivíduos indicados com a seta vermelha (IV:7 e V:1) foram sequenciados por meio do *WES*. Os asteriscos indicam os indivíduos que participaram da pesquisa.

A análise primária desta família, assim como a preparação da biblioteca genômica para a realização do *WES* foram realizados pela Dra. Sueli Matilde Costa

Silva (CBMEG/UNICAMP). Nenhuma variante foi identificada nos indivíduos IV:7 e V:1 durante a triagem molecular primária envolvendo os genes *GJB2*, *GJB6* e *MTRNR1*, tornando esta família apta para ter o exoma completo sequenciado.

Foram analisadas as variantes de 284 genes associados com perda auditiva (painel *HEar-seq v3* virtual), hipotetizando uma possível herança autossômica dominante (devido ao histórico familiar e o tipo de perda auditiva). Porém, ao término da priorização das variantes, nenhuma foi selecionada como possível candidata. Assim sendo, acredita-se que a causa da perda auditiva nesta família esteja em algum novo mecanismo relacionado à perda auditiva.

4.2.2.3. Família *Bra05*

A família brasileira *Bra05*, com descendência Italiana (região de Veneto), apresentou quatro indivíduos com perda auditiva mista, progressiva, bilateral (não-simultânea) e profunda (figura 97). Dentre as informações complementares, o indivíduo III:3 faz uso de aparelhos amplificadores de sinal em ambas orelhas. Já o indivíduo IV:3 passou por cirurgia aos 33 anos, para a implantação do implante coclear em ambas orelhas, apresentando leve melhora na audição.

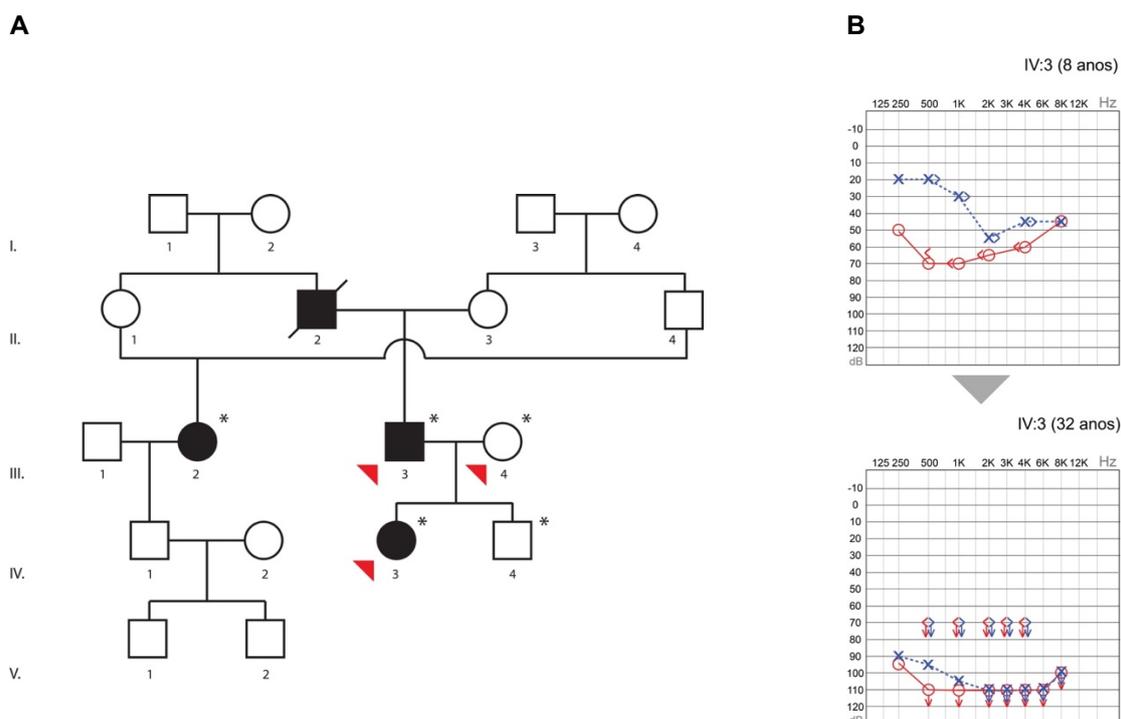


Figura 97. Informações referentes à família *Bra05*. **A:** Heredograma da família. Indivíduos indicados com a seta vermelha (III:3, III:4 e IV:3) foram sequenciados por meio do *WES*. Os asteriscos indicam

os indivíduos que participaram da pesquisa; **B**: Audiometria do indivíduo IV:3, indicando perda auditiva bilateral mista progressiva severa/profunda. Via aérea: “O” vermelho (orelha direita) e “X” azul (orelha esquerda); Via óssea “<” vermelho (orelha direita) e “>” azul (orelha esquerda).

Nenhuma variante foi identificada no probando (IV:3) durante a triagem molecular primária envolvendo os genes *GJB2*, *GJB6* e *MTRNR1*, tornando esta família apta para ter o exoma completo sequenciado.

Foram analisadas as variantes de 284 genes associados com perda auditiva, hipotetizando uma possível herança autossômica dominante (devido ao histórico familiar e o tipo de perda auditiva). Ao término da priorização das variantes, nenhuma foi selecionada como possível candidata. Assim sendo, acredita-se que a causa da perda auditiva nesta família esteja em algum novo mecanismo relacionado à perda auditiva.

4.3. Sequenciamento paralelo massivo e perda auditiva

As tecnologias de sequenciamento paralelo massivo tiveram papel fundamental na revolução genética. Dentre as principais ferramentas, envolvendo esta plataforma, podemos ressaltar o sequenciamento completo do genoma (*WGS*), do exoma (*WES*) e o painel de captura de genes (*TGC*). Como apresentado, cada um apresenta diferenças em relação ao objetivo da análise. Por exemplo, o *WGS* permite identificar a grande maioria do genoma estudado, incluindo regiões intergênicas e intrônicas. O *WES* permite sequenciar todos os éxons (aproximadamente 180.000 éxons), referente à 1% do genoma humano, sendo esta porção codificante conhecida por conter mutações responsáveis por 85% dos casos de desordens Mendelianas. Já no caso do *TGC*, o seu uso é recomendado para o estudo de desordens que apresentam grande heterogeneidade genética conhecida. Como a grande maioria das ferramentas moleculares, o sequenciamento paralelo massivo também apresenta suas limitações. No caso do *WGS* podemos indicar a geração de grande quantidade de dados, necessitando análises mais complexas, enquanto que no *WES* as limitações correspondem ao sequenciamento apenas de 1% do genoma humano, excluindo regiões intergênicas e intrônicas que podem conter variações que possibilitariam explicar o fenótipo analisado. No que diz respeito ao *TGC*, pode ser destacado o sequenciamento de um número ainda inferior de genes quando

comparado com *WES*, impossibilitando não apenas o diagnóstico molecular, mas também a descoberta de novos genes relacionados às desordens estudadas (ATIK et al., 2015; YAN et al., 2013b).

Os estudos dos fatores genéticos da perda auditiva iniciaram na década de 1990, principalmente pela estratégia de análise de ligação, permitindo identificar quais *loci* estavam associados à perda. Porém, a indisponibilidade de grandes famílias para este tipo estudo, além da penetrância reduzida, figuraram entre as limitações da técnica. O sequenciamento de Sanger também apresentou enorme influência no estudo de doenças genéticas, sendo ainda hoje considerada a técnica padrão ouro no estudo e validação de variantes genômicas. Porém, como de conhecimento, esta tecnologia apresenta baixo rendimento e alto custo (ATIK et al., 2015; SHEARER; SMITH, 2015). Apesar dos grandes esforços na elucidação dos fatores genéticos causadores de perda auditiva, estas duas estratégias juntas permitiram identificar 60 genes associados a este fenótipo, seja síndrômico ou não-síndrômico (ATIK et al., 2015).

Após o surgimento das tecnologias de sequenciamento paralelo massivo, o número relacionado à perda auditiva superou os 100 genes, iniciando com a identificação do gene *TPRN*, seguido do gene *GPSM2*, ambos associados com perda auditiva não-síndrômica autossômica recessiva (REHMAN et al., 2010; WALSH et al., 2010b). Após este estudo, o montante de trabalhos envolvendo sequenciamento paralelo massivo e perda auditiva aumentou, apresentando 28 trabalhos publicados em revistas científicas conceituadas apenas cinco anos após a associação do gene *TPRN* com a perda auditiva (SHEARER; SMITH, 2015).

O primeiro painel de captura envolvendo genes associados à perda auditiva, denominado *OtoSCOPE*, foi desenvolvido em 2010 e dispunha de 66 genes, permitindo identificar a etiologia molecular de cinco das seis famílias estudadas (SHEARER et al., 2010). Embora revolucionário, este painel apresentava apenas genes conhecidos como causadores de perda auditiva em humanos. Um ano após este trabalho ser publicado, outro painel foi apresentado, o *HEar-Seq v1*. Este apresentava 246 genes associados à perda auditiva síndrômica (82 genes) e não-síndrômica (162 genes), em humanos e camundongos (BROWNSTEIN et al., 2011). Demais genes foram adicionados à ambos painéis dentre estes cinco anos, estando o *OtoSCOPE* na oitava versão, com 152 genes humanos, e o *HEar-Seq* na sua quarta

versão, com 392 genes humanos e genes de camundongos ortólogos de genes humanos.

Diversos painéis de captura, com diferentes enfoques, estão disponíveis para triagem da perda auditiva, seja para pesquisa ou para diagnóstico clínico. O esclarecimento da etiologia da perda auditiva pelos TGC disponíveis e sequenciamento completo do exoma apresenta média de 41% dos 603 casos estudados, variando de 10% a 83% dependendo do painel utilizado (SHEARER; SMITH, 2015). Este valor está de acordo com os resultados identificados neste trabalho, que possibilitou o esclarecimento da etiologia da perda auditiva para 48% dos casos (12/25 casos).

Ao analisar os casos concluídos previamente relatados, e compará-los com o tipo de perda auditiva dos 603 casos estudados, maiores foram as chances de elucidar casos autossômicos dominantes (65% dos casos) quando comparados aos casos autossômicos recessivos ou esporádicos (40%) (SHEARER; SMITH, 2015).

Ao todo, dos 12 casos que obtiveram a etiologia esclarecida neste estudo, cinco representavam casos de herança autossômica dominante (41,67% dos casos), enquanto que os sete casos restantes apresentavam herança autossômica recessiva (58,33% dos casos). Ao considerar, separadamente, o painel *HEar-seq v3* e o sequenciamento completo do exoma, estes valores ficaram mais discrepantes. Nos 10 casos solucionados apenas pelo painel *HEar-seq v3*, três correspondiam à herança autossômica dominante (30% dos casos), enquanto que as sete famílias com herança autossômica recessiva correspondiam à 70% dos casos. A diferença de valores, quando comparados à literatura, pode ter ocorrido devido à alta taxa de endogamia nas famílias do Oriente Médio, representando três das sete famílias com padrão de herança autossômico recessivo que tiveram etiologia da perda auditiva solucionadas pelo painel *HEar-Seq v3*. Mesmo com a exclusão destes três casos de consanguinidade, os casos autossômicos recessivos, analisados pelo painel *HEar-Seq v3*, continuaram sendo maioria, o que pode ser explicado pelas variantes candidatas serem comuns às populações do Oriente Médio. Já considerando apenas os casos concluídos pelo sequenciamento completo do exoma, ambas famílias respeitavam o padrão de herança autossômico dominante.

Este trabalho também permitiu ressaltar a importância do uso de ferramentas moleculares para a elaboração de um diagnóstico preciso, principalmente quando tratados os casos sindrômicos. As 25 famílias foram inicialmente

diagnosticadas clinicamente como casos não-sindrômicos de perda auditiva. Porém, das 12 famílias solucionadas, três apresentaram variantes patogênicas em genes associados às síndromes, sendo um caso associado à síndrome de Usher tipo 2 e dois casos associados à síndrome de Barakat. Pelo fato da síndrome de Usher tipo 2 apresentar manifestações clínicas tardiamente (retinose pigmentar na segunda década de vida), muitas vezes um diagnóstico clínico conclusivo na primeira década de um indivíduo pode ser prejudicado. Este trabalho também identificou dois casos envolvendo o gene *GATA3*, associando os casos familiares à síndrome de Barakat. Pela complexidade desta síndrome, assim como sua heterogeneidade em relação às manifestações clínicas, o diagnóstico clínico pode ser equivocado. Assim sendo, esta tese sugere a análise do gene *GATA3* na suspeita de casos de síndrome de Barakat.

