

Vítor de Góes Lima Dantas

ESTUDOS MOLECULARES NA PERDA AUDITIVA DE
HERANÇA AUTOSSÔMICA DOMINANTE

Versão corrigida. A versão original está disponível na biblioteca
do IB-USP.

São Paulo

2013

Vítor de Góes Lima Dantas

ESTUDOS MOLECULARES NA PERDA AUDITIVA DE HERANÇA AUTOSSÔMICA DOMINANTE

Tese apresentada ao Instituto de Biociências
da Universidade de São Paulo, para obtenção
do Título de Doutor em Ciências, na Área de
Biologia/Genética.

Orientadora: Profa. Dra. Regina Célia
Mingroni Netto

São Paulo
2013

Ficha Catalográfica

Dantas, Vítor de Góes Lima

Estudos moleculares na perda auditiva de herança autossômica dominante / Vítor de Góes Lima Dantas ; orientadora Regina Célia Mingroni Netto. --. São Paulo, 2013.

XX f.

Tese (Doutorado) – Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo. Departamento de Genética e Biologia Evolutiva.

1. Perda auditiva. 2. Mapeamento genético. 3. Sequenciamento massivo em paralelo. I. Universidade de São Paulo. Instituto de Biociências. Departamento de Genética e Biologia Evolutiva. II. Título.

Comissão Julgadora:

Prof(a). Dr(a).

Prof(a). Dr(a).

Prof(a). Dr(a).

Prof(a). Dr(a).

Profa. Dra. Regina Célia Mingroni Netto

Orientadora

Agradecimentos:

Agradeço a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa de estudos e auxílio financeiro.

Agradeço ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e a Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo auxílio financeiro.

Agradeço a minha orientadora Regina Célia Mingroni Netto pela orientação concedida, ensinamentos e experiências compartilhadas.

Agradeço ao Instituto de Biociências e ao Departamento de Genética e Biologia Evolutiva pela infraestrutura concedida.

Agradeço ao professor Dr. Paulo Alberto Otto pelas análises estatísticas de penetrância.

Agradeço a meus professores do passado e do presente que me deram toda a base científica que possuo hoje.

Agradeço a meus colegas de laboratório pela ajuda prestada em diversos experimentos e pela solução em diversos problemas com programas de computador utilizados em muitas análises.

Agradeço a fonoaudióloga Márcia Zucheratto e a todos os demais profissionais da DERDIC (Divisão de Educação dos Distúrbios de Comunicação) pelo auxílio com as avaliações audiológicas de inúmeros pacientes e pelo encaminhamento de diversas famílias, sem as quais esse estudo não seria possível.

Agradeço ao Dr. Valter De La Rosa e seus colaboradores pelo encaminhamento dos dados, avaliações clínicas e amostras da família 1.

Agradeço a Dra. Silvana Santos pelo encaminhamento dos dados e amostras da família 2.

Agradeço a Dra. Carolina Fischinger Moura de Souza e seus colaboradores pelo encaminhamento dos dados e amostras da família 4.

Agradeço a Dra. Erika Freitas pelos experimentos de *array*-CGH.

Agradeço ao pesquisador Guilherme Yamamoto pela ajuda prestada nos experimentos e análises dos dados do sequenciamento massivo em paralelo.

Agradeço as “meninas do genoma”, que é como eu as chamo; Meire Agüena, Katia Rocha, Vanessa Takahashi e Monize Lazar, pelo auxílio em vários experimentos, dicas de análise de dados e pelos momentos agradáveis que passei ao analisar dados de genotipagem na mesma sala que trabalham.

Ao funcionário Fernando Molina pelo suporte em informática, que permitiu o bom funcionamento do laboratório.

Agradeço a técnica Simone Gomes Ferreira pela ajuda, acompanhamento e auxílio nas questões duvidosas sobre os experimentos de *arrays* de SNPs.

Agradeço a minha companheira Jenifer de Carvalho Lopes por me suportar em muitos momentos de stress e de me ajudar quando precisei dela.

Agradeço a meus pais, irmãos e demais familiares que sempre me apoiaram e me deram forças para superar essa jornada, apesar de notar a clara tristeza de alguns deles por eu não estar presente em todos os momentos.

Sumário

Capítulo 1:

| | |
|---|----|
| Revisão Bibliográfica | |
| 1.1. Audição e Perda auditiva | 1 |
| 1.2. Perda auditiva Hereditária | 3 |
| 1.3. Perda auditiva de herança autossômica recessiva | 4 |
| 1.4. Perdas auditivas de herança ligada ao cromossomo X | 8 |
| 1.5. Perda auditiva de herança ligada ao cromossomo Y | 9 |
| 1.6. Perda auditiva de herança mitocondrial | 9 |
| 1.7. Genes modificadores da perda auditiva hereditária | 11 |
| 1.8. Perda auditiva de herança autossômica dominante | 11 |
| 1.9. Estratégias de Mapeamento de genes de surdez | 12 |
| 1.10. Estratégias de sequenciamento de genes | 19 |
| 1.11. Contribuição do sequenciamento de nova geração à identificação de genes de perda auditiva | 21 |

Capítulo 2:

| | |
|-----------|----|
| Objetivos | 26 |
|-----------|----|

Capítulo 3:

| | |
|---|----|
| Pacientes e Métodos | 27 |
| 3.1. Pacientes | 27 |
| 3.2. Extração do DNA | 28 |
| 3.3. Quantificação do DNA | 34 |
| 3.4. Análise de mutações específicas | 34 |
| 3.5. Análise de Microssatélites para Varredura Genômica | 34 |
| 3.6. Condições de amplificação | 35 |
| 3.7. Eletroforese e Análise dos fragmentos | 35 |
| 3.8. Varredura genômica por meio de <i>microarrays</i> de SNPs com a tecnologia <i>Affymetrix</i> | 35 |
| 3.9. Cálculos de <i>Lod Scores</i> | 36 |
| 3.10. Seleção de genes candidatos | 37 |
| 3.11. Sequenciamento de DNA pelo método de Sanger | 38 |
| 3.12. <i>Array-CGH</i> | 39 |
| 3.13. Sequenciamento Massivo em paralelo (de nova geração) | 39 |
| 3.14. PCR em tempo real | 40 |
| 3.15. Aspectos éticos da Pesquisa | 42 |

Capítulo 4:

| | |
|--|----|
| Estudos moleculares em surdez síndrômica de herança autossômica dominante: Síndrome Oto-branquial é causada por duplicação no gene <i>EYAI</i> encontrada em uma família brasileira. | 43 |
| Resumo | 43 |
| <i>Abstract</i> | 45 |
| 4.1. Introdução | 46 |
| 4.2. Pacientes e Métodos | 48 |
| 4.2.1. Pacientes | 48 |
| 4.2.2. Estudos Clínicos | 48 |
| 4.2.2.1. Avaliação audiológica | 48 |
| 4.2.2.2. Avaliação Genético-Clínica | 48 |
| 4.2.2.3. Exames de Imagem | 48 |
| 4.2.3. Estudos moleculares | 49 |
| 4.2.4. Estudos de Ligação | 49 |
| 4.2.5. Cálculos de <i>Lod Score</i> | 49 |
| 4.2.6. <i>Array-CGH</i> | 49 |
| 4.2.7. Sequenciamento do Gene <i>EYAI</i> | 49 |
| 4.3. Resultados | 50 |

| | |
|--|----|
| 4.3.1. Avaliação Audiológica | 50 |
| 4.3.2. Exames Clínicos | 50 |
| 4.3.3. Exames de Imagem | 54 |
| 4.3.4. Estudos Moleculares | 54 |
| 4.3.4.1. Mutações excluídas | 54 |
| 4.3.4.2. Locus DFNAs e OTSCs excluídos | 55 |
| 4.3.4.3. <i>Array</i> de SNPs | 55 |
| 4.3.4.4. Cálculos de <i>Lod Score</i> | 55 |
| 4.3.4.5. Sequenciamento de Sanger | 56 |
| 4.3.4.6. <i>Array-CGH</i> | 56 |
| 4.3.4.7. PCR em tempo real quantitativo | 59 |
| 4.4. Discussão | 61 |
| Capítulo 5: | |
| Estudos moleculares na surdez não síndrômica de herança autossômica dominante | 63 |
| 5.1. Família 2: | |
| Novo gene candidato mapeado no cromossomo 3 responsável por perda auditiva em uma família do rio Grande do Norte | 63 |
| Resumo | 63 |
| <i>Abstract</i> | 65 |
| 5.1.1. Pacientes e Métodos | 67 |
| 5.1.1.1. Pacientes | 67 |
| 5.1.1.2. Avaliação audiológica | 67 |
| 5.1.1.3. Estudos Moleculares | 67 |
| 5.1.1.3.1. Estudos de Ligação | 67 |
| 5.1.1.3.2. Cálculos de <i>Lod Score</i> | 68 |
| 5.1.1.3.3. Busca de Genes Candidatos | 68 |
| 5.1.1.3.4. Sequenciamento de Sanger | 68 |
| 5.1.1.3.5. <i>Array-CGH</i> | 70 |
| 5.1.1.3.6. Sequenciamento Massivo em Paralelo (sequenciamento de nova geração) | 70 |
| 5.1.2. Resultados | 72 |
| 5.1.2.1. Avaliação Audiológica | 72 |
| 5.1.2.2. Estudos Moleculares | 72 |
| 5.1.2.2.1. Mutações excluídas | 72 |
| 5.1.2.2.2. <i>Array-CGH</i> | 73 |
| 5.1.2.2.3. Estudos de Ligação e Cálculos de <i>Lod Score</i> | 73 |
| 5.1.2.2.4. Sequenciamento de Sanger de genes candidatos | 78 |
| 5.1.2.2.5. Sequenciamento Massivo em Paralelo | 80 |
| 5.1.3. Discussão | 81 |
| 5.2. Família 3: | |
| Novo locus de perda auditiva de herança autossômica dominante mapeado no cromossomo 20 | 86 |
| Resumo | 86 |
| <i>Abstract</i> | 88 |
| 5.2.1. Pacientes e Métodos | 90 |
| 5.2.1.1. Pacientes | 90 |
| 5.2.1.2. Avaliação audiológica | 90 |
| 5.2.1.3. Exames de imagem | 90 |
| 5.2.1.4. Estudos Moleculares | 90 |
| 5.2.1.4.1. Estudos de Ligação | 90 |
| 5.2.1.4.2. Cálculos de <i>Lod Score</i> | 91 |
| 5.2.1.4.3. Busca de Genes Candidatos | 91 |
| 5.2.1.4.4. Sequenciamento de Sanger | 91 |
| 5.2.1.4.5. <i>Array-CGH</i> | 91 |
| 5.2.1.4.6. Sequenciamento massivo em paralelo (sequenciamento de nova geração) | 92 |
| 5.2.2. Resultados | 94 |