Embora o sequenciamento paralelo massivo tenha se tornado uma estratégia muito eficiente para o estudo genético de patologias humanas, principalmente as consideradas heterogêneas, como o caso da perda auditiva, alguns pontos fundamentais devem ser levados em consideração, como: (i) o sequenciamento paralelo massivo pode apresentar maior taxa de erro na identificação de um nucleotídeo sequenciado, sendo necessário a validação dos resultados identificados por sequenciamento de Sanger; (ii) muitas variantes identificadas durante o sequenciamento paralelo massivo não apresentam caracterização funcional, sendo necessário a melhor caracterização das variantes candidatas e seus efeitos; (iii) o custo desta plataforma, que embora apresente redução devido à corrida do aperfeiçoamento do sequenciamento paralelo massivo, ainda continua impraticável para grande maioria das pessoas; (iv) a análise do número de cópias (*CNV*, do inglês *Copy Number Variation*) é limitado quando utilizando esta plataforma e (v) as questões éticas envolvidas na difusão desta tecnologia, como os achados incidentais e a interpretação dos resultados provenientes desta plataforma por pessoas sem qualificação correta, etc., precisam ser melhor trabalhadas. Outra limitação da técnica encontra-se no sequenciamento de regiões repetitivas do genoma, estas que não são possíveis de serem sequenciadas pela maioria das plataformas de sequenciamento paralelo massivo e que correspondem à, aproximadamente, 8% do genoma humano (SHEARER; SMITH, 2012; YAN et al., 2013b).

O uso do sequenciamento paralelo massivo vem se tornando a melhor estratégia a ser adotada para o esclarecimento de desordens genéticas, devido ao custo e tempo empregado para a identificação de possível variante candidata, quando

comparada às estratégias e técnicas convencionais, como análise de ligação e sequenciamento de Sanger. Ao tratar de desordens heterogêneas, como o caso da perda auditiva, o sequenciamento paralelo massivo torna-se a ferramenta mais promissora na identificação e esclarecimento da etiologia (BROWNSTEIN et al., 2013). Porém, a crescente corrida para a elaboração do painel de captura mais abrangente para o diagnóstico da perda auditiva deve ser seguida de uma questão fundamental: “Este painel realmente abrange todos os genes associados ao mecanismo da audição?”. Mesmo que o painel contenha todos os genes envolvidos no mecanismo responsável pela audição, devemos ter ciência de que a ausência de uma variante candidata após o sequenciamento paralelo massivo não exclui a possibilidade da causa da perda auditiva ser de origem genética, como observado nos promissores estudos envolvendo epigenética.

5. CONCLUSÕES

- A hipótese levantada por este trabalho foi de que mais de 70% dos casos estudados seriam solucionados com a utilização do painel *HEar-seq v3* e *WES*. Porém, como observado, o esclarecimento da etiologia da perda auditiva das famílias estudadas foi de 48% (12/25 casos).
- Dos casos esclarecidos, nove correspondiam à perda auditiva não sindrômica (três casos de DFNA e seis casos de DFNB) e os três casos restantes correspondiam à perda auditiva sindrômica (dois casos de síndrome de Barakat e um caso de síndrome de Usher tipo 2).
- A síndrome de Barakat (*HDR syndrome*) foi identificada em duas das 12 famílias com perda auditiva esclarecida. Inicialmente, ambas famílias foram diagnosticadas clinicamente como casos não-sindrômicos de perda auditiva, o que foi corrigido pela análise molecular. Assim, este trabalho sugere a inclusão do gene *GATA3* na presença de qualquer manifestação clínica relacionada à esta síndrome.
- Das 20 famílias estudadas pelo o painel de captura *HEar-Seq v3*, 10 tiveram seu diagnóstico molecular da perda auditiva concluído, correspondente à 50% de eficiência. Com isso, as variantes candidatas foram validadas funcionalmente e correlacionadas com o tipo de perda auditiva presente, como observado abaixo:
 - Família *Isr01*: as variantes em heterozigose composta c.349C>T (p.Leu117Phe) e c.578C>T (p.Thr193Ile), no gene *SLC26A4*, foram as responsáveis pela perda auditiva neurosensorial bilateral profunda congênita e aqueduto vestibular alargado (AVA). Ambas variantes já haviam sido relatadas, sendo a primeira com patogenicidade desconhecido e a segunda considerada patogênica. Assim sendo, estudos de co-localização da proteína Pendrina contendo a variante p.Leu117Phe permitiram identificar esta proteína retida no retículo endoplasmático ao invés da membrana citoplasmática. O efeito de ambas variantes segregando em heterozigose composta (*trans*) foi

associado ao fenótipo de DFNB4 nesta família, sendo registrado no banco de dados *ClinVar*, com número 424816.

- Família *Isr02*: a nova variante c.9685delG (p.Glu3229Argfs*72) em homozigose, no gene *USH2A*, foi relacionado ao fenótipo de perda auditiva congênita bilateral profunda. Esta deleção acaba por alterar o quadro de leitura do transcrito e proteína, inserindo um códon de terminação prematura na posição 3301. Isto acarreta na exclusão de 16 domínios de Fibronectina do tipo-3, além do *motif* de ligação do domínio *PDZ*, necessário para interação com a proteína Harmonina. A principal hipótese referente ao efeito desta variante está na desestruturação dos feixes ciliados das CCI e CCE, afetando o mecanismo de mecanotransdução. Nenhum dos controles utilizados para análise de frequência apresentou esta variante candidata. O efeito desta variante em homozigose foi associado ao fenótipo síndrome de Usher tipo 2 nesta família, sendo registrado nos bancos de dados *ClinVar*, com número 236049, e *dbSNP* (*rs878853233*).
- Família *Isr03*: uma nova variante, a inserção c.681_682insACCACCCC ATCAGCACTCACCCGCCCTACGTGCCC, em heterozigose no gene *GATA3*, foi a responsável pelo quadro de perda auditiva sindrômica nesta família, então diagnosticada com Síndrome de Barakat (Síndrome *HDR*). Esta inserção altera o quadro de leitura da proteína, inserindo um códon de terminação prematura após o resíduo 265 da proteína. Isto resulta na remoção dos dois domínios *Zinc Fingers* da proteína, causando o quadro sindrômico de perda auditiva por haploinsuficiência do gene *GATA3*. Nenhum dos controles utilizados para análise de frequência apresentou esta variante candidata. O efeito desta variante em heterozigose foi associado ao fenótipo síndrome de Barakat nesta família, sendo registrado nos bancos de dados *ClinVar*, com número 236031, e *dbSNP* (*rs878853222*).
- Família *Isr04*: a nova variante c.139+1G>A, em heterozigose, no sítio doador de *splicing* do gene *SLC12A6*, permitiu identificar uma isoforma desta proteína sem o terceiro éxon. Esta variante, segregando com o fenótipo de perda auditiva, foi analisada por ensaios de co-localização e testes eletrofisiológicos. Embora a isoforma sem o terceiro éxon esteja

localizada na membrana citoplasmática, assim como a proteína normal, testes eletrofisiológicos permitiram identificar o ganho de função da proteína contendo a variante, permitindo maior fluxo de K^+/Cl^- . Este efeito é predito em causar a quebra da homeostase de K^+ na orelha interna, processo fundamental para a mecanotransdução, resultando no fenótipo de perda auditiva. Nenhum dos controles utilizados para análise de frequência apresentou esta variante candidata. O gene *SLC12A6* não havia sido associado à perda auditiva em humanos, sendo este o primeiro caso ligado ao padrão autossômico dominante de herança. Demais estudos estão em andamento para melhor suporte destes resultados.

- Família *Isr05*: as duas variantes, c.4227+1G>T (nova) e c.5193-1G>A (patogênica), ocorrendo em heterozigose composta no gene *OTOF* foram as responsáveis pelo quadro de neuropatia auditiva nesta família. Análises estruturais, assim como *in silico*, permitiram identificar que ambas variantes causam a extinção dos sítios de *splicing* a que correspondem, gerando proteínas truncadas sem a porção C-terminal, contendo a região transmembrânica. Além deste efeito, ambas variantes foram preditas em abolir domínios C2, importantes para a interação com Ca^{2+} . O efeito de ambas variantes segregando em heterozigose composta (*trans*), foi associado ao fenótipo de DFNB9 nesta família, sendo registrado no banco de dados *ClinVar*, com número 424809. A variante c.4227+1G>T, ausente nos controles utilizados para checagem da frequência, também foi registrada no banco de dados *dbSNP* com identificação *rs397515601*.
- Família *Isr06*: a variante c.1473_1473+2delGGTinsC, nunca antes descrita, em heterozigose no gene *MYO6* foi identificada como responsável pelo fenótipo de perda auditiva nesta família. Análises *in vitro*, inserindo a variante no gene *MYO6* endógeno por meio da técnica *CRISPR/Cas9 (HDR)*, permitiu identificar a exclusão do éxon 14 da proteína Miosina VI. Como efeito desta variante, um códon de terminação prematura é adicionado após o resíduo 472, excluindo regiões importantes da para a formação de homodímeros e interação com a molécula alvo a ser transportada, além de afetar o domínio motor

da miosina. Nenhum dos controles utilizados para análise de frequência apresentou esta variante candidata. A possível haploinsuficiência do gene *MYO6* foi associado ao fenótipo DFNA22 nesta família, sendo este resultado registrado nos bancos de dados *ClinVar*, com número 236034, e *dbSNP* (*rs878853225*).

- Família *Isr08* e *Isr09*: a presença da variante c.4171C>G (p.Arg1391Gly), no gene *STRC*, em heterozigose composta com uma nova deleção de 0,1 Mb de comprimento na posição 15q15.3 foi responsável pelo fenótipo de DFNB16 em ambas famílias judias. A variante c.4171C>G já havia sido relatadas como causadora de perda auditiva em famílias judias quando associada às deleções nesta região, principalmente envolvendo o gene *STRC*. Esta nova deleção, afetando quatro genes, inclusive o *STRC*, foi registrado nos bancos de dados *ClinVar*, com número 236065.
- Família *Isr15*: a presença da nova variante c.703C>T (p.Arg235Cys) em homozigose no gene *CEACAM16*, foi responsável pelo fenótipo de perda auditiva nesta família. Esta variante é predita por afetar a conformação da proteína CEACAM16, assim como sua interação com membrana tectorial. A variante esteve presente em três indivíduos iranianos utilizados como controle na análise de frequência (0,8596%), indicando possível efeito fundador para esta variante. Este pode ser o primeiro caso associando o gene *CEACAM16* ao padrão de herança autossômico recessivo (DFNB), sendo o achado registrado nos bancos de dados *ClinVar*, com número 236048, e *dbSNP* (*rs746164064*). Mesmo apresentando fortes indícios de que a variante candidata possa ser responsável pela perda auditiva autossômica recessiva na família, estudos funcionais precisam ser realizados para a confirmação do efeito patogênico e associação deste gene com DFNB.
- Família *Isr19*: a presença das variantes c.3385G>A (p.Gly1129Arg) e c.966_967insC (p.Thr323Hisfs*19) em heterozigose composta no gene *COL11A2* foi associado ao fenótipo de perda auditiva nesta família. A variante c.3385G>A, nunca antes relatada, afeta o *motif* G-X-Y da proteína codificada pelo gene *COL11A2*, necessário para a flexibilidade desta. A segunda variante, c.966_967insC, acaba por inserir um códon

de terminação prematura na posição 341 da proteína, excluindo domínios e regiões importantes próximos à região C-terminal. Nenhum dos controles utilizados para análise de frequência apresentou nenhuma das variantes candidatas. A heterozigose composta de ambas variantes foi associada ao quadro de DFNB53 nesta família.

- Das cinco famílias brasileiras estudadas pelo sequenciamento completo do exoma (*WES*), duas tiveram seu diagnóstico molecular da perda auditiva concluído. Ambas famílias apresentaram mutações já relatadas na literatura como patogênicas. Assim, não houve a necessidade de realizar experimentos funcionais para identificar o efeito das variantes. Dos casos concluídos, as mutações foram correlacionadas com o tipo de perda auditiva presente, como observado abaixo:
 - Família *Bra01*: a mutação c.2114G>A (p.Arg705His) em heterozigose, no gene *MYH9*, foi o responsável pelo fenótipo de perda auditiva nesta família. Esta já havia sido relatadas previamente como patogênica em duas famílias, além de ter seu efeito deletério comprovado funcionalmente. Nenhum dos controles utilizados para análise de frequência apresentou esta variante candidata. Assim sendo, a etiologia molecular da perda auditiva nesta família foi associada à DFNA17.
 - Família *Bra02*: esta família, previamente diagnosticada como um caso de perda auditiva não-sindrômico, teve, por meio da análise molecular, seu diagnóstico corrigido como um caso sindrômico. A mutação *de novo* c.1099C>T (p.Arg367*), no gene *GATA3*, já havia sido relatada previamente em quatro famílias, sendo associada à síndrome de Barakat (síndrome *HDR*) devido à haploinsuficiência do gene *GATA3*. A reavaliação clínica permitiu identificar agenesia renal direita no probando, associando o caso desta família à síndrome de Barakat, o primeiro relato desta síndrome na população brasileira.
- De todas as famílias analisadas, 13 não tiveram a etiologia da perda auditiva identificada, sendo 10 casos utilizando o painel *HEar-Seq v3* e três casos pelo sequenciamento completo do exoma (*WES*). A falha no esclarecimento da etiologia da perda auditiva se deu pelos fatores abaixo descritos:

- Famílias *Isr07*, *Isr10*, *Isr11*, *Isr12*, *Isr13*, *Isr14* e *Isr20*: não foi possível identificar a causa genética destas famílias utilizando painel *HEar-Seq v3*, uma vez que a o componente genético causador do fenótipo pode não estar incluso entre os 284 genes selecionados neste painel. Foi recomendado o sequenciamento completo do exoma para estas famílias.
- Família *Isr16*: impossibilidade de contato com a família para nova coleta de material genético resultou na descontinuação do estudo desta família.
- Famílias *Isr17* e *Isr18*: famílias optaram por não mais participar das pesquisas moleculares. Porém, houve a permissão de publicação dos dados atuais sem que houvesse a identificação dos indivíduos da família.
- Famílias *Bra03*, *Bra04* e *Bra05*: após o sequenciamento completo do exoma, houve a priorização de variantes presentes nos 284 genes associados à perda auditiva em humanos em camundongos (painel *HEar-Seq v3*). Porém, nenhuma variante candidata foi identificada nestes casos. Hipotetizou-se que a causa do fenótipo de perda auditiva, se genética, pode estar presente em algum novo gene nunca antes associado aos processos da audição.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABDELHAK, S. et al. A human homologue of the *Drosophila* eyes absent gene underlies branchio-oto-renal (BOR) syndrome and identifies a novel gene family. **Nature Genetics**, v. 15, n. 2, p. 157–164, 1997.
- ABE, S. et al. Prevalent connexin 26 gene (GJB2) mutations in Japanese. **Journal of Medical Genetics**, v. 37, p. 41–43, 2000.
- ABE, S. et al. Identification of CRYM as a candidate responsible for nonsyndromic deafness, through cDNA microarray analysis of human cochlear and vestibular tissues. **American Journal of Human Genetics**, v. 72, p. 73–82, 2003.
- ADATO, A. et al. Deafness heterogeneity in a Druze isolate from the Middle East: novel OTOF and PDS mutations, low prevalence of GJB2 35delG mutation and indication for a new DFNB locus. **European Journal of Human Genetics**, v. 8, p. 437–442, 2000.
- ADATO, A. et al. Usherin, the defective protein in Usher syndrome type IIA, is likely to be a component of interstereocilia ankle links in the inner ear sensory cells. **Human Molecular Genetics**, v. 14, n. 24, p. 3921–3932, 2005.
- AHMAD, N. et al. Stop codon in the procollagen II gene (COL2A1) in a family with the Stickler syndrome (arthro-ophthalmopathy). **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 88, p. 6624–6627, 1991.
- AHMED, Z. et al. USH1H, a novel locus for type I Usher syndrome, maps to chromosome 15q22-23. **Clinical Genetics**, v. 75, n. 1, p. 86–91, 2009.
- AHMED, Z. M. et al. Mutations of the Protocadherin gene PCDH15 cause Usher syndrome Type 1F. **American Journal of Human Genetics**, v. 69, p. 25–34, 2001.
- AHMED, Z. M. et al. Nonsyndromic recessive deafness DFNB18 and Usher syndrome type IC are allelic mutations of USH1C. **Human Genetics**, v. 110, p. 527–531, 2002.
- AHMED, Z. M. et al. PCDH15 is expressed in the neurosensory epithelium of the eye and ear and mutant alleles are responsible for both USH1F and DFNB23. **Human Molecular Genetics**, v. 12, n. 24, p. 3215–3223, 2003a.
- AHMED, Z. M. et al. Mutations of MYO6 are associated with recessive deafness,

- DFNB37. **American Journal of Human Genetics**, v. 72, p. 1315–1322, 2003b.
- AHMED, Z. M. et al. Mutations of LRTOMT, a fusion gene with alternative reading frames, cause nonsyndromic deafness in humans. **Nature Genetics**, v. 40, n. 11, p. 1335–1340, 2008.
- AHMED, Z. M. et al. Functional null mutations of MSRB3 encoding methionine sulfoxide reductase are associated with human deafness DFNB74. **American Journal of Human Genetics**, v. 88, p. 19–29, 2011.
- AIN, Q. et al. The autosomal recessive nonsyndromic deafness locus DFNB72 is located on chromosome 19p13.3. **Human Genetics**, v. 122, p. 445–450, 2007.
- ALAGRAMAM, K. N. et al. Mutations in the novel protocadherin PCDH15 cause Usher syndrome type 1F. **Human Molecular Genetics**, v. 10, n. 16, p. 1709–1718, 2001.
- ANGELI, S.; LIN, X.; LIU, X. Z. Genetics of hearing and deafness. **The Anatomical record**, v. 295, p. 1812–1829, nov. 2012.
- AST, G. How did alternative splicing evolve? **Nature Reviews Genetics**, v. 5, p. 773–782, 2004.
- ATIK, T. et al. Whole-exome sequencing and its impact in hereditary hearing loss. **Genetics Research**, v. 97, p. e4, 2015.
- ATTIÉ, T. et al. Mutation of the endothelin-receptor B gene in Waardenburg-Hirschsprung disease. **Human Molecular Genetics**, v. 4, n. 12, p. 2407–2409, 1995.
- AVIDAN, N. et al. CATSPER2, a human autosomal nonsyndromic male infertility gene. **European Journal of Human Genetics**, v. 11, p. 497–502, 2003.
- AVRAHAM, K. B. et al. The mouse Snell's waltzer deafness gene encodes an unconventional myosin required for structural integrity of inner ear hair cells. **Nature genetics**, v. 11, n. 4, p. 369–375, 1995.
- AZAIEZ, H. et al. TBC1D24 mutation causes autosomal-dominant nonsyndromic hearing loss. **Human Mutation**, v. 35, n. 7, p. 819–823, 2014.
- AZAIEZ, H. et al. HOMER2, a stereociliary scaffolding protein, is essential for normal hearing in humans and mice. **PLoS Genetics**, v. 11, n. 3, p. 1–17, 2015.
- BABOOLAL, T. G. et al. The SAH domain extends the functional length of the myosin lever. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 106, n. 52, p. 22193–22198, 2009.

- BACINO, C. et al. Susceptibility mutations in the mitochondrial small ribosomal RNA gene in aminoglycoside induced deafness. **Pharmacogenetics**, v. 5, n. 3, p. 165–172, 1995.
- BAKER, S. et al. A loss of function mutation in the COL9A2 gene cause autosomal recessive Stickler syndrome. **American Journal of Medical Genetics Part A**, v. 155, p. 1668–1672, 2011.
- BALDWIN, C. T. et al. Linkage of congenital, recessive deafness (DFNB4) to chromosome 7q31 and evidence for genetic heterogeneity in the middle eastern druze population. **Human Molecular Genetics**, v. 4, n. 9, p. 1637–1642, 1995.
- BAO, R. et al. Review of current methods, applications, and data management for the bioinformatics analysis of Whole Exome Sequencing. **Libertas Academica**, v. 13, p. 67–82, 2014.
- BARAKAT, A. Y. et al. Familial nephrosis, nerve deafness, and hypoparathyroidism. **The Journal of Pediatrics**, v. 91, n. 1, p. 61–64, 1977.
- BARKER, D. et al. Identification of mutations in the COL4A5 collagen gene in Alport syndrome. **Science**, v. 248, n. 4960, p. 1224–1227, 1990.
- BEHLOULI, A. et al. EPS8, encoding an actin-binding protein of cochlear hair cell stereocilia, is a new causal gene for autosomal recessive profound deafness. **Orphanet Journal of Rare Diseases**, v. 9, p. 55, 2014.
- BEN-YOSEF, T. et al. Claudin 14 knockout mice, a model for autosomal recessive deafness DFNB29, are deaf due to cochlear hair cell degeneration. **Human Molecular Genetics**, v. 12, n. 16, p. 2049–2061, 2003.
- BEN SAID, M. et al. A mutation in SLC22A4 encoding an organic cation transporter expressed in the cochlea stria endothelium causes human recessive non-syndromic hearing loss DFNB60. **Human Genetics**, v. 135, n. 5, p. 513–524, 2016.
- BENOUDIBA, F.; TOULGOAT, F.; SARRAZIN, J. L. The vestibulocochlear nerve (VIII). **Diagnostic and Interventional Imaging**, v. 94, n. 10, p. 1043–1050, 2013.
- BERGER, W. et al. Isolation of a candidate gene for Norrie disease by positional cloning. **Nature Genetics**, v. 1, n. 3, p. 199–203, 1992.
- BESPALOVA, I. N. et al. Mutations in the Wolfram syndrome 1 gene (WFS1) are a common cause of low frequency sensorineural hearing loss. **Human Molecular Genetics**, v. 10, n. 22, p. 2501–2508, 2001.

- BHONKER, Y. et al. The GPSM2/LGN GoLoco motifs are essential for hearing. **Mammalian Genome**, v. 27, p. 29–46, 2015.
- BILOUS, R. W. et al. Brief report: autosomal dominant familial hypoparathyroidism, sensorineural deafness, and renal dysplasia. **New England Journal of Medicine**, v. 327, n. 15, p. 1069–1074, 1992.
- BIRKAN, M. **Next Generation Sequencing leads to discovery of new mutations related to deafness in the Middle East**. [s.l.] Tel Aviv University, 2015.
- BITNER-GLINDZICZ, M. et al. A recessive contiguous gene deletion causing infantile hyperinsulinism, enteropathy and deafness identifies the Usher type 1C gene. **Nature Genetics**, v. 26, p. 56–60, 2000.
- BITNER-GLINDZICZ, M. Hereditary deafness and phenotyping in humans. **British Medical Bulletin**, v. 63, p. 73–94, 2002.
- BOETTGER, T. et al. Deafness and renal tubular acidosis in mice lacking the K-Cl co-transporter Kcc4. **Nature Letters**, v. 416, n. 25, p. 13445–13452, 2002.
- BOETTGER, T. et al. Loss of K-Cl co-transporter KCC3 causes deafness, neurodegeneration and reduced seizure threshold. **EMBO Journal**, v. 22, n. 20, p. 5422–5434, 2003.
- BOLZ, H. et al. Mutation of CDH23, encoding a new member of the cadherin gene family, causes Usher syndrome type 1D. **Nature Genetics**, v. 27, n. 1, p. 108–112, 2001.
- BONNET, C. et al. An innovative strategy for the molecular diagnosis of Usher syndrome identifies causal biallelic mutations in 93% of European patients. **European Journal of Human Genetics**, v. 24, n. 12, p. 1730–1738, 2016.
- BORCK, G. et al. Loss-of-Function Mutations of ILDR1 Cause Autosomal-Recessive Hearing Impairment DFNB42. **American Journal of Human Genetics**, v. 88, p. 127–137, 2011.
- BORK, J. M. et al. Usher syndrome 1D and nonsyndromic autosomal recessive deafness DFNB12 are caused by allelic mutations of the novel cadherin-like gene CDH23. **American Journal of Human Genetics**, v. 68, p. 26–37, 2001.
- BROWNSTEIN, Z. et al. Targeted genomic capture and massively parallel sequencing to identify genes for hereditary hearing loss in Middle Eastern families. **Genome biology**, v. 12, p. R89, 2011.
- BROWNSTEIN, Z. et al. Novel myosin mutations for hereditary hearing loss revealed by targeted genomic capture and massively parallel sequencing. **European**

- Journal of Human Genetics**, v. 22, p. 768–775, 2013.
- BROWNSTEIN, Z.; BHONKER, Y.; AVRAHAM, K. B. High-throughput sequencing to decipher the genetic heterogeneity of deafness. **Genome Biology**, v. 13, p. 245, 2012.
- BUNIELLO, A et al. Wbp2 is required for normal glutamatergic synapses in the cochlea and is crucial for hearing. **EMBO Molecular Medicine**, v. 8, n. 3, p. 191–207, 2016.
- CASANO, R. et al. Inherited susceptibility to aminoglycoside ototoxicity: genetic heterogeneity and clinical implications. **American Journal of Otolaryngology**, v. 20, n. 3, p. 151–156, 1999.
- CHAÏB, H. et al. A newly identified locus for Usher syndrome type I, USH1E, maps to chromosome 21q21. **Human Molecular Genetics**, v. 6, n. 1, p. 27–31, 1997.
- CHANG, X.; WANG, K. wANNOVAR: annotating genetic variants for personal genomes via the web. **Journal of Medical Genetics**, v. 49, n. 7, p. 433–436, 2012.
- CHARIZOPOULOU, N. et al. Gipc3 mutations associated with audiogenic seizures and sensorineural hearing loss in mouse and human. **Nature Communications**, v. 2, p. 201–212, 2011.
- CHEN, D.-Y. et al. A dominant variant in DMXL2 is linked to nonsyndromic hearing loss. **Genetics in Medicine**, v. 19, n. 5, p. 553–558, 2017.
- CHEN, W. et al. Mutation of COL11A2 causes autosomal recessive non-syndromic hearing loss at the DFNB53 locus. **Journal of Medical Genetics**, v. 42, n. 10, p. e61, 2005.
- CHEN, Z. et al. Isolation and characterization of a candidate gene for Norrie disease. **Nature Genetics**, v. 1, n. 3, p. 204–208, 1992.
- CHENG, J. et al. Functional Mutation of SMAC/DIABLO, Encoding a Mitochondrial Proapoptotic Protein, Causes Human Progressive Hearing Loss DFNA64. **American Journal of Human Genetics**, v. 89, p. 56–66, 2011.
- COLLIN, R. W. J. et al. Mutations of ESRRB encoding Estrogen-Related Receptor Beta cause autosomal-recessive nonsyndromic hearing impairment DFNB35. **American Journal of Human Genetics**, v. 82, p. 125–138, 2008.
- CRYNS, K. et al. A genotype-phenotype correlation for GJB2 (connexin 26) deafness. **Journal of Medical Genetics**, v. 41, p. 147–154, 2004.
- CRYNS, K.; VAN CAMP, G. Deafness genes and their diagnostic applications.