| | |
|---|-----|
| 5.2.2.1. Avaliação Audiológica | 94 |
| 5.2.2.2. Outros estudos clínicos | 94 |
| 5.2.2.3. Estudos Moleculares | 95 |
| 5.2.2.3.1. Mutações excluídas | 95 |
| 5.2.2.3.2. Estudos de Ligação e Cálculos de <i>Lod Score</i> | 95 |
| 5.2.2.3.3. Busca por genes candidatos e Sequenciamento de Sanger | 95 |
| 5.2.2.3.4. Sequenciamento Massivo em Paralelo | 103 |
| 5.2.3. Discussão | 104 |
| 5.3. Família 4: | |
| Mutação no gene <i>MYH9</i> (DFNA17) explica a perda auditiva de herança autossômica dominante em família do Sul do Brasil | 109 |
| Resumo | 109 |
| <i>Abstract</i> | 111 |
| 5.3.1. Pacientes e Métodos | 113 |
| 5.3.1.1. Pacientes | 113 |
| 5.3.1.2. Avaliação audiológica | 113 |
| 5.3.1.3. Estudos Moleculares | 113 |
| 5.3.1.3.1. Estudos de Ligação | 113 |
| 5.3.1.3.2. Cálculos de <i>Lod Score</i> | 113 |
| 5.3.1.3.3. Busca de Genes Candidatos | 114 |
| 5.3.1.3.4. Sequenciamento de Sanger | 114 |
| 5.3.1.3.5. <i>Array-CGH</i> | 114 |
| 5.3.1.3.6. Sequenciamento massivo em paralelo (sequenciamento de nova geração) | 115 |
| 5.3.2. Resultados | 117 |
| 5.3.2.1. Avaliação Audiológica | 117 |
| 5.3.2.2. Estudos Moleculares | 117 |
| 5.3.2.2.1. Mutações excluídas | 117 |
| 5.3.2.2.2. <i>Array-CGH</i> | 117 |
| 5.3.2.2.3. Lócus DFNA excluídos | 117 |
| 5.3.2.2.4. Estudos de Ligação e Cálculos de <i>Lod Score</i> | 118 |
| 5.3.2.2.5. Busca por genes candidatos | 126 |
| 5.3.2.2.6. Sequenciamento Massivo em Paralelo | 129 |
| 5.3.3. Discussão | 130 |
| 5.4. Família 5: | |
| Mutação no gene <i>MYO3A</i> (DFNB30) explica a perda auditiva de herança autossômica dominante em família do Sudeste do Brasil | 136 |
| Resumo | 136 |
| <i>Abstract</i> | 138 |
| 5.4.1. Pacientes e Métodos | 139 |
| 5.4.1.1. Pacientes | 139 |
| 5.4.1.2. Avaliação audiológica | 139 |
| 5.4.1.3. Estudos Moleculares | 139 |
| 5.4.1.3.1. Estudos de Ligação | 139 |
| 5.4.1.3.2. Cálculos de <i>Lod Score</i> | 139 |
| 5.4.1.3.3. <i>Array-CGH</i> | 140 |
| 5.4.1.3.4. Sequenciamento de Sanger | 140 |
| 5.4.1.3.5. Sequenciamento massivo em paralelo (sequenciamento de nova geração) | 140 |
| 5.4.2. Resultados | 142 |
| 5.4.2.1. Avaliação Audiológica | 142 |
| 5.4.2.2. Estudos Moleculares | 143 |
| 5.4.2.2.1. Mutações excluídas | 143 |
| 5.4.2.2.2. <i>Array-CGH</i> | 143 |
| 5.4.2.2.3. Estudos de Ligação e Cálculos de <i>Lod Score</i> | 143 |
| 5.4.2.2.4. Sequenciamento Massivo em Paralelo | 154 |
| 5.4.3. Discussão | 155 |

| | |
|--|-----|
| Capítulo 6: | |
| Considerações Finais | 159 |
| Capítulo 7: | |
| Conclusões | 161 |
| Capítulo 8: | |
| Referências Bibliográficas | 163 |
| Apêndice: | |
| Apêndice 1. Termo de consentimento livre e esclarecido para maiores de 18 anos | 181 |
| Apêndice 2. Termo de consentimento livre e esclarecido para menores de 18 anos | 184 |

Índice de Tabelas

| | |
|--|-----|
| Tabela 1.1. Locus mapeados responsáveis pela perda auditiva hereditária não síndrômica autossômica recessiva. | 6 |
| Tabela 1.2. Locus mapeados responsáveis pela perda auditiva hereditária ligada ao cromossomo X. | 9 |
| Tabela 1.3. Mutações mitocondriais responsáveis por perda auditiva de herança mitocondrial do tipo não síndrômica. | 10 |
| Tabela 1.4. Locus mapeados como responsáveis por perda auditiva hereditária não síndrômica autossômica dominante. | 13 |
| Tabela 1.5. Genes identificados responsáveis por perda auditiva autossômica dominante não síndrômica, suas funções e efeitos das mutações identificadas. | 15 |
| Tabela 4.1. Sequência dos <i>primers</i> utilizados para sequenciar o gene <i>EYAI</i> . | 50 |
| Tabela 4.2. Resultado do exame clínico realizado nos membros da família com perda auditiva neurossensorial. | 53 |
| Tabela 4.3. Resumo dos resultados dos exames clínicos e de tomografia computadorizada dos ossos temporais dos indivíduos caracterizados com perda auditiva mista. | 54 |
| Tabela 5.1. Sequência dos <i>primers</i> utilizados na amplificação dos fragmentos dos quatro marcadores moleculares posteriormente utilizados. A sequência F de cada marcador é marcada com a fluorescência 56-FAM. | 68 |
| Tabela 5.2. Sequência dos <i>primers</i> utilizados na amplificação dos exons dos genes <i>GATA2</i> , <i>RAB6B</i> , <i>SLC12A8</i> e <i>RAB7A</i> . | 69 |
| Tabela 5.3. Sequência dos <i>primers</i> utilizados na amplificação dos exons que contêm as variantes dos genes <i>ESYT3</i> , <i>CHST2</i> e <i>PLS1</i> . | 70 |
| Tabela 5.4. Segregação das variantes dos genes <i>ESYT3</i> , <i>CHST2</i> e <i>PLS1</i> na família 2. | 82 |
| Tabela 6.1. Sequência dos <i>primers</i> utilizados na amplificação dos exons dos genes <i>NCOA3</i> , <i>SEMG1</i> e <i>PREX1</i> contendo as variantes candidatas. | 91 |
| Tabela 6.2. Segregação das variantes dos genes <i>NCOA3</i> , <i>SEMG1</i> e <i>PREX1</i> na família 3. | 105 |
| Tabela 7.1. Sequência dos <i>primers</i> utilizados na amplificação do exon que contém a variante dos genes <i>PTGDR</i> , <i>PTGER2</i> e <i>MYH9</i> . | 114 |
| Tabela 7.2. Segregação das variantes dos genes <i>PTGDR</i> , <i>PTGER2</i> e <i>MYH9</i> na família 4. | 132 |
| Tabela 8.1. Sequência dos <i>primers</i> utilizados na amplificação dos exons que contêm as variantes dos genes <i>MYO3A</i> e <i>LONP2</i> . | 140 |
| Tabela 8.2. Variantes cuja frequência no banco de dados <i>1000 genomes</i> inferiores a 1% em heterozigose nos 4 indivíduos afetados testados da família. | 155 |
| Tabela 8.3. Segregação das variantes dos genes <i>MYO3A</i> e <i>LONP2</i> na família 5. | 156 |

Índice de Figuras

- Figura 3.1. Genealogia da família 1, mostrando os 20 indivíduos afetados (em negro) e os indivíduos fenotipicamente normais (em branco). O indivíduo assinalado com o sinal (?) se declarou afetado, porém não foram obtidos resultados da avaliação audiológica. Contamos com amostras de DNA dos indivíduos assinalados com (—). 29
- Figura 3.2. Genealogia da família 2, mostrando os 16 indivíduos afetados (em negro) e os indivíduos fenotipicamente normais (em branco). Contamos com amostras de DNA dos indivíduos assinalados com (—). 30
- Figura 3.3. Genealogia da família 3, mostrando os 15 indivíduos afetados (em negro) e os indivíduos fenotipicamente normais (em branco). O indivíduo assinalado com o sinal (?) se declarou normal, porém resultados da avaliação audiológica por meio de emissões otoacústicas sugerem perda auditiva. Contamos com amostras de DNA dos indivíduos assinalados com (—). 31
- Figura 3.4. Genealogia da família 4, mostrando os 11 indivíduos afetados (em negro) e os indivíduos fenotipicamente normais (em branco). Os três indivíduos assinalados com o sinal (?) são afetados por perda auditiva leve, somente em altas frequências, após 40 anos de idade. Contamos com amostras de DNA dos indivíduos assinalados com (—). 32
- Figura 3.5. Genealogia resumida da família 5, mostrando 18 indivíduos afetados (em negro) e os indivíduos fenotipicamente normais (em branco). O indivíduo assinalado com o sinal (?) se declarou afetado, porém não contamos com resultados de avaliação audiológica. Contamos com amostras de DNA dos indivíduos assinalados com (—). 33
- Figura 4.1. Audiograma de seis indivíduos afetados por perda auditiva neurosensorial. Limiares auditivos até 20dB (decibéis – unidade de intensidade sonora, varia de 0 a 120) são considerados normais (Hz = Hertz – unidade de frequência da onda sonora, que varia de 250 a 8000). Os símbolos (●) e (X) representam os resultados obtidos através da via aérea de condução de som. A) Orelha direita; B) Orelha esquerda. 51
- Figura 4.2. Audiograma de cinco indivíduos afetados por perda auditiva mista. O símbolo (◇) foi escolhido para representar a via óssea e os símbolos (●) e (X) representam os resultados obtidos através da via aérea. Limiares auditivos até 20dB (decibéis – unidade de intensidade sonora, varia de 0 a 120) são considerados normais (Hz = Hertz – unidade de frequência da onda sonora, que varia de 250 a 8000). 1) Propósito; 2) IV:5; 3) III:1; 4) III:11; 5) IV:18. 52
- Figura 4.3. Valores de *Lod Score* no cromossomo 8. 57
- Figura 4.4. Duplicação encontrada no gene *EYAI* por meio da técnica *Array-CGH*. Marcada com a fluorescência vermelha está a amostra do afetado e marcada com a fluorescência verde está a amostra controle. Os pontos em preto indicam que não houve diferença na concentração da fluorescência na comparação entre as amostras. A região em destaque mostra maior concentração da fluorescência vermelha, indicando DNA duplicado na amostra do indivíduo afetado. 58
- Figura 4.5. Resultados das razões de quantificação do número de cópias do gene *EYAI* comparadas com os genes controles *GAPDH* e *HPRT* (estimativa do número de cópias). Controle + é a denominação do indivíduo com duplicação detectada por *array-CGH*. A) Experimento 1, mostrando os resultados de indivíduos com duplicação e sem duplicação; B) Experimento 2, mostrando resultados de indivíduos sem duplicação; C) Experimento 3, mostrando os resultados de indivíduos sem duplicação. 60
- Figura 5.1. Audiograma de 14 dos 16 indivíduos afetados por perda auditiva neurosensorial. Limiares auditivos até 20dB (decibéis – unidade de intensidade sonora, varia de 0 a 120) são considerados normais (Hz = Hertz – unidade de frequência da onda sonora, que varia de 250 a 8000). Os símbolos (●) e (X) representam os resultados obtidos através da via aérea de condução de som. A) Orelha direita; B) Orelha esquerda. 74
- Figura 5.2. Resultados de *Lod Score* de múltiplos pontos obtidos com resultados de marcadores do tipo microssatélites para cada autossomo, calculados pelo programa Merlin. As linhas horizontais de coloração cinza claro em cada gráfico indicam os valores convencionais para exclusão de ligação (-2.00) e ligação significativa (+3.00). 75

Figura 5.3. Genealogia da família mostrando os haplótipos do cromossomo 3 que correspondem a região DFNA18 e seus marcadores adjacentes, após a inclusão dos indivíduos III:7, III:8, III:9 e III:10. Em vermelho está apresentada a região mapeada por nós e em amarelo a região do DFNA18 mapeada anteriormente por Bonsch e col. (2001) 79

Figura 6.1. Audiograma de 7 dos 15 indivíduos afetados por perda auditiva neurossensorial. Limiares auditivos até 20dB (decibéis – unidade de intensidade sonora, varia de 0 a 120) são considerados normais (Hz = Hertz – unidade de frequência da onda sonora, que varia de 250 a 8000). Os símbolos (●) e (X) representam os resultados obtidos através da via aérea de condução de som. A) Orelha direita; B) Orelha esquerda. 97

Figura 6.2. Resultados de *Lod Score* de múltiplos pontos obtidos com resultados de *Arrays* de SNPs, para cada autossomo, calculados pelo programa Merlin. As linhas horizontais de coloração cinza claro em cada gráfico indicam os valores convencionais para exclusão de ligação (-2.00) e ligação significativa (+3.00). 98

Figura 6.3. Genealogia resumida da família mostrando análise de ligação com marcadores moleculares do tipo microssatélites nos indivíduos afetados e normais. O indivíduo assinalado com sinal de (?) se declarou normal. No entanto, a avaliação de emissões otoacústicas mostrou um resultado fora do padrão de normalidade. A numeração das gerações está de acordo com a numeração da Figura 3.1. 102

Figura 7.1. Audiograma de 6 dos 11 indivíduos afetados por perda auditiva neurossensorial. Limiares auditivos até 20dB (decibéis – unidade de intensidade sonora, varia de 0 a 120) são considerados normais (Hz = Hertz – unidade de frequência da onda sonora, que varia de 250 a 8000). Os símbolos (●) e (X) representam os resultados obtidos através da via aérea de condução de som. A) Orelha direita; B) Orelha esquerda. 119

Figura 7.2. Resultados de *Lod Score* de múltiplos pontos obtidos com resultados de *Arrays* de SNPs, para cada autossomo, calculados pelo programa Merlin. As linhas horizontais de coloração cinza claro em cada gráfico indicam os valores convencionais para exclusão de ligação (-2.00) e ligação significativa (+3.00). 120

Figura 7.3. Genealogia da família 4 mostrando a segregação dos haplótipos dos marcadores moleculares do tipo microssatélites do cromossomo 22 nos indivíduos afetados e normais. Os indivíduos assinalados com sinal de (?) são afetados por perda auditiva leve em altas frequências, após os 40 anos de idade. Em vermelho está a região mapeada com base na segregação dos haplótipos. 124

Figura 7.4. Resultados de *Lod Scores* de múltiplos pontos obtidos com resultados de *Arrays* de SNPs para o cromossomo 22, calculado pelo programa Merlin. As linhas horizontais de colocação cinza claro em cada gráfico indicam os valores convencionais para exclusão de ligação (-2.00) e de ligação significativa (+3.00). A) Indivíduos assinalados com o sinal de (?) foram considerados normais; B) Indivíduos assinalados com o sinal de (?) foram considerados afetados. 125

Figura 7.5. Genealogia da família 4 mostrando a segregação dos haplótipos dos marcadores moleculares do tipo microssatélites do cromossomo 14 nos indivíduos afetados e normais. Os indivíduos assinalados com sinal de (?) são afetados por perda auditiva leve em altas frequências, após os 40 anos de idade. Em vermelho está a região mapeada com base na segregação dos haplótipos. 127

Figura 7.6. Resultados de *Lod Scores* de múltiplos pontos obtidos com resultados de *Arrays* de SNPs para o cromossomo 14, calculado pelo programa Merlin. As linhas horizontais de colocação cinza claro em cada gráfico indicam os valores convencionais para exclusão de ligação (-2.00) e de ligação significativa (+3.00). A) Indivíduos assinalados com o sinal de (?) foram considerados normais; B) Indivíduos assinalados com o sinal de (?) foram considerados afetados. 128

Figura 7.7. Regiões previamente mapeadas pra lócus de perda auditiva no cromossomo 14. Em vermelho está indicada a região do DFNA9, em laranja a região do DFNA23, em azul a região do DFNA53 e em verde a região mapeada em nosso estudo. 133

Figura 8.1. Audiograma de 9 dos 30 indivíduos afetados por perda auditiva neurossensorial. Limiares auditivos até 20dB (decibéis – unidade de intensidade sonora, varia de 0 a 120) são considerados normais (Hz = Hertz – unidade de frequência da onda sonora, que varia de 250 a 8000). Os símbolos (●) e (X) representam os resultados obtidos através da via aérea de condução de som. A) Orelha direita; B) Orelha esquerda. 144

Figura 8.2. Resultados de *Lod Scores* de múltiplos pontos obtidos com resultados de *Arrays* de SNPs, para cada autossomo, calculados pelo programa Merlin. As linhas horizontais de coloração cinza claro em cada gráfico indicam os valores convencionais para exclusão de ligação (-2.00) e de ligação significativa (+3.00). Coluna da esquerda: Subpedigree 1; Coluna central: Subpedigree 2; Coluna da direita: Subpedigree 3. 145

Figura 8.3. Resultados de *Lod Scores* de múltiplos pontos obtidos com resultados de *Arrays* de SNPs, para cada autossomo, calculados pelo programa allegro. A) Subpedigree 1; B) Subpedigree 2; C) Subpedigree 3. 153

Resumo

A surdez pode ser causada por fatores ambientais, genéticos ou ambos. Do ponto de vista genético, a surdez é extremamente heterogênea, pois é condicionada por mutações em diversos genes localizados em diferentes cromossomos, podendo exibir mecanismos de herança diversos. O objetivo desse estudo foi identificar novos genes e mutações relacionados à perda auditiva de herança autossômica dominante. Foram estudadas molecularmente cinco famílias. A família 1 foi averiguada na cidade de Maringá-PR. Apresenta 20 indivíduos afetados pela síndrome Oto-branquial (BOS). Estudos de mapeamento gênico com *arrays* de SNPs mostraram um *Lod Score* sugestivo de ligação para uma região do cromossomo 8, onde está localizado o gene *EYAI*, já relacionado à síndrome. O sequenciamento dos exons do gene não revelou mutação. No entanto, estudos de *array*-CGH e de PCR em tempo real permitiram detectar uma duplicação de aproximadamente 72 kb no gene *EYAI* em 11 dos 12 indivíduos afetados testados da família, ausente nos indivíduos fenotipicamente normais. Portanto, concluímos que a síndrome nessa família é decorrente dessa duplicação, nunca antes descrita em casos de BOS. A família 2 foi averiguada na cidade de São Miguel-RN, com 16 indivíduos afetados por perda auditiva de herança autossômica dominante não sindrômica. Estudos de mapeamento gênico com marcadores moleculares do tipo microssatélites e cálculos de *Lod Score* indicaram uma região no cromossomo 3 como candidata a conter o gene responsável pelo fenótipo na família. Estudos de sequenciamento massivo em paralelo da amostra de um indivíduo afetado apontaram três variantes *missense* em heterozigose como sendo as mais prováveis causas do fenótipo, mas duas delas foram excluídas com base em estudos de segregação. A terceira variante foi triada em uma coleção de 47 amostras de probandos de famílias com surdez autossômica dominante, mas não foi encontrada. Há estudos em andamento buscando confirmar seu papel na surdez hereditária. A família 3 foi averiguada na cidade de São Paulo-SP e apresenta 15 indivíduos afetados por perda auditiva de herança autossômica dominante não sindrômica. Estudos de mapeamento gênico com o uso de *arrays* de SNPs e cálculos de *Lod Score* mapearam uma região no cromossomo 20 como candidata a conter o gene responsável pelo fenótipo. Estudos de sequenciamento massivo em paralelo de amostras de dois indivíduos afetados apontaram três variantes *missense* em heterozigose como as mais prováveis causas do quadro. Estudos de segregação excluíram duas das variantes e a terceira variante foi triada na coleção de 47 amostras de probandos de famílias com surdez de herança dominante, mas não foi encontrada. Outros estudos estão em andamento para verificar seu papel na surdez. A família 4 foi averiguada na cidade de Porto Alegre-RS e apresenta 11 indivíduos afetados por perda auditiva de herança

autossômica dominante não síndrômica. Estudos de mapeamento genético com o uso de *arrays* de SNPs e de cálculo de *Lod Score* mapearam duas regiões, nos cromossomos 14 e 22, como candidatas a conter o gene responsável. Estudos de sequenciamento massivo em paralelo em amostras de três indivíduos afetados apontaram 3 variantes *missense* em heterozigose nas regiões mapeadas (duas no cromossomo 14 e uma no cromossomo 22). Observamos que somente a variante rs80338828 no gene *MYH9*, no cromossomo 22, segrega com o fenótipo. Essa variante já foi previamente relacionada à perda auditiva de herança autossômica dominante e provavelmente explica a perda auditiva na família. A família 5 foi averiguada na cidade de São Paulo-SP e apresenta 30 indivíduos afetados por perda auditiva de herança autossômica dominante e não síndrômica. Estudos de ligação com *arrays* de SNPs e cálculos de *Lod Score* não apontaram a região candidata devido a limitações computacionais e à estrutura da genealogia. Estudos de sequenciamento massivo em paralelo de amostras de quatro indivíduos afetados apontaram 13 variantes presentes nos quatro, em heterozigose. Foram selecionadas para estudo duas das variantes, uma no gene *MYO3A*, por se tratar de um gene já relacionado à perda auditiva e uma no gene *LONP2*, por se tratar de uma mutação de códon de parada prematuro. Estudos de segregação mostraram que a variante no gene *LONP2* não segrega com o fenótipo na família e que a variante no gene *MYO3A* parece segregar com o fenótipo, exceto por sua ausência em um indivíduo afetado e sua presença em sete indivíduos aparentemente normais, que poderiam ser não-penetrantes. Mutações no gene *MYO3A* já foram relacionadas previamente à perda auditiva de herança autossômica recessiva, mas chama a atenção o fato do padrão de herança nessa família ser o dominante. Mais estudos são necessários para confirmar o papel dessa e de outras variantes no fenótipo da família. Portanto, o estudo molecular das cinco famílias revelou dois possíveis novos genes de surdez, um novo mecanismo mutacional na síndrome BOS, mutação em gene já conhecido e hipótese de novo mecanismo de herança para mutação no gene *MYO3A*.

Abstract

Deafness can be caused by environmental factors, genetic factors or both. Genetic deafness is highly heterogeneous, because it is caused by mutations in many genes located in different chromosomes and can be explained by different inheritance patterns. The aim of this study was to identify new genes and search for new mutations related to autosomal dominant hearing loss. Five families were selected for molecular studies. Family 1 was ascertained in Maringá-PR. It includes 20 individuals affected by Branchio-oto syndrome (BOS). Genomic scanning with SNP arrays showed suggestive Lod scores on a region at chromosome 8, where the *EYAI* gene is located, already known to be related to this syndrome. Sequencing of all exons of the gene did not reveal the mutation. However, array-CGH and real time PCR studies detected a duplication of 72 kb on *EYAI* gene, in 11 of the 12 affected individuals tested, and it was absent in the unaffected individuals. Our findings implicate this *EYAI* duplication in the BOS1 phenotype observed in the pedigree. Large duplications in *EYAI* gene were not reported before. Family 2 was ascertained at São Miguel-RN, with 16 individuals affected by non syndromic autosomal dominant hearing loss. Genomic scanning with microsatellites and Lod score calculations mapped a region at chromosome 3 as candidate to contain the gene responsible for the phenotype in the family. Massive Parallel Sequencing of a sample from one affected individual indicated 3 missense variants in heterozygosis that could explain the phenotype. Two variants were excluded after segregation studies. The third variant was screened in a cohort of 47 probands from families with individuals affected by autosomal dominant hearing loss and it was not detected. Further studies are needed to confirm its role in hearing loss. Family 3 was ascertained in São Paulo-SP and presents 15 individuals affected by non syndromic autosomal dominant hearing loss. Genomic scanning with SNP arrays and Lod score calculations suggested a region at chromosome 20 as the candidate to contain the gene that causes the phenotype. Massive Parallel Sequencing with samples from two affected individuals suggested 3 missense variants in heterozygosis that could explain the phenotype. Two variants were excluded after segregation studies and one variation was selected as the best candidate to explain the phenotype. We searched for this variant in a cohort of 47 probands from families with individuals affected by autosomal dominant hearing loss and it was not detected. Other studies are being conducted to confirm the role of this variation in deafness. Family 4 was ascertained at Porto Alegre-RS and presents 11 individuals affected by non syndromic autosomal dominant hearing loss. Genomic scanning with SNP arrays and Lod score calculations indicated two regions, at chromosomes 14 and 22, as the best candidates to contain the hearing loss gene. Massive Parallel Sequencing studies with

samples from 3 affected individuals indicated 3 missense variants in heterozygosis (two variants at chromosome 14 and one at chromosome 22). We observed that only the variant rs80338828, in *MYH9* gene, in chromosome 22, segregates with the phenotype. This variant was previously related to autosomal dominant hearing loss and probably explains the phenotype observed in this family. Family 5 was ascertained at São Paulo-SP and presents 30 individuals affected by non syndromic autosomal dominant hearing loss. Genomic scanning with SNP arrays and Lod score calculations did not indicate candidate regions due to computer limitations. Massive Parallel Sequence studies with samples from four affected individuals suggested 13 candidate variants, in heterozygosis. Two variants were selected for further studies: one in *MYO3A*, previously related to hearing loss, and one in *LONP2* gene, a nonsense mutation. Segregation studies showed the *LONP2* variant did not segregate with the phenotype and *MYO3A* variant seems to segregate with the phenotype, except for its absence in one affected individual and its presence in seven unaffected ones, who could be nonpenetrants. Mutations in *MYO3A* were previously related to autosomal recessive hearing loss, but the family described here presents autosomal dominant pattern of inheritance. More studies are needed to explain the role of this variant in the phenotype. Thus, the molecular study of five pedigrees revealed two novel candidate genes for deafness, one novel mutation mechanism in BOS, a mutation in one previously known gene and the possibility of a novel inheritance mechanism for a *MYO3A* mutation.