- Audiology and Neurotology**, v. 9, p. 2–22, 2004.
- DAHMANI, M. et al. EPS8L2 is a new causal gene for childhood onset autosomal recessive progressive hearing loss. **Orphanet Journal of Rare Diseases**, v. 10, p. 96, 2015.
- DAUWERSE, J. G. et al. Mutations in genes encoding subunits of RNA polymerases I and III cause Treacher Collins syndrome. **Nature Genetics**, v. 43, n. 1, p. 20–22, 2011.
- DE KOK, Y. et al. Association between X-linked mixed deafness and mutations in the POU domain gene POU3F4. **Science**, v. 267, n. 5198, p. 685–688, 1995.
- DE MORAES, V. C. S. et al. Reduction of Cellular Expression Levels Is a Common Feature of Functionally Affected Pendrin (SLC26A4) Protein Variants. **Molecular Medicine**, v. 22, n. 1, p. 41–53, 2016.
- DE OLIVEIRA, C. A. et al. Molecular genetics study of deafness in Brazil: 8-year experience. **American Journal of Medical Genetics Part A**, v. 143A, p. 1574–1579, 2007.
- DEBACKER, C.; CATALA, M.; LABASTIE, M. C. Embryonic expression of the human GATA-3 gene. **Mechanisms of Development**, v. 85, p. 183–187, 1999.
- DEL CASTILLO, F. et al. A novel deletion involving the connexin-30 gene, del(GJB6-d13s1854), found in trans with mutations in the GJB2 gene (connexin-26) in subjects with DFNB1 non-syndromic hearing impairment. **Journal of Medical Genetics**, v. 42, n. 7, p. 588–594, 2005.
- DEL CASTILLO, I. et al. A deletion involving the connexin 30 gene in nonsyndromic hearing impairment. **New England Journal of Medicine**, v. 346, n. 4, p. 243–249, 2002.
- DELMAGHANI, S. et al. Mutations in the gene encoding pejvakin, a newly identified protein of the afferent auditory pathway, cause DFNB59 auditory neuropathy. **Nature Genetics**, v. 38, n. 7, p. 770–778, 2006.
- DELMAGHANI, S. et al. Defect in the gene encoding the EAR/EPTP domain-containing protein TSPEAR causes DFNB98 profound deafness. **Human Molecular Genetics**, v. 21, n. 17, p. 3835–3844, 2012.
- DELMAGHANI, S. et al. Mutations in CDC14A, encoding a Protein phosphatase involved in hair cell ciliogenesis, cause autosomal-recessive severe to profound deafness. **American Journal of Human Genetics**, v. 98, n. 6, p. 1266–1270, 2016.

- DEPRISTO, M. A. et al. A framework for variation discovery and genotyping using next-generation DNA sequencing data. **Nature Genetics**, v. 43, n. 5, p. 491–498, 2011.
- DESMET, F. O. et al. Human Splicing Finder: An online bioinformatics tool to predict splicing signals. **Nucleic Acids Research**, v. 37, n. 9, p. 1–14, 2009.
- DIAZ-HORTA, O. et al. FAM65B is a membrane-associated protein of hair cell stereocilia required for hearing. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 111, n. 27, p. 9864–9868, 2014.
- DIAZ-HORTA, O. et al. ROR1 is essential for proper innervation of auditory hair cells and hearing in humans and mice. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 113, n. 21, p. 1–6, 2016.
- DING, J.; PONCE-CORIA, J.; DELPIRE, E. A trafficking-deficient mutant of KCC3 reveals dominant-negative effects on K-Cl cotransport function. **PLoS ONE**, v. 8, n. 4, p. e61112, 2013.
- DIXON, J. et al. Positional cloning of a gene involved in the pathogenesis of Treacher Collins syndrome. **Nature Genetics**, v. 12, n. 2, p. 130–136, 1996.
- DONAUDY, F. et al. Nonmuscle myosin heavy-chain gene MYH14 is expressed in cochlea and mutated in patients affected by autosomal dominant hearing impairment (DFNA4). **American Journal of Human Genetics**, v. 74, n. 4, p. 770–776, 2004.
- DÖNERAY, H. et al. The First Turkish Case of Hypoparathyroidism, Deafness and Renal Dysplasia (HDR) Syndrome. **Journal of Clinical Research in Pediatric Endocrinology**, v. 7, n. 2, p. 140–143, 2015.
- 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.
- DROR, A. A; AVRAHAM, K. B. Hearing impairment: a panoply of genes and functions. **Neuron**, v. 68, n. 2, p. 293–308, 2010.
- DU, X. et al. A catechol-O-methyltransferase that is essential for auditory function in mice and humans. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 105, n. 38, p. 14609–14614, 2008.
- DULON, D. et al. Otoferlin is critical for a highly sensitive and linear calcium-dependent exocytosis at vestibular hair cell ribbon synapses. **Journal of Neuroscience**, v. 29, n. 34, p. 10474–10487, 2009.
- DVD. **Deafness Variation Database.** Disponível em:

- <<http://deafnessvariationdatabase.org/>>. Acesso em: 20 jun. 2017.
- EBERMANN, I. et al. A novel gene for Usher syndrome type 2: mutations in the long isoform of whirlin are associated with retinitis pigmentosa and sensorineural hearing loss. **Human Genetics**, v. 121, p. 203–211, 2007.
- EBERMANN, I. et al. PDZD7 is a modifier of retinal disease and a contributor to digenic Usher syndrome. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 120, n. 6, p. 1812–1823, 2010.
- EDERY, P. et al. Mutation of the endothelin-3 gene in the Waardenburg-Hirschsprung disease (Shah-Waardenburg syndrome). **Nature Genetics**, v. 12, n. 4, p. 442–444, 1996.
- ERNANI, F.; LEPROUST, E. **Agilent's SureSelect Target Enrichment System: Product note**. Santa Clara: Agilent Technologies, 2016.
- ESTIVILL, X. et al. Familial progressive sensorineural deafness is mainly due to the mtDNA A1555G mutation and is enhanced by treatment of aminoglycosides. **American Journal of Human Genetics**, v. 26, p. 27–35, 1998.
- EUDY, J. et al. Mutation of a gene encoding a protein with extracellular matrix motifs in Usher syndrome type IIa. **Science**, v. 280, n. 5370, p. 1753–1757, 1998.
- EVERETT, L. et al. Pendred syndrome is caused by mutations in a putative sulphate transporter gene (PDS). **Nature Genetics**, v. 17, n. 4, p. 411–422, 1997.
- EVS. **Exome Variant Server**. Disponível em: <<http://evs.gs.washington.edu/EVS/>>. Acesso em: 26 jun. 2017.
- FARINA, B.; FATTORUSSO, R.; PELLECCIA, M. Targeting zinc finger domains with small molecules: solution structure and binding studies of the RanBP2-type zinc finger of RBM5. **ChemBioChem**, v. 12, n. 18, p. 2837–2845, 2011.
- FELDMANN, D. et al. A new large deletion in the DFNB1 locus causes nonsyndromic hearing loss. **European Journal of Medical Genetics**, v. 52, p. 195–200, 2009.
- FERACCI, M. et al. Structural basis of RNA recognition and dimerization by the STAR proteins T-STAR and Sam68. **Nature Communications**, v. 7, p. 10355, 2016.
- FERRARIS, S. et al. Clinical report-HDR Syndrome : A Novel “de novo” Mutation in GATA3 Gene. **American Journal of Medical Genetics Part A**, v. 149, p. 770–775, 2009.
- FISCHEL-GHODSIAN, N. et al. Mitochondrial mutation associated with nonsyndromic deafness. **American Journal of Otolaryngology**, v. 16, n. 6, p. 403–406,

- 1995.
- FORTNUM, H. M. et al. Prevalence of permanent childhood hearing impairment in the United Kingdom and implications for universal neonatal hearing screening: questionnaire based ascertainment study. **BMJ**, v. 323, n. 7312, p. 536–536, 2001.
- FRANCEY, L. J. et al. Genome-Wide SNP Genotyping identifies the Stereocilin (STRC) gene as a major contributor to pediatric bilateral sensorineural hearing impairment. **American Journal of Medical Genetics Part A**, v. 158A, p. 298–308, 2011.
- FRIEDMAN, R. A. et al. Maternally inherited nonsyndromic hearing loss. **American Journal of Medical Genetics**, v. 84, p. 369–372, 1999.
- GAMBA, G. Molecular physiology and pathophysiology of electroneutral cation-chloride cotransporters. **Physiological Reviews**, v. 85, n. 2, p. 423–493, 2005.
- GAO, J. et al. Whole Exome Sequencing Identified MCM2 as a Novel Causative Gene for Autosomal Dominant Nonsyndromic Deafness in a Chinese Family. **PLoS ONE**, v. 10, n. 7, p. 75–80, 2015.
- GASPARINI, P. et al. High carrier frequency of the 35delG deafness mutation in European populations. **European Journal of Human Genetics**, v. 8, p. 19–23, 2000.
- GERBER, S. et al. Letter to the Editor: USH1A: Chronicle of a Slow Death. **American Journal of Human Genetics**, v. 78, p. 357–359, 2006.
- GIROTTI, G. et al. Linkage study and exome sequencing identify a BDP1 mutation associated with hereditary hearing loss. **PLoS ONE**, v. 8, n. 12, p. 6–12, 2013.
- GODINHO, R.; KEOGH, I.; EAVEY, R. Perda auditiva genética. **Revista Brasileira de Otorrinolaringologia**, v. 69, n. 1, p. 100–104, 2003.
- GOODWIN, S.; MCPHERSON, J. D.; MCCOMBIE, W. R. Coming of age: ten years of next-generation sequencing technologies. **Nature Reviews Genetics**, v. 17, n. 6, p. 333–351, 2016.
- GOTO, Y.; NONAKA, I.; HORAI, S. A mutation in the tRNA(Leu)(UUR) gene associated with the MELAS subgroup of mitochondrial encephalomyopathies. **Nature**, v. 348, n. 6302, p. 651–653, 1990.
- GRATI, M. et al. A missense mutation in DCDC2 causes human recessive deafness DFNB66, likely by interfering with sensory hair cell and supporting cell cilia

- length regulation. **Human Molecular Genetics**, v. 24, n. 9, p. 2482–2491, 2015.
- GRIFA, A. et al. Mutations in GJB6 cause nonsyndromic autosomal dominant deafness at DFNA3 locus. **Nature genetics**, v. 23, n. 1, p. 16–18, 1999.
- GRIFFITHS-JONES, S. MiRBase: MicroRNA sequences and annotation. **Current Protocols in Bioinformatics**, v. 34, p. 1291–12910, 2010.
- GRILLET, N. et al. Mutations in LOXHD1, an Evolutionarily conserved stereociliary protein, disrupt hair cell function in mice and cause progressive hearing loss in humans. **American Journal of Human Genetics**, v. 85, n. 3, p. 328–337, 2009.
- GUAN, M. Molecular pathogenetic mechanism of maternally inherited deafness. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1011, p. 259–271, 2004.
- HAMILL, O. P. et al. Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches. **Pflügers Arch**, v. 391, n. 2, p. 85–100, 1981.
- HAO, H. et al. Segregation patterns of a novel mutation in the mitochondrial tRNA glutamic acid gene associated with myopathy and diabetes mellitus. **American Journal of Human Genetics**, v. 56, p. 1017–1025, 1995.
- HASEGAWA, T. et al. HDR syndrome (hypoparathyroidism, sensorineural deafness, renal dysplasia) associated with del(10)(p13). **American Journal of Medical Genetics**, v. 73, n. 4, p. 416–418, 1997.
- HERTZANO, R. et al. A Myo6 mutation destroys coordination between the myosin heads, revealing new functions of myosin VI in the stereocilia of mammalian inner ear hair cells. **PLoS Genetics**, v. 4, n. 10, p. e1000207, 2008.
- HILDEBRAND, M. S. et al. Cochlear implants for DFNA17 deafness. **Laryngoscope**, v. 116, n. 12, p. 2211–2215, 2006.
- HILGERT, N. et al. A splice-site mutation and overexpression of MYO6 cause a similar phenotype in two families with autosomal dominant hearing loss. **European Journal of Human Genetics**, v. 16, p. 593–602, 2008.
- HILGERT, N.; SMITH, R. J. H.; VAN CAMP, G. Forty-six genes causing nonsyndromic hearing impairment: which ones should be analyzed in DNA diagnostics? **Mutation Research**, v. 681, p. 189–196, 2009.
- HMANI, M. et al. A novel locus for Usher syndrome type II, USH2B, maps to chromosome 3 at p23–24.2. **European Journal of Human Genetics**, v. 7, p.