CAPÍTULO 1.

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1.1. Audição e Perda auditiva.

As informações a seguir foram obtidas principalmente dos artigos de revisão de Carlson (1998), Willems (2000) e Pujol e col. (2002).

A audição é caracterizada pela capacidade do ser humano receber, escutar e interpretar as ondas sonoras produzidas no meio em que vive. Ela é o meio pelo qual o indivíduo tem contato com os sons e, portanto, é de suma importância para que possa adquirir e aprimorar as habilidades de linguagem.

O deficiente auditivo pode não conseguir perceber esses sons, a depender do grau e a idade do início da deficiência. Em consequência, há um comprometimento de várias capacidades que dependem do correto funcionamento da audição. Além do mais, a perda auditiva pode isolar o indivíduo do mundo, o que pode acarretar vários distúrbios psicológicos e de interação. Portanto, a detecção da deficiência e o correto diagnóstico nos primeiros meses de vida são importantes para que se tomem as medidas adequadas para minimizar os danos que a deficiência possa vir a causar no indivíduo.

Nesse estudo, o termo surdez será comumente utilizado para definir qualquer tipo de perda auditiva independente do tipo ou grau de comprometimento. Os termos surdez, perda auditiva e deficiência auditiva serão considerados sinônimos nesse estudo, embora em textos de audiologia seja feita a distinção entre os termos surdez e os demais, o termo surdez sendo reservado para perdas graves ou profundas.

A perda auditiva pode ser causada por uma enorme variedade de fatores, sendo, portanto uma característica heterogênea. Suas causas podem ser tanto genéticas quanto ambientais ou uma combinação de ambos os fatores. Em países pouco desenvolvidos, as doenças infecciosas são as principais responsáveis pela alta incidência da perda auditiva. Entretanto, em países desenvolvidos, a principal causa de perda auditiva são as causas genéticas, uma vez que o sistema de saúde provê melhor acesso a cuidados com a saúde materna e infantil. Portanto, à medida que o sistema de saúde melhora, os casos de perda auditiva decorrentes de causas infecciosas tendem a diminuir e, com

isso, os casos decorrentes de deficiência hereditária se tornam proporcionalmente mais frequentes (Grundfast, Atwoo e Choung, 1999). Além das doenças infecciosas, temos também como causas ambientais as exposições a drogas ototóxicas, os traumas físicos e acústicos.

De acordo com a organização mundial de saúde, em 2013, cerca de 360 milhões de pessoas sofrem de perda auditiva dos tipos moderada a grave, sendo que 80% dessas pessoas estão em países em desenvolvimento ou subdesenvolvidos. No Brasil, segundo o censo IBGE/2000, cerca de 30% da população sofre de perda auditiva de algum tipo ou grau, o que corresponde a aproximadamente 5,7 milhões de deficientes.

É estimado que, em países desenvolvidos, cerca de um em cada mil nascimentos sejam de deficientes auditivos com grau de grave a profundo. No Brasil essa frequência pode atingir três ou quatro em cada mil nascimentos (Braga e col., 1999; Piatto e Maniglia, 2001), devido a causas ambientais. Em relação aos casos genéticos, o padrão de herança mais frequentemente encontrado é o padrão de herança recessivo, especialmente entre os pré-linguais. No que se refere à perda auditiva pós-lingual de caráter hereditário, o padrão de herança mais frequente é o dominante (Smith e col., 2012).

As perdas auditivas podem ser classificadas de acordo com: a manifestação clínica, a lateralidade, a idade de manifestação, a gravidade, as frequências atingidas, a evolução do quadro e a origem da deficiência. Segundo a revisão de Smith e col. (2012), de acordo com a manifestação clínica, a perda auditiva pode ser dividida em não síndrômica ou síndrômica (presente em síndromes com surdez). Nos casos não síndrômicos a perda auditiva aparece isolada, sem outros sinais associados à deficiência. A perda auditiva síndrômica é caracterizada pela perda auditiva associada a outros sintomas e deficiências. A perda auditiva pode ser unilateral, quando afeta somente uma das orelhas ou bilateral, quando ambas as orelhas são afetadas. Em relação à idade de manifestação, a deficiência pode ser classificada como pré-lingual, quando ela ocorre antes do indivíduo adquirir a capacidade de falar, ou pós-lingual, quando ocorre depois do indivíduo adquirir a fala.

De acordo com a gravidade, a perda auditiva é classificada como sendo de grau leve, quando os limiares auditivos aumentados se situam na faixa entre 21 e 40 decibéis (dB); é moderada, quando os limiares estão na faixa entre 41 e 70 dB; é grave, quando atingem a faixa entre 71 e 90 dB e profunda, quando os limiares são superiores a 91 dB (Davis e Silverman, 1970). Para essa classificação, são calculados os valores médios dos limiares em decibéis da melhor orelha para as frequências de 500, 1000, 2000 e 4000 Hertz (Hz) (Silman e Silverman, 1991). Se a perda for em sons agudos, denomina-se, então, perda auditiva de altas frequências. Se for em sons graves, é denominada perda auditiva em baixas frequências.

De acordo com a evolução do quadro, a perda pode ser considerada progressiva ou estacionária. No caso de ela ser progressiva, ocorre evolução com a idade para deficiência mais grave. No quadro estacionário, mantém-se a gravidade por toda a vida do indivíduo.

Caso o distúrbio esteja localizado na orelha externa ou média, impedindo fisicamente a captação e condução da onda sonora até o ouvido interno, a deficiência é caracterizada como sendo condutiva. Já a classificação da deficiência neurossensorial é um pouco mais complexa, pois pode decorrer de defeitos na orelha interna e/ou defeitos no sistema nervoso central e periférico. Esses casos podem ser classificados em dois tipos: na perda auditiva dita sensorial, o defeito ocorre nas células ciliadas externas da cóclea; no caso da perda auditiva neural, o defeito encontra-se nas células ciliadas internas e/ou nervo auditivo. Quando o defeito ocorre no tronco encefálico ou em outras estruturas do sistema nervoso central, há autores que denominam a perda auditiva como central (Smith e col., 2012). Entre os casos de perda auditiva neurossensorial hereditária, predominam os que são decorrentes da morte das células ciliadas da cóclea, ou seja, as sensoriais. Até o presente momento, a maioria dos produtos gênicos conhecidos relacionados à perda auditiva hereditária se expressam na cóclea.

1.2. Perda auditiva Hereditária.

Cerca de 70% dos casos de perda auditiva hereditária são classificados como não sindrômicos (Keats e Berlin, 1999). No que se refere à perda auditiva sindrômica, as

síndromes mais frequentes que apresentam a perda auditiva como um de seus principais sintomas são as: síndrome de Waardenburg (*OMIM* #193500), síndrome de Treacher Collins (*OMIM* #154500), síndrome de Usher (*OMIM* #276900), síndrome de Pendred (*OMIM* #274600), síndrome Branquio-oto-renal (*OMIM* #113650) e síndrome de Alport (*OMIM* #301050).

Já se conhecem mais de 100 loci associados à perda auditiva não sindrômica. Entretanto, se conhece um número bem menor de genes responsáveis já identificados (Van Camp e Smith, 2012). Para o mapeamento dessas regiões, foram utilizados, ao longo dos últimos anos, principalmente os estudos de ligação em grandes famílias de indivíduos afetados por perda auditiva. Recentemente, têm sido utilizadas também as técnicas de sequenciamento massivo em paralelo (de nova geração), principalmente a análise de exomas, para se encontrar o provável gene causador da doença, com ou sem mapeamento cromossômico prévio (Rehman e col., 2010; Walsh e col., 2010; Schraders e col., 2011). As perdas auditivas hereditárias podem apresentar os seguintes tipos de herança: herança autossômica dominante, herança autossômica recessiva, herança mitocondrial, herança ligada ao cromossomo X dominante e recessiva e herança ligada ao cromossomo Y.

DFN são as siglas utilizadas para identificar os loci associados à perda auditiva. Essa nomenclatura vem da palavra da língua inglesa *Deafness*. Os loci são numerados de acordo com a ordem em que foram mapeados. Os loci responsáveis por conter prováveis genes causadores de perda auditiva de herança dominante recebem a terminação A, portanto, são os chamados DFNA, seguidos do número correspondente à ordem em que foram mapeados. Os loci da deficiência auditiva de herança autossômica recessiva recebem a terminação B. São chamados de DFNB, seguidos do número correspondente à ordem em que foram mapeados. Os loci mapeados no cromossomo X são denominados DFNX (seguidos dos números correspondentes) e o único locus mapeado no cromossomo Y é denominado DFNY1.

1.3. Perda auditiva de herança autossômica recessiva.

A perda auditiva de herança autossômica recessiva corresponde a cerca de 80% dos casos de perda auditiva hereditária do tipo não sindrômica (Estivill e Gasparini,

2008). Geralmente é do tipo estacionária, pré-lingual, neurossensorial, variando de grave a profunda, atingindo todas as frequências (Campbell e col., 1997; Keats e Berlin, 1999). Existem 71 loci mapeados (DFNB) e 45 genes identificados (Tabela 1.1).

Dentre todos os loci mapeados e genes identificados, o locus DFNB1, no qual se localiza o gene da conexina 26 (*GJB2*), é o mais importante, uma vez que mutações nesse gene correspondem a mais de 50% dos casos de perda auditiva de herança autossômica recessiva. Em 75% dos casos de mutação no gene *GJB2* está presente a mutação c.35delG (Denoyelle e col., 1997; Wilcox e col., 1999; Sundstrom e col., 1999). A frequência de heterozigotos com a mutação c.35delG na população brasileira ouvinte foi estimada em 1% (Sartorato e col., 2000).

Existem outros loci que também são frequentemente encontrados como mutados em muitas famílias com perda auditiva de herança autossômica recessiva e, portanto, são os loci pesquisados com maior frequência nos estudos moleculares de perda auditiva. São eles: DFNB4 (gene *SLC26A4*), DFNB9 (gene *OTOF*), DFNB12 (gene *CDH23*), DFNB7 (gene *TMC1*), DFNB8 (gene *TMPRSS3*) e DFNB3 (gene *MYO15A*).

O gene *SLITRK6* foi relacionado a perda auditiva tanto em humanos quanto em camundongos (Mustafa e col., 2013). No entanto ainda não foi designado um DFNB para esse gene.