363–367, 1999.

- HOLLAND, P. M. et al. Detection of specific polymerase chain reaction product by utilizing the 5'-3' exonuclease activity of *Thermus aquaticus* DNA polymerase. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 88, p. 7276–7280, 1991.
- HOPPMAN, N. et al. Genetic testing for hearing loss in the United States should include deletion / duplication analysis for the deafness / infertility locus at. **Molecular Cytogenetics**, v. 6, n. 19, p. 3–7, 2013.
- HORN, H. F. et al. The LINC complex is essential for hearing. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 123, p. 740–750, 2013.
- HOSKINS, B. E. et al. Transcription factor SIX5 is mutated in patients with Branchio-Oto-Renal syndrome. **American Journal of Human Genetics**, v. 80, p. 800–804, 2007.
- HOTH, C. F. et al. Mutations in the paired domain of the human PAX3 gene cause Klein-Waardenburg syndrome (WS-III) as well as Waardenburg syndrome Type I (WS-I). **American Journal of Human Genetics**, v. 52, p. 455–462, 1993.
- HUEBNER, A. K. et al. Nonsense mutations in SMPX, encoding a protein responsive to physical force, result in X-chromosomal hearing loss. **American Journal of Human Genetics**, v. 88, p. 621–627, 2011.
- HUTCHIN, T. P. et al. A novel mutation in the mitochondrial tRNA Ser (UCN) gene in a family with non-syndromic sensorineural hearing impairment. **Journal of Medical Genetics**, v. 37, p. 692–694, 2000.
- ILLUMINA. **Nextera Rapid Capture Exomes (Data Sheet)** San Diego Illumina, , 2015.
- IMTIAZ, A.; KOHRMAN, D. C.; NAZ, S. A frameshift mutation in GRXCR2 causes recessively inherited hearing loss. **Human Mutation**, v. 35, n. 5, p. 618–624, 2014.
- JAKSCH, M. et al. Progressive myoclonus epilepsy and mitochondrial myopathy associated with mutations in the tRNA(Ser(UCN)) gene. **Annals of Neurology**, v. 44, n. 4, p. 635–640, 1998a.
- JAKSCH, M. et al. A systematic mutation screen of 10 nuclear and 25 mitochondrial candidate genes in 21 patients with cytochrome c oxidase (COX) deficiency shows tRNA^{Ser} (UCN) mutations in a subgroup with syndromal encephalopathy. **Journal of Medical Genetics**, v. 35, p. 895–900, 1998b.

- JAWOREK, T. J. et al. USH1K, a novel locus for type I Usher syndrome, maps to chromosome 10p11.21-q21.1. **Journal of Human Genetics**, v. 57, n. 10, p. 633–637, 2012.
- JAWOREK, T. J. et al. An Alteration in ELMOD3, an Arl2 GTPase-Activating Protein, Is Associated with Hearing Impairment in Humans. **PLoS Genetics**, v. 9, n. 9, p. e1003774, 2013.
- JENKINSON, E. M. et al. Perrault syndrome is caused by recessive mutations in CLPP, encoding a mitochondrial ATP-dependent chambered protease. **American Journal of Human Genetics**, v. 92, n. 4, p. 605–613, 2013.
- JOENSUU, T. et al. Mutations in a novel gene with transmembrane domains underlie Usher syndrome type 3. **American Journal of Human Genetics**, v. 69, p. 673–684, 2001.
- JOHNSTONE, B. et al. Stimulus-related potassium changes in the organ of Corti of guinea-pig. **Journal of Physiology**, v. 408, p. 77–92, 1989.
- JOINT COMMITTEE ON INFANT HEARING. Year 2007 Position Statement: Principles and Guidelines for Early Hearing Detection and Intervention Programs. **Pediatrics**, v. 120, n. 4, p. 898–921, 2007.
- KALAY, E. et al. Mutations in the lipoma HMGIC fusion partner-like 5 (LHFPL5) gene cause autosomal recessive nonsyndromic hearing loss. **Human Mutation**, v. 27, n. 7, p. 633–639, 2006.
- KAMEOKA, K. et al. Novel mitochondrial DNA mutation in tRNA(Lys) (8296A-G) associated with diabetes. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 245, n. 2, p. 523–527, 1998.
- KAPLAN, J. et al. A Gene for Usher syndrome type I (USH1A) maps to chromosome 14q. **Genomics**, v. 14, p. 979–987, 1992.
- KELSELL, D. et al. Connexin 26 mutations in hereditary non-syndromic sensorineural deafness. **Nature**, v. 387, n. 6628, p. 80–83, 1997.
- KENNEDY, C.; MCCANN, D. Universal neonatal hearing screening moving from evidence to practice. **Archives of disease in childhood. Fetal and neonatal edition**, v. 89, n. 5, p. F378-383, 2004.
- KHAN, S. Y. et al. Mutations of the RDX Gene Cause Nonsyndromic Hearing Loss at the DFN24 Locus. **Human Mutation**, v. 28, n. 5, p. 417–423, 2007.
- KIMBERLING, W. J. et al. Localization of Usher Syndrome Type II to Chromosome 1q. **Genomics**, v. 7, p. 245–249, 1990.

- KNIJNENBURG, J. et al. A homozygous deletion of a normal variation locus in a patient with hearing loss from non-consanguineous parents. **Journal of Medical Genetics**, v. 46, p. 412–417, 2009.
- KOCHHAR, A.; HILDEBRAND, M. S.; SMITH, R. J. H. Clinical aspects of hereditary hearing loss. **Genetics in Medicine**, v. 9, n. 7, p. 393–408, 2007.
- KUBISCH, C. et al. KCNQ4, a novel potassium channel expressed in sensory outer hair cells, is mutated in dominant deafness. **Cell**, v. 96, p. 437–446, 1999.
- KUMAR, N. M.; GILULA, N. B. The Gap Junction Communication Channel. **Cell**, v. 84, p. 381–388, 1996.
- KUMAR, S. et al. Genomewide Search and Genetic Localization of a Second Gene Associated with Autosomal Dominant Branchio-Oto-Renal Syndrome : Clinical and Genetic Implications. **American Journal of Human Genetics**, v. 66, p. 1715–1720, 2000.
- KURIMA, K. et al. Dominant and recessive deafness caused by mutations of a novel gene, TMC1, required for cochlear hair-cell function. **Nature Genetics**, v. 30, p. 277–284, 2002.
- LALANI, S. et al. SEMA3E mutation in a patient with CHARGE syndrome. **Journal of Medical Genetics**, v. 41, p. e94, 2004.
- LALWANI, A. K. et al. A new nonsyndromic X-linked sensorineural hearing impairment linked to Xp21.2. **American Journal of Human Genetics**, v. 55, p. 685–694, 1994.
- LALWANI, A. K. et al. Human nonsyndromic hereditary deafness DFNA17 is due to a mutation in nonmuscle myosin MYH9. **American Journal of Human Genetics**, v. 67, p. 1121–1128, 2000.
- LEK, M. et al. Analysis of protein-coding genetic variation in 60,706 humans. **Nature**, v. 536, n. 7616, p. 285–291, 2016.
- LEON, P. E. et al. The gene for an inherited form of deafness maps to chromosome 5q31. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 89, p. 5181–5184, 1992.
- LEVY, S. E.; MYERS, R. M. Advancements in Next-Generation Sequencing. **Annual Review of Genomics and Human Genetics**, v. 17, p. 95–115, 2016.
- LI, H. et al. The Sequence Alignment/Map format and SAMtools. **Bioinformatics**, v. 25, n. 16, p. 2078–2079, 2009.
- LI, J. et al. Whole-exome sequencing identifies a variant in TMEM132E causing

- autosomal-recessive nonsyndromic hearing loss DFNB99. **Human Mutation**, v. 36, p. 98–105, 2015.
- LI, X. et al. A mutation in PDS causes non-syndromic recessive deafness. **Nature Genetics**, v. 18, n. 3, p. 215–217, 1998.
- LI, Y. et al. Mutations in TPRN Cause a Progressive Form of Autosomal-Recessive Nonsyndromic Hearing Loss. **American Journal of Human Genetics**, v. 86, p. 479–484, 2010.
- LIU, X. et al. Autosomal dominant non-syndromic deafness caused by a mutation in the myosin VIIA gene. **Nature Genetics**, v. 17, n. 3, p. 268–269, 1997a.
- LIU, X. et al. Mutations in the myosin VIIA gene cause non-syndromic recessive deafness. **Nature Genetics**, v. 16, p. 188–190, 1997b.
- LIU, X. et al. Prestin, a cochlear motor protein, is defective in non-syndromic hearing loss. **Human Molecular Genetics**, v. 12, n. 10, p. 1155–1162, 2003.
- LIU, X. et al. Loss-of-function mutations in the PRPS1 gene cause a type of nonsyndromic X-linked sensorineural deafness, DFN2. **American Journal of Human Genetics**, v. 86, p. 65–71, 2010.
- LODISH, H. **Molecular Cell Biology**. 5th Revised ed. [s.l.] Freeman, W. H. & Company, 2003. v. 29
- LOUGHLIN, F. E. et al. The zinc fingers of the SR-like protein ZRANB2 are single-stranded RNA-binding domains that recognize 5' splice site-like sequences. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 106, n. 14, p. 5581–5586, 2009.
- LYNCH, E. D. et al. Nonsyndromic deafness DFNA1 associated with mutation of the human homolog HDIA1 of the *Drosophila* diaphanous. **Science**, v. 278, p. 1315–1318, 1997.
- MARTINS, F. T. A. et al. Optimization of simultaneous screening of the main mutations involved in non-syndromic deafness using the TaqMan OpenArray Genotyping platform. **BMC Medical Genetics**, v. 14, p. 112, 2013.
- MARTINS, F. T. A. **Otimização de rastreamento simultâneo das principais mutações envolvidas na surdez neurosensorial não-sindrômica utilizando a plataforma Taqman® Openarray™ genotyping**. [s.l.] Universidade Estadual de Campinas, 2013.
- MASUDA, A. et al. hnRNP H enhances skipping of a nonfunctional exon P3A in CHRNA1 and a mutation disrupting its binding causes congenital myasthenic

- syndrome. **Human Molecular Genetics**, v. 17, n. 24, p. 4022–4035, 2008.
- MBURU, P. et al. Defects in whirlin , a PDZ domain molecule involved in stereocilia elongation, cause deafness in the whirler mouse and families with DFNB31. **Nature Genetics**, v. 34, n. 4, p. 421–428, 2003.
- MCGUIRT, W. T. et al. Mutations in COL11A2 cause non-syndromic hearing loss (DFNA13). **Nature Genetics**, v. 23, p. 413–419, 1999.
- MEDEIROS, E. B. **Introdução à teoria acústicaUFMG**, 2002.
- MELCHIONDA, S. et al. MYO6, the human homologue of the gene responsible for deafness in Snell's Waltzer mice, is mutated in autosomal dominant nonsyndromic hearing loss. **American Journal of Human Genetics**, v. 69, p. 635–640, 2001.
- MENCÍA, A. et al. Mutations in the seed region of human miR-96 are responsible for nonsyndromic progressive hearing loss. **Nature Genetics**, v. 41, n. 5, p. 609–613, 2009.
- MOCHIZUKI, T. et al. Identification of mutations in the alpha 3(IV) and alpha 4(IV) collagen genes in autosomal recessive Alport syndrome. **Nature Genetics**, v. 8, n. 1, p. 77–81, 1994.
- MODAMIO-HØYBJØR, S. et al. A mutation in CCDC50, a gene encoding an effector of epidermal growth factor – mediated cell signaling, causes progressive hearing loss. **American Journal of Human Genetics**, v. 80, p. 1076–1089, 2007.
- MOHIDDIN, S. A et al. Novel association of hypertrophic cardiomyopathy, sensorineural deafness, and a mutation in unconventional myosin VI (MYO6). **Journal of Medical Genetics**, v. 41, p. 309–314, 2004.
- MORELL, R. et al. Mutations in the connexin 26 gene (GJB2) among Ashkenazi Jews with nonsyndromic recessive deafness. **The New England Journal of Medicine**, v. 339, n. 21, p. 1500–1505, 1998.
- MORTON, N. Genetic Epidemiology of Hearing Impairment. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 630, p. 16–31, 1991.
- MOSRATI, M. A. et al. A novel dominant mutation in SIX1, affecting a highly conserved residue, result in only auditory defects in humans. **European Journal of Medical Genetics**, v. 54, p. e484–e488, 2011.
- MUJTABA, G. et al. A mutation of MET, encoding hepatocyte growth factor receptor, is associated with human DFNB97 hearing loss. **Journal of Medical**

- Genetics**, v. 52, n. 8, p. 548–552, 2015.
- MUKHERJEA, M. et al. Myosin VI dimerization triggers an unfolding of a three-helix bundle in order to extend its reach. **Molecular Cell**, v. 35, p. 305–315, 2009.
- MÜLLER, U. Cadherins and Mechanotransduction by Hair Cells. **Current Opinion in Cell Biology**, v. 20, n. 5, p. 557–566, 2008.
- MUROYA, K. et al. GATA3 abnormalities and the phenotypic spectrum of HDR syndrome. **Journal of Medical Genetics**, v. 38, p. 374–380, 2001.
- MUSTAPHA, M. et al. An alpha-tectorin gene defect causes a newly identified autosomal recessive form of sensorineural pre-lingual non-syndromic deafness, DFNB21. **Human Molecular Genetics**, v. 8, n. 3, p. 409–412, 1999.
- MUSTAPHA, M. et al. A novel locus for Usher syndrome type I, USH1G, maps to chromosome 17q24–25. **Human genetics**, v. 110, p. 348–350, 2002.
- NAARDEN, K. VAN; DECOUFLE, P.; CALDWELL, K. Prevalence and characteristics of children with serious hearing impairment in metropolitan atlanta, 1991–1993. **Pediatrics**, v. 103, n. 3, p. 1991–1993, 1999.
- NANCE, W. E. The genetics of deafness. **Mental Retardation and Developmental Disabilities Research Reviews**, v. 9, p. 109–119, 2003.
- NANCE, W. E.; LIM, B. G.; DODSON, K. M. Importance of congenital cytomegalovirus infections as a cause for pre-lingual hearing loss. **Journal of Clinical Virology**, v. 35, p. 221–225, 2006.
- NASLAVSKY, M. S. et al. Exomic variants of an elderly cohort of Brazilians in the ABraOM database. **Human Mutation**, v. 38, n. 7, p. 751–763, 2017.
- NAZ, S. et al. Mutations in a novel gene, TMIE, are associated with hearing loss linked to the DFNB6 locus. **American Journal of Human Genetics**, v. 71, p. 632–636, 2002.
- NAZ, S. et al. Mutations of ESPN cause autosomal recessive deafness and vestibular dysfunction. **Journal of Medical Genetics**, v. 41, p. 591–595, 2004.
- NESBIT, M. A. et al. Characterization of GATA3 mutations in the hypoparathyroidism, deafness, and renal dysplasia (HDR) syndrome. **Journal of Biological Chemistry**, v. 279, n. 21, p. 22624–22634, 2004.
- NEYROUD, N. et al. A novel mutation in the potassium channel gene KVLQT1 causes the Jervell and Lange-Nielsen cardioauditory syndrome. **Nature Genetics**, v. 15, n. 2, p. 186–189, 1997.
- NYEGAARD, M. et al. A Novel Locus Harboring a Functional CD164 Nonsense

- Mutation Identified in a Large Danish Family with Nonsyndromic Hearing Impairment. **PLoS Genetics**, v. 11, n. 7, p. 1–25, 2015.
- OHTA, M. et al. Novel dominant-negative mutant of GATA3 in HDR syndrome. **Journal of Molecular Medicine**, v. 89, n. 1, p. 43–50, 2011.
- OMICHIANSKI, J. G. et al. A small single-“finger” peptide from the erythroid transcription factor GATA-1 binds specifically to DNA as a zinc or iron complex. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 90, n. 5, p. 1676–1680, 1993.
- OONK, A. M. M. et al. Progressive hereditary hearing impairment caused by a MYO6 mutation resembles presbycusis. **Hearing Research**, v. 299, p. 88–98, 2013.
- OUYANG, X. et al. Mutations in the alternatively spliced exons of USH1C cause non-syndromic recessive deafness. **Human Genetics**, v. 111, p. 26–30, 2002.
- PATTERSON, B. et al. Cold-sensitive mutants G680V and G691C of Dictyostelium myosin II confer dramatically different biochemical defects. **Journal of Biological Chemistry**, v. 272, n. 44, p. 27612–27617, 1997.
- PETERS, L. et al. Mutation of a transcription factor, TFCP2L3, causes progressive autosomal dominant hearing loss, DFNA28. **Human Molecular Genetics**, v. 11, n. 23, p. 2877–2885, 2002.
- PETIT, C. Genes responsible for human hereditary deafness: symphony of a thousand. **Nature Genetics**, v. 14, n. 3, p. 353–356, 1996.
- PETTY, R.; HARDING, A.; MORGAN-HUGHES, J. The clinical features of mitochondrial myopathy. **Brain**, v. 109, n. 5, p. 915–938, 1986.
- PFISTER, M. H. F. et al. A second family with nonsyndromic sensorineural hearing loss linked to Xp21.2: refinement of the DFN4 locus within DMD. **Genomics**, v. 382, p. 377–382, 1998.
- PIEKE-DAHL, S. et al. Genetic heterogeneity of Usher syndrome type II: localisation to chromosome 5q. **Journal of Medical Genetics**, v. 37, p. 256–262, 2000.
- PIERCE, S. B. et al. Mutations in the DBP-Deficiency protein HSD17B4 cause ovarian dysgenesis, hearing loss, and ataxia of Perrault syndrome HSD17B4. **American Journal of Human Genetics**, v. 87, p. 282–288, 2010.
- PIERCE, S. B. et al. Mutations in mitochondrial histidyl tRNA synthetase HARS2 cause ovarian dysgenesis and sensorineural hearing loss of Perrault syndrome. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 108, n. 16, p. 6543–6548, 2011.

- PIERCE, S. B. et al. Mutations in LARS2, encoding mitochondrial Leucyl-tRNA synthetase, lead to premature ovarian failure and hearing loss in Perrault syndrome. **American Journal of Human Genetics**, v. 92, p. 614–620, 2013.
- PINGAULT, V. et al. SOX10 mutations in patients with Waardenburg-Hirschsprung disease. **Nature Genetics**, v. 18, n. 2, p. 171–173, 1998.
- PIVA, F. et al. SpliceAid 2: A database of human splicing factors expression data and RNA target motifs. **Human Mutation**, v. 33, p. 81–85, 2012.
- PREZANT, T. et al. Mitochondrial ribosomal RNA mutation associated with both antibiotic-induced and non-syndromic deafness. **Nature Genetics**, v. 4, n. 3, p. 289–294, 1993.
- PUFFENBERGER, E. G. et al. Genetic Mapping and Exome Sequencing Identify Variants Associated with Five Novel Diseases. **PLoS ONE**, v. 7, n. 1, p. e28936, 2012.
- 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.
- 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.
- REESE, M. et al. Improved Splice Site Detection in Genie. **Journal of Computational Biology**, v. 4, n. 3, p. 311–323, 1997.
- REHMAN, A. et al. Mutations of GIPC3 cause nonsyndromic hearing loss DFNB72 but not DFNB81 that also maps to chromosome 19p. **Human Genetics**, v. 130, n. 6, p. 759–765, 2011.
- REHMAN, A. U. et al. Targeted Capture and Next-Generation Sequencing identifies C9orf75, encoding Taperin, as the mutated gene in nonsyndromic deafness DFNB79. **American Journal of Human Genetics**, v. 86, n. 3, p. 378–388, 2010.
- REHMAN, A. U. et al. Mutations in TBC1D24, a gene associated with epilepsy, also cause nonsyndromic deafness DFNB86. **American Journal of Human Genetics**, v. 94, p. 144–152, 2014.
- REID, F. M.; VERNHAM, G. A.; JACOBS, H. T. A novel mitochondrial point mutation in a maternal pedigree with sensorineural deafness. **Human Mutation**, v. 3, p. 243–247, 1994.

- RIAZUDDIN, S. et al. Mutations in TRIOBP, which encodes a putative cytoskeletal-organizing protein, are associated with nonsyndromic recessive deafness. **American Journal of Human Genetics**, v. 78, p. 137–143, 2006a.
- RIAZUDDIN, S. et al. Tricellulin Is a Tight-Junction Protein Necessary for Hearing. **American Journal of Human Genetics**, v. 79, p. 1040–1051, 2006b.
- RIAZUDDIN, S. et al. Molecular Basis of DFNB73: mutations of BSND can cause nonsyndromic deafness or Bartter syndrome. **American Journal of Human Genetics**, v. 85, p. 273–280, 2009.
- RIAZUDDIN, S. et al. Alterations of the CIB2 calcium- and integrin-binding protein cause Usher syndrome type 1J and nonsyndromic deafness DFNB48. **Nature Genetics**, v. 44, n. 11, p. 1265–1271, 2012.
- RICHARDS, A. et al. A family with Stickler syndrome type 2 has a mutation in the COL11A1 gene resulting in the substitution of glycine 97 by valine in alpha 1 (XI) collagen. **Human Molecular Genetics**, v. 5, n. 9, p. 1339–1343, 1996.
- 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.
- RIVERA, C. et al. The K⁺/Cl⁻ co-transporter KCC2 renders GABA hyperpolarizing during neuronal maturation. **Nature**, v. 397, p. 251–255, 1999.
- ROBERTSON, N. G. et al. Mutations in a novel cochlear gene cause DFNA9, a human nonsyndromic deafness with vestibular dysfunction. **Nature Genetics**, v. 20, p. 299–303, 1998.
- ROCK, R. S. et al. Myosin VI is a processive motor with a large step size. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 98, n. 24, p. 13655–13659, 2001.
- ROOKE, N. et al. Roles for SR proteins and hnRNP A1 in the regulation of c-src exon N1. **Molecular and Cellular Biology**, v. 23, p. 1874–1884, 2003.
- ROST, S. et al. Novel form of X-linked nonsyndromic hearing loss with cochlear malformation caused by a mutation in the type IV collagen gene COL4A6. **European Journal of Human Genetics**, v. 22, p. 208–215, 2014.
- ROUX, I. et al. Otoferlin, defective in a human deafness form, is essential for exocytosis at the auditory ribbon synapse. **Cell**, v. 127, n. 2, p. 277–289, 2006.
- RUEL, J. et al. Impairment of SLC17A8 encoding vesicular glutamate transporter-3, VGLUT3, underlies nonsyndromic deafness DFNA25 and inner hair cell dysfunction in null mice. **American Journal of Human Genetics**, v. 83, p.

- 278–292, 2008.
- RUF, R. et al. A gene locus for branchio-otic syndrome maps to chromosome 14q21.3-q24.3. **Journal of Medical Genetics**, v. 40, n. 7, p. 515–519, 2003.
- RUF, R. G. et al. SIX1 mutations cause branchio-oto-renal syndrome by disruption of EYA1 – SIX1 – DNA complexes. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 101, n. 21, p. 8090–8095, 2004.
- RUSKIN, B.; ZAMORE, P. D.; GREEN, M. R. A factor, U2AF, is required for U2 snRNP binding and splicing complex assembly. **Cell**, v. 52, n. 2, p. 207–219, 1988.
- RUSSO, L. C. P. Overview of Audiology in Brazil: State of the Art: La Audiologia en Brasil: Estado del Arte. **International Journal of Audiology**, v. 39, p. 202–206, 2000.
- SALIN-CANTEGREL, A. et al. Transit defect of potassium-chloride co-transporter 3 is a major pathogenic mechanism in hereditary motor and sensory neuropathy with agenesis of the corpus callosum. **Journal of Biological Chemistry**, v. 286, p. 28456–28465, 2011.
- SANCHEZ-MARTIN, M. et al. SLUG (SNAI2) deletions in patients with Waardenburg disease. **Human Molecular Genetics**, v. 11, n. 25, p. 3231–3236, 2002.
- SANGER, F.; NICKLEN, S.; COULSON, A. R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 74, n. 12, p. 5463–5467, 1977.
- SANGGAARD, K. M. et al. A novel nonsense mutation in MYO6 is associated with progressive nonsyndromic hearing loss in a Danish DFNA22 family. **American Journal of Medical Genetics Part A**, v. 146, p. 1017–1025, 2008.
- SANKILA, E. et al. Assignment of an Usher syndrome type III (USH3) gene to chromosome 3q. **Human Molecular Genetics**, v. 4, n. 1, p. 93–98, 1995.
- SANTORELLI, F. M. et al. Maternally inherited cardiomyopathy and hearing loss associated with a novel mutation in the mitochondrial tRNA(Lys) gene (G8363A). **American Journal of Human Genetics**, v. 58, p. 933–939, 1996.
- SANTOS-CORTEZ, R. L. P. et al. Mutations in KARS, encoding Lysyl-tRNA synthetase, cause autosomal-recessive nonsyndromic hearing impairment DFNB89. **American Journal of Human Genetics**, v. 93, p. 132–140, 2013.
- SANTOS-CORTEZ, R. L. P. et al. Adenylate cyclase 1 (ADCY1) mutations cause recessive hearing impairment in humans and defects in hair cell function and hearing in zebrafish. **Human Molecular Genetics**, v. 23, n. 12, p. 3289–3298,

2014.