Tabela 1.1: Locus mapeados responsáveis pela perda auditiva hereditária autossômica recessiva (modificada de Van Camp e col., 2013).

| Locus | Localização cromossômica | Gene | Referências Bibliográficas |
|--------------|--------------------------|-------------------|--|
| DFNB1 | 13q12 | <i>GJB2, GJB6</i> | Guilford e col., 1994; Kelsell e col., 1997 |
| DFNB2 | 11q13.5 | <i>MYO7A</i> | Guilford e col., 1994; Liu e col., 1997; Weil e col., 1997 |
| DFNB3 | 17p11.2 | <i>MYO15A</i> | Friedman e col., 1995; Wang e col., 1998 |
| DFNB4 | 7q31 | <i>SLC26A4</i> | Baldwin e col., 1995; Li e col., 1998 |
| DFNB5 | 14q12 | ? | Fukushima e col., 1995 |
| DFNB6 | 3p14-p21 | <i>TMIE</i> | Fukushima e col., 1995; Naz et al, 2002 |
| DFNB7/DFNB11 | 9q13-q21 | <i>TMC1</i> | Jain e col., 1995; Scott e col., 1996; Kurima e col., 2002 |
| DFNB8/DFNB10 | 21q22 | <i>TMPRSS3</i> | Veske e col., 1996; Bonn -Tamir e col., 1996; Scott e col., 2001 |
| DFNB9 | 2p22-p23 | <i>OTOF</i> | Chaib e col., 1996; Yasunaga e col., 1999 |
| DFNB12 | 10q21-q22 | <i>CDH23</i> | Chaib e col., 1996; Bork e col., 2001 |
| DFNB13 | 7q34-36 | ? | Mustapha e col., 1998 |
| DFNB14 | 7q31 | ? | Mustapha e col., 1998 |
| DFNB15 | 3q21-q25 19q13 | <i>GIPC3</i> | Chen e col., 1997; Charizopoulou e col., 2011 |
| DFNB16 | 15q21-q22 | <i>STRC</i> | Campbell e col., 1997; Verpy e col., 2001 |
| DFNB17 | 7q31 | ? | Greinwald e col., 1998 |
| DFNB18 | 11p14-15.1 | <i>USH1C</i> | Jain e col., 1998; Ouyang e col., 2002; Ahmed e col., 2002 |
| DFNB19 | 18p11 | ? | Green e col., 1998. |
| DFNB20 | 11q25-qter | ? | Moynihan e col., 1999 |
| DFNB21 | 11q | <i>TECTA</i> | Mustapha e col., 1999 |
| DFNB22 | 16p12.2 | <i>OTOA</i> | Zwaenepoel e col., 2002 |
| DFNB23 | 10p11.2-q21 | <i>PCDH15</i> | Ahmed e col., 2003 |
| DFNB24 | 11q23 | <i>RDX</i> | Khan e col., 2007 |
| DFNB25 | 4p13 | <i>GRXCRI</i> | Schraders e col., 2010 |
| DFNB26 | 4q31 | ? | Riazuddin e col., 2000 |
| DFNB27 | 2q23-q31 | ? | Pulley e col., 2000 |
| DFNB28 | 22q13 | <i>TRIOBP</i> | Walsh e col., 2000; Shahin e col., 2006; Riazuddin e col., 2006 |

| | | | |
|---------------|---------------------|---------------------|---|
| DFNB29 | 21q22 | <i>CLDN14</i> | Wilcox e col., 2001 |
| DFNB30 | 10p11.1 | <i>MYO3A</i> | Walsh e col., 2002 |
| DFNB31 | 9q32-34 | <i>WHRN</i> | Mustapha e col., 2002; Mburu e col., 2003 |
| DFNB32/DFNB82 | 1p13.3-22.1 | <i>GPSM2</i> | Masmoudi e col., 2003; Walsh e col., 2010 |
| DFNB33 | 9q34.3 | ? | Medlej-Hashim e col., 2002 |
| DFNB35 | 14q24.1-24.3 | <i>ESRRB</i> | Ansar e col., 2003; Collin e col., 2008 |
| DFNB36 | 1p36.3 | <i>ESPN</i> | Naz e col., 2004 |
| DFNB37 | 6q13 | <i>MYO6</i> | Ahmed e col., 2003 |
| DFNB38 | 6q26-q27 | ? | Ansar e col., 2003 |
| DFNB39 | 7q21.1 | <i>HGF</i> | Schultz e col., 2009 |
| DFNB40 | 22q | ? | Delmaghani e col., 2003 |
| DFNB42 | 3q13.31-q22.3 | <i>ILDR</i> | Aslam e col., 2005; Borck e col., 2011 |
| DFNB44 | 7p14.1-q11.22 | ? | Ansar e col., 2004 |
| DFNB45 | 1q43-q44 | ? | Bhatti e col., 2008 |
| DFNB46 | 18p11.32- p11.31 | ? | Mir e col., 2005 |
| DFNB47/DFNB83 | 2p25.1-p24.3 | ? | Hassan e col., 2005 |
| DFNB48 | 15q23-25.1 | ? | Ahmad e col., 2005 |
| DFNB49 | 5q12.3-q14.1 | <i>MARVELD2</i> | Ramzan e col., 2004; Riazuddin e col., 2006 |
| DFNB51 | 11p13-p12 | ? | Shaikh e col., 2005 |
| DFNB53 | 6p21.3 | <i>COL11A2</i> | Chen e col., 2005 |
| DFNB55 | 4q12-q13.2 | ? | Irshad e col., 2005 |
| DFNB59 | 2q31.1-q31.3 | <i>PJVK</i> | Delmaghani e col., 2006 |
| DFNB61 | 7q22.1 | <i>SLC26A5</i> | Liu e col., 2003 |
| DFNB62 | 12p13.2-p11.23 | ? | Ali e col., 2006 |
| DFNB63 | 11q13.2-q13.4 | <i>LRTOMT/COMT2</i> | Du e col., 2008; Ahmed e col., 2008 |
| DFNB65 | 20q13.2-q13.32 | ? | Tariq e col., 2006 |
| DFNB66/DFNB67 | 6p21.2-22.3 | <i>LHFPL5</i> | Tili e col., 2005; Shabbir e col., 2006; Kalay e col., 2006 |
| DFNB68 | 19p13.2 | ? | Santos e col., 2006 |

Continuação da tabela 1.1.

| | | | |
|--------|---------------------|---------------------|--|
| DFNB71 | 8p22-21.3 | ? | Chishti e col., 2009 |
| DFNB72 | 19p13.3 | <i>GIPC3</i> | Ain e col., 2007; Rehman e col., 2011 |
| DFNB73 | 1p32.3 | <i>BSND</i> | Riazuddin e col., 2009 |
| DFNB74 | 12q14.2-q15 | <i>MSRB3</i> | Waryah e col., 2009; Ahmed e col., 2011 |
| DFNB77 | 18q12-q21 | <i>LOXHD1</i> | Grillet e col., 2009 |
| DFNB79 | 9q34.3 | <i>TPRN</i> | Rehman e col., 2010 |
| DFNB81 | 19p | ? | Rehman e col., 2011 |
| DFNB84 | 12q21.2 | <i>PTPRQ, OTOGL</i> | Schraders e col., 2010; Yariz e col., 2012 |
| DFNB85 | 17p12-q11.2 | ? | Shahin e col., 2010 |
| DFNB89 | 16q21-q23.2 | <i>KARS</i> | Santos-Cortez e col., 2013 |
| DFNB91 | 6p25 | <i>SERPIN6</i> | Sirmaci e col., 2010 |
| DFNB93 | 11q12.3- 11q13.2 | ? | Tabatabaiefar e col., 2011 |
| DFNB95 | 19p13 | <i>GIPC3</i> | Charizopoulou e col., 2011 |
| DFNB96 | 1p36.31-p36.13 | ? | Ansar e col., 2011 |
| DFNB98 | 21q22,3-1ter | <i>TSPEAR</i> | Delmaghani e col., 2012 |

Continuação da tabela 1.1.

1.4. Perdas auditivas de herança ligada ao cromossomo X

Correspondem a cerca de 2 a 3% dos casos de perda auditiva hereditária (Van Camp e col., 1997). Já foram mapeados cinco loci e identificados três genes, até o momento (Tabela 1.2).

O locus mais frequentemente associado aos casos de perda auditiva de herança ligada ao cromossomo X é o locus DFNB3, onde se localiza o gene *POU3F4*. Esse gene codifica um fator de transcrição (Willens, 2000). Esse tipo de deficiência é classificada como mista, pois pode ocorrer a fixação do estribo. A maior importância da prévia identificação de mutações nesse gene é o fato de que nesses pacientes ocorre vazamento da perilinfa quando se executa a retirada do estribo (estapedectomia), um processo cirúrgico simples e muito utilizado em casos onde a deficiência é decorrente de problemas no sistema de ossículos.

Tabela 1.2: Locus mapeados responsáveis pela perda auditiva hereditária ligada ao cromossomo X (modificada de Van Camp e col., 2012).

| Locus | Localização Cromossômica | Gene | Referências Bibliográficas |
|-------|--------------------------|---------------|---|
| DFNX1 | Xq22 | <i>PRPS1</i> | Tyson e col., 1996; Liu e col., 2010 |
| DFNX2 | Xq21.1 | <i>POU3F4</i> | Brunner e col., 1988; De Kok e col., 1995 |
| DFNX3 | Xq21.2 | ? | Lalwani e col., 1994 |
| DFNX4 | Xq22 | <i>SMPX</i> | del Castillo e col., 1996; Huebner e col., 2011 |
| DFNX5 | Xq23-q27.3 | ? | Wang e col., 2006 |

1.5. Perda auditiva de herança ligada ao cromossomo Y

Foi realizado um estudo em uma grande família de origem chinesa com perda auditiva e foi observado que a perda auditiva nessa família era transmitida somente por meio de indivíduos do sexo masculino. O estudo de mapeamento através de microssatélites não encontrou sugestão de ligação com nenhum dos 22 autossomos. Foi sugerido, por conta do mecanismo de transmissão, que o padrão de herança dessa família fosse ligado ao cromossomo Y (Wang e col., 2004), mas o gene nunca foi identificado.

1.6. Perda auditiva de herança mitocondrial

A perda auditiva de herança mitocondrial pode ser encontrada tanto associada a síndromes como isolada. Na maioria dos casos, a perda auditiva de herança mitocondrial ocorre como um sintoma adicional em síndromes causadas por defeitos na mitocôndria. É muito comum que uma única mutação em gene mitocondrial cause vários fenótipos distintos.

Mesmo nos casos das mutações que causam deficiência não síndrômica são ocasionalmente encontrados outros sinais associados à perda auditiva. Os principais genes e mutações relacionados à surdez mitocondrial não síndrômica estão apresentadas na tabela 1.3.

Prezant e col. (1993) identificaram uma mutação mitocondrial que causava susceptibilidade à perda auditiva após administração de antibióticos do tipo aminoglicosídeos. Essa mutação estava associada também à perda auditiva dos

Tabela 1.3: Mutações mitocondriais responsáveis por perda auditiva de herança mitocondrial do tipo não síndrômica (modificada de Van Camp e col., 2012).

| Gene | Mutação | Referência Bibliográfica |
|---------------|---------------------------|---|
| <i>MTRNR1</i> | m.1555A>G | Prezant e col., 1993; Usami e col., 1997; Estivill e col., 1998 |
| <i>MTRNR1</i> | m.1494C>T | Zhao e col., 2004 |
| <i>MTRNR1</i> | 961 (diferentes mutações) | Bacino e col., 1995; Casano e col., 1999 |
| <i>MTTS1</i> | m.7445A>G | Reid e col., 1994; Fischel-Ghodsian e col., 1995; Sevier e col., 1998 |
| <i>MTTS1</i> | m.7472insC | Tiranti e col., 1995; Jaksch e col., 1998a; Jaksch e col., 1998b; Schuelke e col., 1998; Verhoeven e col., 1999 |
| <i>MTTS1</i> | m.7510T>C | Hutchin e col., 2000 |
| <i>MTTS1</i> | m.7511T>C | Friedman e col., 1999; Sue e col., 1999 |

indivíduos da mesma família que não tinham sido expostos ao antibiótico. A mutação identificada foi a m.1555A>G, presente no gene *MTRNR1* que codifica a unidade 12S do ribossomo mitocondrial. As demais mutações do gene *MTRNR1* também estão relacionadas a possível ototoxicidade mediante administração de aminoglicosídeos

Foi realizada uma pesquisa por Abreu-Silva e col. (2006), em amostras do nosso laboratório, que indicou que cerca de 2% dos casos de perda auditiva hereditária eram devidos a mutações mitocondriais. Essa mutação também foi encontrada em muitos países (Prezant e col., 1993; Hutchin e col., 1993; Pandya e col., 1997; Gardner e col., 1997; Fischel-Ghodsian e col., 1997; El-Schahawi e col., 1997; Casano e col., 1998; Estivill e col., 1998). Os achados desse estudo mostraram que a mutação m.1555A>G é frequente na população brasileira, indicando a sua triagem em indivíduos com perda auditiva como recomendada. Essa triagem é muito importante, pois o conhecimento prévio da presença da mutação pode evitar a administração de aminoglicosídeos, evitando ou protelando, assim, o início da perda auditiva.

Outro gene mitocondrial importante, com diferentes mutações que levam à perda auditiva não síndrômica, é o *MTTS1*, com quatro mutações identificadas. A mutação m.7445A>G do gene *MTTS1* pode estar associada com queratoderma palmoplantar e a mutação 7472insC do mesmo gene está associada com disfunções neurológicas, incluindo ataxia, disartria e mioclonus (Kokotas e col., 2007).

1.7. Genes modificadores da perda auditiva hereditária

A perda auditiva é uma característica que apresenta grande diversidade de fenótipos entre os indivíduos, mesmo dentro de uma mesma família. Essa grande diferença de fenótipos pode ser causada por fatores ambientais ou pela interação entre produtos de diferentes genes.

Riazuddin e col., (2000) mapearam uma forma de perda auditiva não sindrômica de herança recessiva em uma família paquistanesa com consanguinidade. O locus mapeado foi o DFNB26, no qual oito indivíduos afetados dessa família apresentavam um haplótipo em homozigose. Entretanto, em sete indivíduos ouvintes, foi encontrado o mesmo haplótipo em homozigose e, por isso, foram considerados não penetrantes. Riazuddin e col., (2000) mapearam, então, um locus dominante, chamado DFNM1, em outro cromossomo, que impedia o desenvolvimento da perda auditiva nesses sete indivíduos normais.

Bykhovskaya e col., (2000) realizaram um grande estudo com famílias espanholas e italianas que sofriam de perda auditiva de herança mitocondrial do tipo neurossensorial. Foram estudados 35 indivíduos que possuíam a mutação m.1555A>G. Os estudos de mapeamento encontraram ligação do marcador D8S277 com uma região a conter um provável gene modificador. Esse foi o primeiro locus nuclear sugerido como modificador de uma condição de herança mitocondrial, mas o gene suposto nunca foi encontrado.

1.8. Perda auditiva de herança autossômica dominante

Aproximadamente 10 a 20% dos casos de perda auditiva hereditária são de herança autossômica dominante do tipo não sindrômica (Guilford e col., 1994). Já foram mapeados 55 loci e identificados 29 genes (Tabela 1.4). As perdas auditivas com este tipo de herança são na maioria pós-linguais, progressivas e neurossensoriais (Van Laer e col., 1999).

Não existe um locus ou gene predominante no que se refere à perda auditiva de herança autossômica dominante, como ocorre na perda auditiva de herança autossômica recessiva. Por isso, o estudo molecular e a triagem das mutações nas

famílias em que ocorre esse mecanismo são muito difíceis, especialmente em famílias pequenas.

Os genes já identificados como responsáveis por perda auditiva não sindrômica autossômica dominante codificam proteínas com funções diversas relacionadas com citocinese e polimerização de actina (*HDIA1*), junções do tipo “fenda” (*GJB2*, *GJB3*, *GJB6*), canais iônicos (*KCNQ4*), matriz extracelular (*COCH* e *TECTA*), colágenos (*COL11A2*), fatores de transcrição (*POU4F3*, *EYA4* e *TFCP2L3*), miosinas não convencionais (*MYO7A*, *MYH9*, *MYO6* e *MYO1A*), proteína da família das caderinas com função não conhecida (*DFNA5*), proteínas transmembrânicas (*TMC1*, *WFS1*) e actinas (*ACTG1*). Esses genes e as funções de seus produtos estão resumidos na Tabela 1.5.

1.9. Estratégias de Mapeamento de genes de surdez

Nos últimos tempos, a metodologia favorita empregada para mapear e identificar genes responsáveis por surdez e a com mais sucesso foi a baseada na clonagem posicional. Nessa metodologia são utilizados principalmente os estudos de ligação e os pontos de quebra de rearranjos cromossômicos para identificar a posição dos genes nos cromossomos. Na clonagem posicional clássica, um determinado gene é identificado primeiramente através da descoberta da sua localização cromossômica. A primeira vez que essa metodologia foi empregada com sucesso foi na identificação do gene responsável pela distrofia muscular de Duchenne (DMD; *OMIM* #310200).

Tabela 1.4: Lócus mapeados como responsáveis por perda auditiva hereditária não sindrômica autossômica dominante (modificado de Van Camp e Smith, 2013).

| Lócus | Localização Cromossômica | Gene | Referências Bibliográficas |
|---------------------|---------------------------------|------------------------|---|
| DFNA1 | 5q31 | <i>HDIA1</i> | Leon e col., 1992; Lynch e col., 1997 |
| DFNA2 | 1p35.1 1p34 | <i>GJB3, KCNQ4</i> | Coucke e col., 1994; Kubish e col., 1999 |
| DFNA3 | 13q11-q12 13q12 | <i>GJB2, GJB6</i> | Chaib e col., 1994; Denoyelle e col., 1998; Grifa e col., 1999 |
| DFNA4 | 19q13 | <i>MYH14, CEACAM16</i> | Chen e col., 1997; Donaudy e col., 2004; Zheng e col., 2011 |
| DFNA5 | 7p15 | <i>DFNA5</i> | Van Camp e col., 1995; Van Laer e col., 1998 |
| DFNA6/DFNA14/DFNA38 | 4p16.3 | <i>WFS1</i> | Lesperance e col., 1995; Van Camp e col., 1999; Bepalova e col., 2001; Young e col., 2001 |
| DFNA7 | 1q21-q23 | ? | Fagerheim e col., 1996 |
| DFNA8 / DFNA12 | 1q22-24 | <i>TECTA</i> | Verhoeven e col., 1997; Verhoeven e col., 1998 |
| DFNA9 | 14q12-q13 | <i>COCH</i> | Manolis e col., 1996; Robertson e col., 1998 |
| DFNA10 | 6q22-q23 | <i>EYA4</i> | O'Neill e col., 1996; Wayne e col., 2001 |
| DFNA11 | 11q12.3-q21 | <i>MYO7A</i> | Tamagawa e col., 1996; Liu e col., 1997 |
| DFNA13 | 6p21 | <i>COL11A2</i> | Brown e col., 1997; Kunst e col., 2000* |
| DFNA15 | 5q31 | <i>POU4F3</i> | Vahava e col., 1998 |
| DFNA16 | 2q24 | ? | Fukushima e col., 1999 |
| DFNA17 | 22q | <i>MYH9</i> | Lawani e col., 1999; Lawani e col., 2000 |
| DFNA18 | 3q22 | ? | Bonsch e col. 2001 |
| DFNA19 | 10 (pericentr.) | ? | Hereditary Hearing Loss Home Page |
| DFNA20/DFNA26 | 17q25 | <i>ACTG1</i> | Morell e col. 2000; Kemperman e col., 2004; Yang e Smith 2000 |
| DFNA21 | 6p21 | ? | Kunst e col., 2000b |
| DFNA22 | 6q13 | <i>MYO6</i> | Melchionda e col., 2001 |
| DFNA23 | 14q21-q22 | ? | Salam e col., 2000 |
| DFNA24 | 4q | ? | Hafner e col., 2000 |
| DFNA25 | 12q21-24 | <i>SLC17A8</i> | Greene e col., 1999; Ruel e col., 2008 |
| DFNA27 | 4q12 | ? | Fridell e col., 1999 |
| DFNA28 | 8q22 | <i>GRHL2</i> | Anderson e col., 1999; Peters e col., 2002 |
| DFNA30 | 15q25-26 | ? | Mangino e col., 2001 |
| DFNA31 | 6p21.3 | ? | Anderson e col., 1999; Snoeckx e col., 2004 |
| DFNA32 | 11p15 | ? | Li e col., 2000 |
| DFNA33 | 13q34-qter | ? | Bonsch e col., 2009 |
| DFNA36 | 9q13-q21 | <i>TMCI</i> | Mangino e col., 2001; kurima e col., 2002 |
| DFNA39 | 4q21.3 | <i>DSPP</i> | Kurima e col., 2000, Xiao e col., 2001 |
| DFNA41 | 12q24-qter | ? | Blanton e col., 2002 |
| DFNA42 | 5q31.1-q32 | ? | Talebizadeh e col., 2000; Xia e col., 2002 |
| DFNA43 | 2p12 | ? | Xiao e col., 2001; Flex e col., 2003 |
| DFNA44 | 3q28-29 | <i>CCDC50</i> | Modamio-Hoybjore col., 2003; Modamio-Hoybjore e col., 2007 |

| | | | |
|--------|-----------------------|--------------------|--|
| DFNA47 | 9p21-22 | ? | D'Adamo e col., 2003 |
| DFNA48 | 12q13-q14 | <i>MYO1A</i> | Flex e col., 2003, Donaudy e col., 2007 |
| DFNA49 | 1q21-q23 | ? | Modamio-Hoybjor e col., 2003 |
| DFNA50 | 7q32.2 | <i>MIRN96</i> | D'Adamo e col., 2003a; Mencia e col., 2009 |
| DFNA51 | 9q21 | <i>TJP2</i> | D'Adamo e col., 2003b; Walsh e col., 2010 |
| DFNA52 | 4q28 | ? | Xia e col., 2002; Moreno-Pelayo e col., 2004 |
| DFNA53 | 14q11.2-q12 | ? | Talebizadeh e col., 2000; Yan e col., 2005 |
| DFNA54 | 5q31 | ? | Modamio-Hoybjor e col., 2004; Gurtler e col., 2004 |
| DFNA56 | 9q31,3-34,3 | <i>TNC</i> | Zhao e col., 2013 |
| DFNA57 | 19p13.2 | ? | Bonsch e col., 2008 |
| DFNA58 | 2p12-p21 | ? | Lezirovitz e col., 2009 |
| DFNA59 | 11p14.2-q12.3 | ? | Chatterjee e col., 2009 |
| DFNA60 | 2q21.3-q24.1 | ? | Liu e col., 2007 |
| DFNA64 | 12q24.31- 12q24.32 | <i>SMAC/DIABLO</i> | Cheng e col., 2011 |

Continuação da tabela 1.4.

Tabela 1.5: Genes identificados responsáveis por perda auditiva autossômica dominante não sindrômica, suas funções e efeitos das mutações identificadas.

| Lócus | Gene | Produto | Função | Consequência | Referências |
|---------------------------------|---------------|--|--|---|--|
| | <i>CRYM</i> | <i>Crystallin, MU.</i> | Se liga ao hormônio da tireoide T3 | Disfunção auditiva através da perda da capacidade de ligação com o hormônio T3. | Abe e col., 2003 |
| DFNA1 | <i>DIAPH1</i> | <i>Diaphanous 1.</i> | Polimerização das fibras de actina nas células ciliadas da cóclea. | Malformação do citoesqueleto de actina. | Lynch e col., 1997 |
| DFNA2A | <i>KCNQ4</i> | <i>Potassium channel, voltage-gated, kqt-like subfamily, member 4.</i> | Formação de canais de potássio. | Desequilíbrio da homeostase iônica. | Kubisch e col., 1999 |
| DFNA2B | <i>GJB3</i> | <i>Connexin 31.</i> | Junções GAP | Falha na comunicação entre células. | Xia e col., 1998 |
| DFNA3A | <i>GJB2</i> | <i>Connexin 26.</i> | Junções GAP | Falha na comunicação entre células. | Kelsell e col., 1997 |
| DFNA3B | <i>GJB6</i> | <i>Connexin 30.</i> | Junções GAP | Falha na comunicação entre células. | Grifa e col., 1999 |
| DFNA4 | <i>MYH14</i> | <i>Myosin heavy chain 14.</i> | Interações com citoesqueleto, regulando citocinese, mobilidade e polaridade celular. | Malformação dos estereocílios. | Donaudy e col., 2004 |
| DFNA5 | <i>DFNA5</i> | <i>DFNA5.</i> | ? | ? | Van Laer e col., 1998 |
| DFNA6/DFNA14/ DFNA38 | <i>WFS1</i> | <i>WFS1.</i> | Formação de canais iônicos | Desequilíbrio da homeostase iônica. | Bespalova e col., 2001; Ypoung e col., 2001 |