- SANTOS-CORTEZ, R. L. P. et al. Autosomal-Recessive hearing impairment due to rare missense variants within S1PR2. **American Journal of Human Genetics**, v. 98, p. 331–338, 2016.
- SCHAUB, M. C.; LOPEZ, S. R.; CAPUTI, M. Members of the heterogeneous nuclear ribonucleoprotein H family activate splicing of an HIV-1 splicing substrate by promoting formation of ATP-dependent spliceosomal complexes. **Journal of Biological Chemistry**, v. 282, n. 18, p. 13617–13626, 2007.
- SCHINDELIN, J. et al. Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. **Nature Methods**, v. 9, p. 676–682, 2012.
- SCHRADERS, M. et al. Homozygosity mapping reveals mutations of GRXCR1 as a cause of autosomal-recessive nonsyndromic hearing impairment. **American Journal of Human Genetics**, v. 86, p. 138–147, 2010a.
- SCHRADERS, M. et al. Mutations in PTPRQ are a cause of autosomal-recessive nonsyndromic hearing impairment DFNB84 and associated with vestibular dysfunction. **American Journal of Human Genetics**, v. 86, p. 604–610, 2010b.
- SCHRADERS, M. et al. Next-generation sequencing identifies mutations of SMPX, which encodes the small muscle protein, X-linked, as a cause of progressive hearing impairment. **American Journal of Human Genetics**, v. 88, p. 628–634, 2011.
- SCHRADERS, M. et al. Mutations of the gene encoding otogelin are a cause of autosomal-recessive nonsyndromic moderate hearing impairment. **American Journal of Human Genetics**, v. 91, p. 883–889, 2012.
- SCHRAUWEN, I. et al. A mutation in CABP2, expressed in cochlear hair cells, causes autosomal-recessive hearing impairment. **American Journal of Human Genetics**, v. 91, n. 4, p. 636–645, 2012.
- SCHULTZ, J. M. et al. Noncoding mutations of HGF are associated with nonsyndromic hearing loss, DFNB39. **American Journal of Human Genetics** 85, v. 85, p. 25–39, 2009.
- SCHULZE-BAHR, E. et al. KCNE1 mutations cause jervell and Lange-Nielsen syndrome. **Nature Genetics**, v. 17, n. 3, p. 267–268, 1997.
- SCHWANDER, M.; KACHAR, B.; MÜLLER, U. The cell biology of hearing. **The Journal of Cell Biology**, v. 190, p. 9–20, 2010.

- SCHWARTZ, S.; HALL, E.; AST, G. SROOGLE: Webserver for integrative, user-friendly visualization of splicing signals. **Nucleic Acids Research**, v. 37, p. 189–192, 2009.
- SCOTT, D.; KARNISKI, L. Human pendrin expressed in *Xenopus laevis* oocytes mediates chloride/formate exchange. **American Journal of Physiology - Cell Physiology**, v. 278, p. 207–211, 2000.
- SCOTT, H. S. et al. Insertion of β -satellite repeats identifies a transmembrane protease causing both congenital and childhood onset autosomal recessive deafness. **Nature Genetics**, v. 27, p. 59–63, 2001.
- SECO, C. Z. et al. Progressive hearing loss and vestibular dysfunction caused by a homozygous nonsense mutation in CLIC5. **European Journal of Human Genetics**, v. 23, p. 189–194, 2015.
- SELICORNI, A. et al. Cytogenetic mapping of a novel locus for type II Waardenburg syndrome. **Human Genetics**, v. 110, p. 64–67, 2002.
- SHABBIR, M. et al. Mutations of human TMHS cause recessively inherited non-syndromic hearing loss. **Journal of Medical Genetics**, v. 43, p. 634–640, 2006.
- SHAHIN, H. et al. Mutations in a novel isoform of TRIOBP that encodes a filamentous-actin binding protein are responsible for DFNB28 recessive nonsyndromic hearing loss. **American Journal of Human Genetics**, v. 78, p. 144–152, 2006.
- SHEARER, A. E. et al. Comprehensive genetic testing for hereditary hearing loss using massively parallel sequencing. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 107, n. 49, p. 21104–21109, 2010.
- SHEARER, A. E.; SMITH, R. J. H. Genetics: advances in genetic testing for deafness. **Current Opinion in Pediatrics**, v. 24, n. 6, p. 679–686, 2012.
- SHEARER, A. E.; SMITH, R. J. H. Massively Parallel Sequencing for genetic diagnosis of hearing loss: The new standard of care. **Otolaryngology-Head and Neck Surgery**, v. 153, n. 2, p. 175–182, 2015.
- SHOFFNER, J. M. et al. Myoclonic Epilepsy and Ragged-Red Fiber Disease (MERRF) Is Associated with a Mitochondrial DNA tRNALys Mutation. **Cell**, v. 61, p. 931–937, 1990.
- SILMAN, S.; SILVERMAN, C. **Auditory diagnosis: principles and applications**. 1st. ed. [s.l.] Cengage Learning, 1997.

- SILVA-COSTA, S. et al. Genetic Diagnosis of Deafness. In: DOSSENA, S.; PAULMICHL, M. (Eds.). . **The role of Pendrin in health and disease - Molecular and functional aspects of the SLC26A4 anion exchanger**. 1st. ed. Cham: [s.n.]. p. 61–81.
- SIMÕES, A. M.; MACIEL-GUERRA, A. T. A surdez evitável: predominância de fatores ambientais na etiologia da surdez neurosensorial profunda. **Jornal de Pediatria**, v. 68, p. 254–257, 1992.
- SIMON, M. et al. Mutations of human NARS2, encoding the mitochondrial Asparaginyl-tRNA Synthetase, cause nonsyndromic deafness and Leigh syndrome. **PLoS Genetics**, v. 11, p. 1–26, 2015.
- SIMONS, M. et al. Human nonmuscle myosin heavy chains are encoded by two genes located on different chromosomes. **Circulation Research**, v. 69, p. 530–539, 1991.
- SIMS, D. et al. Sequencing depth and coverage: key considerations in genomic analyses. **Nature Reviews Genetics**, v. 15, p. 121–132, 2014.
- SIRMACI, A. et al. A truncating mutation in SERPINB6 is associated with autosomal-recessive nonsyndromic sensorineural hearing loss. **American Journal of Human Genetics**, v. 86, p. 797–804, 2010.
- SMITH, R. J. H. et al. Localization of Two Genes for Usher Syndrome Type I to Chromosome 11. **Genomics**, v. 1002, p. 995–1002, 1992.
- SMITH, R. J. H.; JR, J. F. B.; WHITE, K. R. Sensorineural hearing loss in children. **The Lancet**, v. 365, p. 879–890, 2005.
- SNPD. **Cartila do Censo 2010 - Pessoas com Deficiências**. Brasília. Secretaria Nacional de Promoção dos Direitos da Pessoa com Deficiência Luiza, , 2012.
- SPINK, B. J. et al. Long single α -helical tail domains bridge the gap between structure and function of myosin VI. **Nature Structural & Molecular Biology**, v. 15, p. 591–597, 2008.
- STENSON, P. D. et al. The human gene mutation database (HGMD) and its exploitation in the fields of personalized genomics and molecular evolution. **Current Protocols in Bioinformatics**, v. 39, p. 1–20, 2012.
- STENSON, P. D. et al. The Human Gene Mutation Database: towards a comprehensive repository of inherited mutation data for medical research, genetic diagnosis and next-generation sequencing studies. **Human Genetics**, v. 136, p. 665–677, 2017.

- SUDMANT, P. H. et al. An integrated map of structural variation in 2,504 human genomes. **Nature**, v. 526, p. 75–81, 2015.
- SUE, C. et al. Maternally inherited hearing loss in a large kindred with a novel T7511C mutation in the mitochondrial DNA tRNA Ser (UCN) gene. **Neurology**, v. 52, n. 9, p. 7511, 1999.
- SUN, Y. et al. Germinal mosaicism of GATA3 in a family with HDR syndrome. **American Journal of Medical Genetics Part A**, v. 149, n. 4, p. 776–778, 2009.
- SUZUKI, Y. et al. Modulation of actin filament sliding by mutations of the SH2 Cysteine in Dictyostelium Myosin II. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 234, p. 701–706, 1997.
- SVIDNICKI, M. C. C. M. et al. Screening of genetic alterations related to non-syndromic hearing loss using MassARRAY iPLEX® technology. **BMC Medical Genetics**, v. 16, p. 85, 2015.
- SYAMALADEVI, D. P.; SPUDICH, J. A.; SOWDHAMINI, R. Structural and functional insights on the myosin superfamily. **Bioinformatics and Biology Insights**, v. 6, p. 11–21, 2012.
- TASSABEHJI, M. et al. Waardenburg's syndrome patients have mutations in the human homologue of the Pax-3 paired box gene. **Nature**, v. 355, p. 635–636, 1992.
- TASSABEHJI, M.; NEWTON, V.; READ, A. Waardenburg syndrome type 2 caused by mutations in the human microphthalmia (MITF) gene. **Nature Genetics**, v. 8, p. 251–255, 1994.
- TAYLOR, J. P. et al. Mutations of the PDS gene, encoding Pendrin, are associated with protein mislocalization and loss of iodide efflux: Implications for thyroid dysfunction in Pendred Syndrome. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 87, n. 4, p. 1778–1784, 2002.
- THOENES, M. et al. OSBPL2 encodes a protein of inner and outer hair cell stereocilia and is mutated in autosomal dominant hearing loss (DFNA67). **Orphanet Journal of Rare Diseases**, v. 10, p. 15, 2015.
- TIRANTI, V. et al. Maternally inherited hearing loss , ataxia and myoclonus associated with a novel point mutation in mitochondrial tRNASer (UCN) gene . **Human Molecular Genetics**, v. 4, n. 8, p. 1421–1427, 1995.
- TLILI, A. et al. A novel autosomal recessive non-syndromic deafness locus, DFNB66,

- maps to chromosome 6p21.2-22.3 in a large Tunisian consanguineous family. **Human Heredity**, v. 60, p. 123–128, 2005.
- 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.
- TORIELLO, H.; SMITH, S. **Hereditary hearing loss and its syndromes**. 2nd ed. ed. New York: Oxford University Press, 2004.
- TYSON, J. et al. Isk and KvLQT1 : mutation in either of the two subunits of the slow component of the delayed rectifier potassium channel can cause Jervell and Lange-Nielsen syndrome. **Human Molecular Genetics**, v. 6, n. 12, p. 2179–2185, 1997.
- UNTERGASSER, A. et al. Primer3 - new capabilities and interfaces. **Nucleic Acids Research**, v. 40, n. 15, p. e115, 2012.
- USAMI, S. et al. Genetic and clinical features of sensorineural hearing loss associated with the 1555 mitochondrial mutation. **Laryngoscope**, v. 107, p. 483–490, 1997.
- USHAKOV, K.; RUDNICKI, A.; AVRAHAM, K. B. MicroRNAs in sensorineural diseases of the ear. **Frontiers in Molecular Neuroscience**, v. 6, p. 52, 2013.
- VAHAVA, O. et al. Mutation in Transcription Factor POU4F3 Associated with Inherited Progressive Hearing Loss in Humans. **Science**, v. 279, n. 5358, p. 1950–1954, 1998.
- VAN BEELEN, E. et al. Audiometric characteristics of a dutch family with a new mutation in GATA3 causing HDR syndrome. **Audiology and Neurotology**, v. 19, n. 2, p. 106–114, 2014.
- VAN CAMP, G. et al. A new autosomal recessive form of Stickler syndrome is caused by a mutation in the COL9A1 gene. **American Journal of Human Genetics**, v. 79, p. 449–457, 2006.
- VAN CAMP, G.; SMITH, R. J. H. **Hereditary Hearing Loss Homepage**. Disponível em: <<http://hereditaryhearingloss.org>>. Acesso em: 29 jun. 2017.
- VAN DEN OUWELAND, J. et al. Mutation in mitochondrial tRNA(Leu)(UUR) gene in a large pedigree with maternally transmitted type II diabetes mellitus and deafness. **Nature Genetics**, v. 1, n. 5, p. 368–371, 1992.
- VAN DER AUWERA, G. A. et al. From fastQ data to high-confidence variant calls: The genome analysis toolkit best practices pipeline. **Current Protocols in**

- Bioinformatics**, v. 43, p. 1–33, 2013.
- VAN ESCH, H. et al. GATA3 haplo-insufficiency causes human HDR syndrome. **Nature**, v. 406, n. 6794, p. 419–422, 2000.
- VAN EYKEN, E.; VAN CAMP, G.; VAN LAER, L. The complexity of age-related hearing impairment: contributing environmental. **Audiology and Neurotology**, v. 12, p. 345–358, 2007.
- VAN LAER, L. et al. Nonsyndromic hearing impairment is associated with a mutation in DFNA5. **Nature Genetics**, v. 20, p. 194–197, 1998.
- VAN LAER, L. et al. Nonsyndromic hearing loss. **Ear and Hearing**, v. 24, n. 4, p. 275–288, 2003.
- VAN WIJK, E. et al. A mutation in the gamma actin 1 (ACTG1) gene causes autosomal dominant hearing loss (DFNA20/26). **Journal of Medical Genetics**, v. 40, p. 879–884, 2003.
- VERHOEVEN, K. et al. Mutations in the human alpha-tectorin gene cause autosomal dominant non-syndromic hearing impairment. **Nature Genetics**, v. 19, p. 60–62, 1998.
- VERHOEVEN, K. et al. Hearing impairment and neurological dysfunction associated with a mutation in the mitochondrial tRNA Ser (UCN) gene. **European Journal of Human Genetics**, v. 7, p. 45–51, 1999.
- VERPY, E. et al. A defect in harmonin, a PDZ domain-containing protein expressed in the inner ear sensory hair cells, underlies Usher syndrome type 1C. **Nature Genetics**, v. 26, p. 51–55, 2000.
- VERPY, E. et al. Mutations in a new gene encoding a protein of the hair bundle cause non-syndromic deafness at the DFNB16 locus. **Nature Genetics**, v. 29, p. 345–349, 2001.
- VERPY, E. et al. Stereocilin-deficient mice reveal the origin of cochlear waveform distortions. **Nature**, v. 456, p. 255–259, 2008.
- VIKKULA, M. et al. Autosomal dominant and recessive osteochondrodysplasias associated with the COL11A2 locus. **Cell**, v. 80, p. 431–437, 1995.
- VISSERS, L. et al. Mutations in a new member of the chromodomain gene family cause CHARGE syndrome. **Nature Genetics**, v. 36, p. 955–957, 2004.
- VOLK, A. E. et al. A novel MYO6 splice site mutation causes autosomal dominant sensorineural hearing loss type DFNA22 with a favourable outcome after cochlear implantation. **Audiology and Neurotology**, v. 18, p. 192–199, 2013.