| | | | | | |
|----------------------|----------------|---|---|--|---|
| DFNA8/DFNA12 | <i>TECTA</i> | <i>Tectorin, Alpha.</i> | Componente da membrana tectória. | Falha da transmissão de estímulos sonoros a serem convertidos em sinais elétricos. | Verhoeven e col., 1998. |
| DFNA9 | <i>COCH</i> | <i>Cochlin.</i> | Depósito de mucopolissacarídeos. | Malformação da matriz extracelular. | Robertson e col., 1998 |
| DFNA10 | <i>EYA4</i> | <i>Eyes absent 4.</i> | Associação com proteínas diversas e estimula a resposta do sistema imune. | Falha no desenvolvimento do Órgão de Corti. | Wayne e col., 2001 |
| DFNA11 | <i>MYO7A</i> | <i>Myosin VIIA</i> | Mobilidade do estereocílio. | Malformação das células ciliadas. | Liu e col., 1997 |
| DFNA13 | <i>COL11A2</i> | <i>Collagen, Type XI, Alpha-2.</i> | Componente da membrana tectória. | Falha da transmissão de estímulos sonoros a serem convertidos em sinais elétricos. | McGuirt e col., 1999 |
| DFNA15 | <i>POU4F3</i> | <i>Pou domain, Class 4, Transcription Factor 3.</i> | Interação com a proteína Gfi1. | Degeneração das células ciliadas. | Vahava e col., 1998. |
| DFNA17 | <i>MYH9</i> | <i>Myosin, Heavy chain 9.</i> | Mobilidade celular. | Desorganização das redes de actina. | Lalwani e col., 2000 |
| DFNA20/DFNA26 | <i>ACTG1</i> | <i>Actin, Gamma-1.</i> | Componente do citoesqueleto. | Desorganização de várias estruturas cocleares. | Zhu e col., 2003; van Wijk e col., 2003 |
| DFNA21 | <i>TJP2</i> | <i>Tight junction protein 2.</i> | Organização de junções intercelulares. | Leva à morte celular programada (apoptose). | Walsh e col., 2010. |
| DFNA22 | <i>MYO6</i> | <i>Myosin VI</i> | Mobilidade celular. | Falha no transporte de substâncias intra celulares para as células ciliadas. | Melchionda e col., 2001 |
| DFNA28 | <i>GRHL2</i> | <i>Grainyhead-like 2.</i> | ? | ? | Peters e col., 2002 |
| DFNA36 | <i>TMC1</i> | <i>Transmembrane channel0like protein 1.</i> | Proteína transmembrânica. | Malfuncionamento das células ciliadas. | Kurima e col., 2002. |

Continuação da tabela 1.5.

| | | | | | |
|---------------|--------------------|--|------------------------------------|--|------------------------------|
| DFNA44 | <i>CCDC50</i> | <i>Coiled-coil domain-containing protein 50.</i> | Desenvolvimento da orelha interna. | Malformação da orelha interna. | Modamio-Hoybjor e col., 2007 |
| DFNA48 | <i>MYO1A</i> | <i>Myosin IA</i> | Mobilidade celular. | Perda da capacidade motora. | Donaudy e col., 2003 |
| DFNA50 | <i>MIRN96</i> | <i>MicroRNA</i> | Estabiliza a tradução de mRNAs. | Altera a capacidade de manter a expressão gênica das células ciliadas. | Mencia e col., 2009 |
| DFNA56 | <i>TNC</i> | <i>Tenascin C</i> | Proteína da matriz extracelular | Altera o desenvolvimento correto da cóclea. | Zhao e col., 2013 |
| DFNA64 | <i>SMAC/SIABLO</i> | <i>Direct IAP-binding protein with low pI.</i> | Regulação da apoptose. | Leva à morte celular programada. | Cheng e col., 2011 |

Continuação da tabela 1.5.

Esse tipo de estudo necessita de famílias com muitos indivíduos afetados e fenotipicamente normais. Inicialmente o estudo da família visa identificar uma determinada região candidata a conter o gene através de estudos de segregação com marcadores moleculares do tipo microssatélites ou SNPs, para a obtenção dos haplótipos que segregam com a doença em cada membro da família estudada. Cálculos estatísticos são realizados com a finalidade de determinar se a ligação do haplótipo com o fenótipo é significativa. Nesse caso, o cálculo utilizado é o *Lod Score*, que é o logaritmo decimal de uma razão de duas probabilidades: a do padrão observado na família ocorrer sob hipótese de ligação do gene com um marcador e a desse mesmo padrão ocorrer sob hipótese de segregação independente, com uma taxa de recombinação de 1/2. Por convenção, um valor de *Lod* superior a +3,00 é aceito como evidência de ligação estatisticamente significativa. Esse valor significa que a probabilidade do marcador genético estar ligado ao locus do fenótipo é 1000 vezes maior do que a probabilidade de ocorrer segregação independente entre eles. *Lod Scores* iguais ou inferiores a -2,00 são considerados indicativos de exclusão de ligação. Os estudos de mapeamento de genes com cálculos de *Lod* que incluem resultados de genotipagem de milhares de marcadores genético são um desafio para definir quais as melhores estratégias de correção dos limiares descritos acima, por causa da necessidade de realização de testes múltiplos.

Os estudos de ligação apresentam como desafio o fato de que os tamanhos das regiões candidatas mapeadas geralmente são grandes. Após ser definida a região candidata por mapeamento, a segunda etapa realizada é a análise e avaliação dos genes localizados na região mapeada. Atualmente, há vários navegadores genômicos que auxiliam nos estudos dos genes candidatos e de suas funções (<http://www.ensembl.org/>, <http://genome.ucsc.edu/>, <http://bioviz.org/igb/>, dentre outros).

Outra metodologia frequentemente utilizada para identificar genes por clonagem posicional é partir de anomalias cromossômicas. Algumas vezes, elas não somente

indicam a região candidata, como podem apontar diretamente o gene responsável pelo fenótipo, caso seja possível identificar com precisão os pontos de quebra.

Algumas alterações cromossômicas podem parecer equilibradas por técnicas cromossômicas convencionais, mas, na verdade, elas não estão equilibradas ao nível molecular. Nesses casos, a perda de bases pode não ser visualizada por estratégias de microscopia, sendo essas alterações submicroscópicas. Foi o caso do mapeamento do gene responsável pela síndrome brânquio-otorrenal (BOR; *OMIM#113650*; Abdelhak e col., 1997), identificado em um paciente que apresentava uma deleção. Para identificar microdeleções e microduplicações cromossômicas as técnicas de hibridação genômica comparativa são muito úteis (*Array-CGH, array-comparative genomic hybridization*; Vissers e col., 2003).

1.10. Estratégias de sequenciamento de genes.

Desde o desenvolvimento das primeiras técnicas de sequenciamento, o aumento da capacidade e da velocidade de sequenciar genes trouxe uma enorme contribuição para a ciência da genética. Entretanto, as técnicas eram inicialmente caras e o processo para sequenciar muitos genes era demorado e laborioso (Moorthie e col., 2011), especialmente quando se utilizavam as técnicas convencionais.

Nos últimos anos, a necessidade de se utilizar técnicas de sequenciamento de genes para rotinas laboratoriais impulsionou cada vez mais o desenvolvimento de novas plataformas de sequenciamento, acompanhadas de tecnologias de apoio relacionadas à análise dos dados. Estes métodos reduziram os custos de sequenciamento do genoma humano inteiro, tornando possível o uso dessas metodologias na pesquisa e na rotina laboratorial (Moorthie e col., 2011).

Os métodos de sequenciamento de DNA foram categorizados em três gerações (Pettersen e col., 2009):

A primeira geração de sequenciamento de DNA foi a padronizada por Sanger e col. (1977), predominante desde a década de 70. Tal metodologia se caracteriza pelo fato de que cada reação de sequenciamento visa um único alvo pré-definido isoladamente, o que torna a tarefa de sequenciar todo o genoma trabalhosa e cara.

Os princípios básicos do sequenciamento do DNA se mantêm constantes desde o popular método descrito por Sanger. Desde então, algumas modificações foram feitas, como por exemplo, o uso de marcadores fluorescentes de cores diferentes para cada base, ao invés de isótopos radioativos (Smith *e col.*, 1986) e a substituição da eletroforese em gel pela eletroforese automática em capilar (Luckey *e col.*, 1990). No entanto, apesar dessas técnicas terem representado a era de ouro do diagnóstico clínico e do sequenciamento do genoma humano, tais metodologias ainda são muito trabalhosas (Moorthie *e col.*, 2011).

A segunda ou nova geração de sequenciamento se baseia no “sequenciamento massivo em paralelo” ou “*Massive Parallel Sequencing*”. Ela possui uma capacidade de produzir pelo menos 100 vezes mais informação se comparada às técnicas convencionais de sequenciamento baseadas no método de Sanger nos aparelhos mais modernos (Shekhar *e col.*, 2011). O DNA a ser sequenciado é fragmentado e inserido em uma placa de *array* onde cada espaço identificável contém uma sonda que se une a somente um fragmento do DNA a ser sequenciado. Dependendo da tecnologia utilizada, um único *array* de sequenciamento pode conter milhões ou bilhões de espaços identificáveis que amplificam e posteriormente sequenciam os fragmentos gerados, que se ligam as sondas presentes em cada espaço. São obtidas várias sequências, geralmente curtas, para cada fragmento (*sequence reads*). Ferramentas computacionais alinham cada *sequence read* com um genoma de referência, montando a sequência de DNA completa do indivíduo. Portanto, uma cobertura ampla e múltipla é necessária para se analisar completamente e com uma maior segurança a sequência completa da amostra (Moorthie *e col.*, 2011).

Desde o surgimento das metodologias de sequenciamento chamadas de “nova geração” ou segunda geração, três métodos são os mais utilizados até os dias atuais (Moorthie *e col.*, 2011).

Um dos métodos é chamado de terminação reversível e é empregado na plataforma Illumina (Illumina INC., San Diego, CA, USA). Outro método é o chamado de pirosequenciamento e é empregado na plataforma Roche 454 (454 Life

Sciences, Brandford, CT, USA) e o último método é chamado de sequenciamento por ligação e é empregado na plataforma ABI SOLID (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA).

Outra geração de sequenciamento, a chamada “terceira geração” ainda está em fase de testes. Apesar de existirem algumas plataformas em uso, sua utilização ainda não é muito confiável. Essas técnicas são denominadas de “sequenciamentos novos de nova geração”. Essas tecnologias se baseiam no sequenciamento em tempo real de moléculas de DNA sem a necessidade de *amplicons* para que ocorram (Moorthie e col., 2011). Com a manipulação de substâncias em nanoescala e o mínimo uso de compostos bioquímicos, o sequenciamento ocorre, então, a partir de uma simples molécula de DNA, sem a necessidade de essa molécula ser submetida a uma prévia amplificação via PCR (Shekhar e col., 2011).

1.11. Contribuição do sequenciamento de nova geração à identificação de genes de perda auditiva.

Doenças monogênicas e doenças genéticas multifatoriais foram, por muito tempo, estudadas por estudos de ligação e de associação, seguidas de técnicas de sequenciamento baseadas no método de Sanger para a identificação dos genes responsáveis pelos fenótipos. Mesmo com inúmeros laboratórios empenhados em identificar novos genes relacionados à perda auditiva, após vinte anos de pesquisas, menos da metade dos genes nos loci já mapeados de surdez foram identificados.

Atualmente, as técnicas conhecidas como “sequenciamento de nova geração” tendem a substituir as técnicas de sequenciamento convencionais, devido à complexidade do sistema auditivo e da enorme heterogeneidade genética encontrada na perda auditiva. O sequenciamento de nova geração permite a análise de um grande número de genes candidatos de uma só vez. Além do mais, esses conjuntos de técnicas não necessitam obrigatoriamente de amostras de DNA de muitos indivíduos das grandes famílias de afetados, como é necessário nos estudos de ligação (Brownstein e col., 2012).

Rehman e col. (2010) foram os primeiros a utilizar as técnicas de sequenciamento de nova geração para a identificação de um gene relacionado à perda

auditiva em uma região previamente mapeada e refinada, por mapeamento por ligação com base em SNPs. O locus responsável pela doença havia sido mapeado em uma região de 2,9Mb, que contém 108 genes codificadores de proteínas, na região cromossômica 9q43.3. Foi utilizado um *kit* de enriquecimento desenhado para sequenciar toda essa região mapeada. Oito variantes foram selecionadas para serem validadas por sequenciamento baseado no método de Sanger. Uma única variante foi confirmada, uma mutação no gene *TPRN*, que codifica a proteína taperina. A variante não foi encontrada em amostras controles adequadas. A proteína taperina possui similaridade com a proteína fostensina, que funciona como uma “capa” na extremidade terminal dos filamentos de actina do citoesqueleto. É sabido que essa proteína participa na modelagem do filamento de actina do citoesqueleto (Shearer e col., 2011).