- VON AMELN, S. et al. A mutation in PNPT1, encoding mitochondrial-RNA-import protein PNPase, causes hereditary hearing loss. **American Journal of Human Genetics**, v. 91, n. 5, p. 919–27, 2012.
- WALLACE, D. C. Diseases of the mitochondrial DNA. **Annual Review of Biochemistry**, v. 61, p. 1175–1212, 1992.
- WALSH, T. et al. From flies' eyes to our ears: mutations in a human class III myosin cause progressive nonsyndromic hearing loss DFNB30. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 99, p. 7518–7523, 2002.
- WALSH, T. et al. Genomic duplication and overexpression of TJP2/ZO-2 leads to altered expression of apoptosis genes in progressive nonsyndromic hearing loss DFNA51. **American Journal of Human Genetics**, v. 87, p. 101–109, 2010a.
- WALSH, T. et al. Whole exome sequencing and homozygosity mapping identify mutation in the cell polarity protein GPSM2 as the cause of nonsyndromic hearing loss DFNB82. **American Journal of Human Genetics**, v. 87, p. 90–94, 2010b.
- WANG, A. et al. Association of unconventional myosin MYO15 mutations with human nonsyndromic deafness DFNB3. **Science**, v. 280, n. 5368, p. 2–3, 1998.
- WANG, H. et al. Exome sequencing identifies a novel CEACAM16 mutation associated with autosomal dominant nonsyndromic hearing loss DFNA4B in a Chinese family. **Journal of Human Genetics**, v. 60, n. 3, p. 119–126, 2015.
- WARYAH, A. M. et al. DFNB74, a novel autosomal recessive nonsyndromic hearing impairment locus on chromosome 12q14.2-q15. **Clinical Genetics**, v. 76, p. 270–275, 2009.
- WAYNE, S. et al. Localization of the Usher Syndrome Type ID Gene (Ush1D) to Chromosome 10. **Human Molecular Genetics**, v. 5, n. 10, p. 1689–1692, 1996.
- WAYNE, S. et al. Mutations in the transcriptional activator late-onset deafness at the DFNA10 locus. **Human Molecular Genetics**, v. 10, n. 3, p. 195–200, 2001.
- WEI, C. C.; LALWANI, A. K.; MHATRE, A. N. In vitro expression and characterization of MYH9 mutant alleles linked to hereditary hearing loss. **Otolaryngology - Head and Neck Surgery**, v. 142, n. 5, p. 699–703, 2010.
- WEIL, D. et al. The autosomal recessive isolated deafness, DFNB2, and the Usher 1B syndrome are allelic defects of the myosin-VIIA gene. **Nature Genetics**, v. 16,

- n. 2, p. 191–193, 1997.
- WEIL, D. et al. Usher syndrome type I G (USH1G) is caused by mutations in the gene encoding SANS, a protein that associates with the USH1C protein, harmonin. **Human Molecular Genetics**, v. 12, n. 5, p. 463–471, 2003.
- WEISS, S. et al. The DFNA15 Deafness Mutation Affects POU4F3 Protein Stability, Localization, and Transcriptional Activity. **Molecular and Cellular Biology**, v. 23, n. 22, p. 7957–7964, 2003.
- WELL, D. et al. Defective myosin VIIA gene responsible for Usher syndrome type IB. **Nature**, v. 374, n. 6517, p. 60–61, 1995.
- WELLS, A L. et al. Myosin VI is an actin-based motor that moves backwards. **Nature**, v. 401, n. 6752, p. 505–508, 1999.
- WESTON, M. D. et al. Mutations in the VLGR1 gene implicate G-Protein signaling in the pathogenesis of Usher syndrome Type II. **American Journal of Human Genetics**, v. 74, p. 357–366, 2004.
- WILCH, E. et al. A novel DFNB1 deletion allele supports the existence of a distant cis-regulatory region that controls GJB2 and GJB6 expression. **Clinical Genetics**, v. 78, n. 3, p. 267–274, 2010.
- WILCOX, E. R. et al. Mutations in the gene encoding Tight Junction Claudin-14 cause autosomal recessive deafness DFNB29. **Cell**, v. 104, p. 165–172, 2001.
- WILLEMS, P. J. **Genetic Hearing Loss**. New York: Marcel Dekker, 2004.
- WILLIAMS, L. H. et al. Characterization of a novel enu-generated myosin vi mutant mouse strain with congenital deafness and vestibular dysfunction. **Hearing Research**, v. 299, p. 53–62, 2013.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Multi-country assessment of national capacity to provide hearing care** Geneva World Health Organization, , 2017.
- XIA, J. H. et al. Mutations in the gene encoding gap junction protein beta-3 associated with autosomal dominant hearing impairment. **Nature Genetics**, v. 20, n. 4, p. 370–373, 1998.
- XING, G. et al. Identification of OSBPL2 as a novel candidate gene for progressive nonsyndromic hearing loss by whole-exome sequencing. **Genetics in medicine**, v. 17, n. 3, p. 210–218, 2015.
- YAN, D. et al. Mutation of the ATP-gated P2X 2 receptor leads to progressive hearing loss and increased susceptibility to noise. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 110, n. 6, p. 2228–2233, 2013a.

- YAN, D. et al. Next-Generation Sequencing in Genetic Hearing Loss. **Genetic Testing and Molecular Biomarkers**, v. 17, n. 8, p. 581–587, 2013b.
- YANG, T. et al. Transcriptional control of SLC26A4 is involved in Pendred syndrome and nonsyndromic Enlargement of Vestibular Aqueduct (DFNB4). **American Journal of Human Genetics**, v. 80, p. 1055–1063, 2007.
- YANG, T. et al. Mutations of KCNJ10 together with mutations of SLC26A4 cause digenic nonsyndromic hearing loss associated with Enlarged Vestibular Aqueduct syndrome. **American Journal of Human Genetics**, v. 84, p. 651–657, 2009.
- YANG, Z. et al. Human GATA-3 trans-activation, DNA-binding, and nuclear localization activities are organized into distinct structural domains. **Molecular and Cellular Biology**, v. 14, n. 3, p. 2201–2212, 1994.
- YARIZ, K. O. et al. Mutations in OTOGL, encoding the inner ear protein otogelin-like, cause moderate sensorineural hearing loss. **American Journal of Human Genetics**, v. 91, n. 5, p. 872–882, 2012.
- YASUNAGA, S. et al. A mutation in OTOF, encoding otoferlin, a FER-1-like protein, causes DFNB9, a nonsyndromic form of deafness. **Nature Genetics**, v. 21, p. 363–369, 1999.
- YASUNAGA, S. et al. OTOF encodes multiple long and short isoforms: genetic evidence that the long ones underlie recessive deafness DFNB9. **American Journal of Human Genetics**, v. 67, p. 591–600, 2000.
- YOUNG, T. et al. Non-syndromic progressive hearing loss DFNA38 is caused by heterozygous missense mutation in the Wolfram syndrome gene WFS1. **Human Molecular Genetics**, v. 10, n. 22, p. 2509–2514, 2001.
- ZEVIANI, M. et al. A MERRF/MELAS overlap syndrome associated with a new point mutation in the mitochondrial DNA tRNA(Lys) gene. **European Journal of Human Genetics**, v. 1, n. 1, p. 80–87, 1993.
- ZHANG, L. et al. A dominant mutation in the Stereocilia-Expressing gene TBC1D24 is a probable cause for nonsyndromic hearing impairment. **Human Mutation**, v. 35, n. 7, p. 814–818, 2014.
- ZHANG, Y. et al. Sensorineural deafness and male infertility: a contiguous gene deletion syndrome. **Journal of Medical Genetics**, v. 44, p. 233–240, 2007.
- ZHAO, H. et al. Maternally Inherited Aminoglycoside-Induced and Nonsyndromic Deafness Is Associated with the Novel C1494T Mutation in the Mitochondrial

- 12S rRNA Gene in a Large Chinese Family. **American Journal of Human Genetics**, v. 74, p. 139–152, 2004.
- ZHAO, Y. et al. Exome Sequencing and Linkage Analysis identified Tenascin-C (TNC) as a novel causative gene in nonsyndromic hearing loss. **PLoS ONE**, v. 8, n. 7, p. e69549, 2013.
- ZHENG, J. et al. Carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 16 interacts with α -tectorin and is mutated in autosomal dominant hearing loss (DFNA4). **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 108, n. 10, p. 4218–4223, 2011.
- ZHU, M. et al. Mutations in the γ -Actin gene (ACTG1) are associated with dominant progressive deafness (DFNA20/26). **American Journal of Human Genetics**, v. 73, p. 1082–1091, 2003.
- ZONG, L. et al. Mutations in apoptosis-inducing factor cause X-linked recessive auditory neuropathy spectrum disorder. **Journal of Medical Genetics**, v. 52, p. 523–531, 2015.
- ZOU, J. et al. The roles of USH1 proteins and PDZ domain-containing USH proteins in USH2 complex integrity in cochlear hair cells. **Human Molecular Genetics**, v. 26, n. 3, p. 624–636, 2016.
- ZWAENEPOEL, I. et al. Otoancorin, an inner ear protein restricted to the interface between the apical surface of sensory epithelia and their overlying acellular gels, is defective in autosomal recessive deafness DFNB22. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 99, n. 9, p. 6240–6245, 2002.

ANEXOS

Anexo 01. Parecer final do Comitê de Ética e Pesquisa (CEP/FCM - UNICAMP) referente ao adendo do subprojeto “Sequenciamento massivo para a identificação e caracterização dos genes da surdez” ao projeto original intitulado “Estudo molecular da perda auditiva” (396/2006).



Universidade Estadual de Campinas
Pró-Reitoria de Pesquisa
Comitê de Ética em Pesquisa



CEP, 23/06/15.
(PARECER CEP: N° 396/2006)

PARECER

I – IDENTIFICAÇÃO:

PROJETO: “ESTUDO MOLECULAR DA PERDA AUDITIVA”.

PESQUISADOR RESPONSÁVEL: Edi Lúcia Sartorato

II – PARECER DO CEP.

O Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Estadual de Campinas (Unicamp) aprovou a adendo que inclui o subprojeto “**SEQUENCIAMENTO MASSIVO PARA A IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DOS GENES DA SURDEZ**”, com finalidade de Doutorado do aluno Fábio Tadeu Arrojo, referente ao protocolo de pesquisa supracitado.

III – DATA DA REUNIÃO.

Homologado na V Reunião Ordinária do CEP/UNICAMP, em 23 de junho de 2015.


Dra. Renata Maria dos Santos Celeghini
COORDENADORA DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA
UNICAMP

Anexo 02. Declaração de direitos autorais.**Declaração**

As cópias de artigos de minha autoria ou de minha co-autoria, já publicados ou submetidos para publicação em revistas científicas ou anais de congressos sujeitos a arbitragem, que constam da minha Dissertação/Tese de Mestrado/Doutorado, intitulada **SEQUENCIAMENTO PARALELO MASSIVO NA IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE GENES RELACIONADOS À PERDA AUDITIVA**, não infringem os dispositivos da Lei n.º 9.610/98, nem o direito autoral de qualquer editora.

Campinas, 16 de Julho de 2017

Assinatura : _____

Nome do(a) autor(a): **Fábio Tadeu Arrojo Martins**

RG n.º 33.991.742-8 SSP/SP

Assinatura : _____

Nome do(a) orientador(a): **Edi Lúcia Sartorato**

RG n.º 13.605.738-X SSP/SP