Em um outro estudo, Brownstein e col. (2011), desenvolveram uma plataforma para sequenciamento e identificação de mutações em 246 genes conhecidos de perda auditiva em probandos com perda auditiva em famílias do Oriente Médio. Diversas mutações foram encontradas nesse estudo, revelando a enorme utilidade clínica desse tipo de análise.

Em uma escala maior, técnicas de sequenciamento de exomas (todos os exons do genoma) são consideradas extremamente promissoras. Estima-se que cerca de 60% dos genes responsáveis por doenças mendelianas possam ser identificados por meio dessas técnicas (Gilissen e col., 2012).

Em associação com as técnicas de “nova geração”, as técnicas clássicas de mapeamento gênico continuam ainda a ser utilizadas para auxiliar na identificação de genes, uma vez que os estudos de ligação fornecem resultados que diminuem a região candidata a conter o gene responsável pela perda auditiva, facilitando muito a filtragem e interpretação dos resultados oriundos das análises de exomas. A combinação dessas técnicas foi utilizada para identificar o gene responsável pela perda auditiva de herança autossômica recessiva no locus DFNB82. Walsh e col. (2010) utilizaram um *kit* de cobertura para sequenciamento de todos os exons no probando

dessa família, em cuja amostra 93% dos genes codificadores de proteínas presentes na região mapeada foram sequenciados. Análises bioinformáticas indicaram 80 variantes em homozigose dentro do intervalo do DFNB82. Dessas variantes, sete não eram descritas, e, dessas, apenas duas alteravam a sequência dos aminoácidos. Uma das variantes foi identificada como um polimorfismo após ser encontrada em vários controles ouvintes enquanto que a outra, uma mutação no gene *GPSM2*, estava ausente nos controles e segregava com o fenótipo na família. O produto desse gene é expresso nas células ciliadas e de suporte da cóclea em desenvolvimento de camundongos, assim como no sáculo, utrículo e na crista da cóclea em camundongos maduros (Walsh e col., 2010).

Em um outro estudo, Zheng e col. (2011) utilizaram o sequenciamento de exoma para encontrar o gene responsável pela perda auditiva em uma família que teve a região previamente mapeada e denominada DFNA4 (Chen e col., 1995). Através de sequenciamento baseado no método de Sanger, foi identificada uma variante em potencial a explicar o quadro no gene *CEACAM16* (Zheng e col., 2011). Para excluir outras possíveis variantes na região do DFNA4, foi realizado sequenciamento de nova geração, onde 98,2% de todos os exons compreendidos na região mapeada foram sequenciados e 70,2% dos genes codificadores de proteínas foram completamente analisados. Das variantes encontradas, muitas eram polimorfismos sem efeito, falsos positivos ou não segregavam com o fenótipo. Assim, o melhor candidato foi o gene *CEACAM16*. O produto desse gene é expresso na cóclea e pode estar envolvido na ligação dos estereocílios com a membrana tectória (Zheng e col., 2011).

Schraders e col. (2011) e Huebner e col. (2011), por meio de sequenciamento de exomas, encontraram uma mutação no gene *SMPX*, mapeado no locus DFNX4, o que levou a indicação desse gene como o candidato mais provável a ser o causador da perda auditiva em uma família holandesa com perda auditiva progressiva ligada ao cromossomo X. Foi utilizado um *kit* para sequenciamento de nova geração específico para o cromossomo X. Foram encontradas duas variantes, sendo uma delas, uma mutação sem sentido localizada no gene *SMPX*, a única a segregar com o fenótipo na

família e estar ausente nos controles. Foi feita uma triagem da mutação em 26 probandos de famílias com perda auditiva ligada ao cromossomo X e foi encontrada essa mutação em uma segunda família, o que confirmou o papel do gene como responsável pela perda auditiva no locus DFNX4. Porém, esse gene inicialmente não foi considerado um candidato muito forte, uma vez que sua proteína atua no músculo estriado. Após diversas análises, foi verificado que esse gene também se expressa na cóclea e seu produto tem um papel no desenvolvimento e/ou manutenção das células ciliadas (Schraders e col., 2011; Huebner e col., 2011).

Delmaghani e col., (2012) estudaram uma família iraniana, com casamentos consanguíneos, afetada por perda auditiva de herança autossômica recessiva. Nesse estudo, foi mapeado um novo locus DFNB98 e identificado um novo gene *TSPEAR*. Foi utilizada previamente uma varredura genômica por SNPs para identificar a região candidata. O sequenciamento de todo o exoma foi realizado em três indivíduos afetados e em um indivíduo normal. Foram identificadas duas variantes (uma deleção e uma substituição de base) no gene *TSPEAR*. Estudos de segregação na família mostraram que essas variantes estão em homozigose nos irmãos afetados e em heterozigose nos pais, bem como ausentes em 152 amostras de controles. Foi realizado, também, o sequenciamento de todos os exons do gene *TSPEAR* em outras famílias iranianas afetadas por perda auditiva. No entanto, não foram identificadas outras variantes no gene que pudessem explicar os fenótipos. O produto do gene *TSPEAR* é expresso em diversos tecidos, incluindo a cóclea. A proteína *Tspear* é encontrada na superfície das células ciliadas internas e externas imaturas da cóclea (Delmaghani e col., 2012).

Zhao e col., (2013) identificaram um novo gene relacionado à perda auditiva de herança autossômica dominante em um novo locus, nomeado DFNA56. Eles estudaram uma família chinesa composta por 70 indivíduos, dos quais 13 afetados por perda auditiva de herança autossômica dominante. Foi realizada uma varredura genômica com 394 microssatélites para delimitar a região candidata. Com o sequenciamento do exoma, foi identificada uma mutação *missense* no exon 19 do gene

TNC. Os estudos da variante mostraram que ela segrega com o fenótipo e está ausente nos indivíduos normais. Para confirmar os resultados, todos os exons do gene foram sequenciados em 587 indivíduos afetados por perda auditiva sem diagnóstico genético e foi identificada uma segunda variante no mesmo exon em outra família chinesa. O produto do gene *TNC* participa na formação da matriz extracelular e é extremamente conservado entre diferentes espécies, sendo expresso na membrana basilar da cóclea (Warchol e Speck, 2007).

Em vista dos resultados até agora revelados pelas técnicas de “sequenciamento de nova geração”, ainda que introduzidas há pouco tempo, podemos prever uma enorme aceleração do ritmo de identificação de genes e mutações relacionados à perda auditiva, o que pode levar a uma melhora considerável do aconselhamento genético. A caracterização das proteínas codificadas por esses novos genes ou o estudo dos efeitos das novas mutações poderão trazer mais luz aos mecanismos biológicos que levam à perda auditiva. Portanto, as técnicas de “sequenciamento de nova geração” permitirão diagnósticos melhores e mais rápidos.

CAPÍTULO 2

OBJETIVOS

O objetivo geral do estudo foi mapear lócus e identificar novas mutações relacionadas à perda auditiva de herança dominante em famílias brasileiras.

Para atingir esse objetivo, realizamos varredura genômica com marcadores moleculares do tipo microssatélites ou do tipo SNPs com o material colhido de cinco famílias com afetados por perda auditiva de herança autossômica dominante, encaminhadas para estudo molecular em nosso serviço. Após o mapeamento das regiões candidatas, estudos de sequenciamento de DNA pelo convencional método de Sanger e de nova geração dos genes candidatos foram realizados para identificar as mutações responsáveis.

CAPÍTULO 3

PACIENTES E MÉTODOS

3.1. Pacientes: Foram os alvos do estudo cinco famílias cujo material foi encaminhado para estudo molecular da perda auditiva ao Laboratório de Genética Humana, do Centro de Estudos do Genoma Humano (CEGH), no Depto. de Genética e Biologia Evolutiva, IBUSP. Parte das famílias foi avaliada no próprio CEGH, mas de algumas famílias tivemos o material enviado para análises moleculares por colaboradores de outras cidades e estados.

A família 1 apresenta 20 indivíduos afetados por perda auditiva neurossensorial ou mista, de herança autossômica dominante. Esta família foi averiguada em 2001 nas imediações da cidade de Maringá-PR, pelos geneticistas Dr. Valter Augusto Della Rosa e Dra. Maria Cristina Célia Braga. Contamos com amostras de DNA de 30 indivíduos (12 afetados e 18 fenotipicamente normais). A genealogia da família está apresentada na Figura 3.1. Contamos também com resultados da avaliação audiológica caracterizando o quadro da perda auditiva de todos os indivíduos afetados dos quais obtivemos amostras de DNA, e de mais 7 indivíduos normais.

A família 2 apresenta 16 indivíduos com perda auditiva neurossensorial, de herança autossômica dominante. Esta família foi averiguada em 2008 na cidade de São Miguel-RN pela Dra. Silvana Santos, atualmente docente da Universidade Estadual da Paraíba, no âmbito do estudo “Consanguinidade no Nordeste Brasileiro: da prospecção de doenças genéticas a intervenção por meio da Educação Genética”, financiado pelo CNPq, sob responsabilidade do Prof. Dr. Paulo Otto. Contamos com amostras de DNA de 21 indivíduos (15 afetados e 6 fenotipicamente normais). A genealogia da família está apresentada na Figura 3.2. Contamos também com resultados da avaliação audiológica caracterizando o quadro de perda auditiva de 11 indivíduos afetados e de 5 indivíduos normais.

A família 3 apresenta 15 indivíduos com perda auditiva neurossensorial, de herança autossômica dominante. Esta família foi averiguada em 2012 no nosso serviço

de aconselhamento genético, no IBUSP. Contamos com amostras de DNA de 19 indivíduos (7 afetados e de 12 fenotipicamente normais). A genealogia da família 3 está apresentada, resumidamente, na Figura 3.3. Contamos também com resultados da avaliação audiológica caracterizando o quadro de perda auditiva de 7 indivíduos afetados e 2 indivíduos normais.

A família 4 apresenta 11 indivíduos com perda auditiva neurossensorial, de herança autossômica dominante. Esta família foi averiguada em 2003 na cidade de Porto Alegre-RS, pela Dra. Carolina Fischinger Moura de Souza. Contamos com amostras de DNA de 23 indivíduos (10 afetados, 10 fenotipicamente normais e 3 indivíduos afetados por perda auditiva em altas frequências com início após os 40 anos de idade). A genealogia da família 4 está apresentada na Figura 3.4. Contamos também com resultados da avaliação audiológica caracterizando o quadro de perda auditiva de 9 indivíduos afetados e 6 indivíduos normais.

A família 5 apresenta 30 indivíduos com perda auditiva neurossensorial, de herança autossômica dominante. Esta família foi averiguada em 2010 no nosso serviço de aconselhamento genético no IBUSP. Contamos com amostras de DNA extraído de 45 indivíduos (14 afetados e de 31 fenotipicamente normais). A genealogia da família 5 está apresentada, resumidamente, na figura 3.5. Contamos com resultados da avaliação audiológica caracterizando o quadro de perda auditiva de 9 indivíduos afetados e 3 indivíduos normais.

3.2. Extração do DNA: A extração foi realizada a partir de linfócitos de sangue periférico, utilizando-se a técnica de extração com fenol e clorofórmio, nas famílias 1 e 4. Nas famílias 2, 3 e 5 as amostras foram extraídas com o uso do aparelho Autopure LS (Gentra Systems, Minneapolis, Minnesota, USA). Em algumas amostras foram utilizados os Kits: “Easy- DNATM Kit (Version D) Genomic DNA Isolation” da Invitrogen (Carlsbad, California, USA), ou “Perfect gDNA Blood Mini Isolation Kit” da Eppendorf ou “GFX Genomic Blood DNA Purification Kit” da Amersham Biosciences Buckinghamshire (United Kingdom).

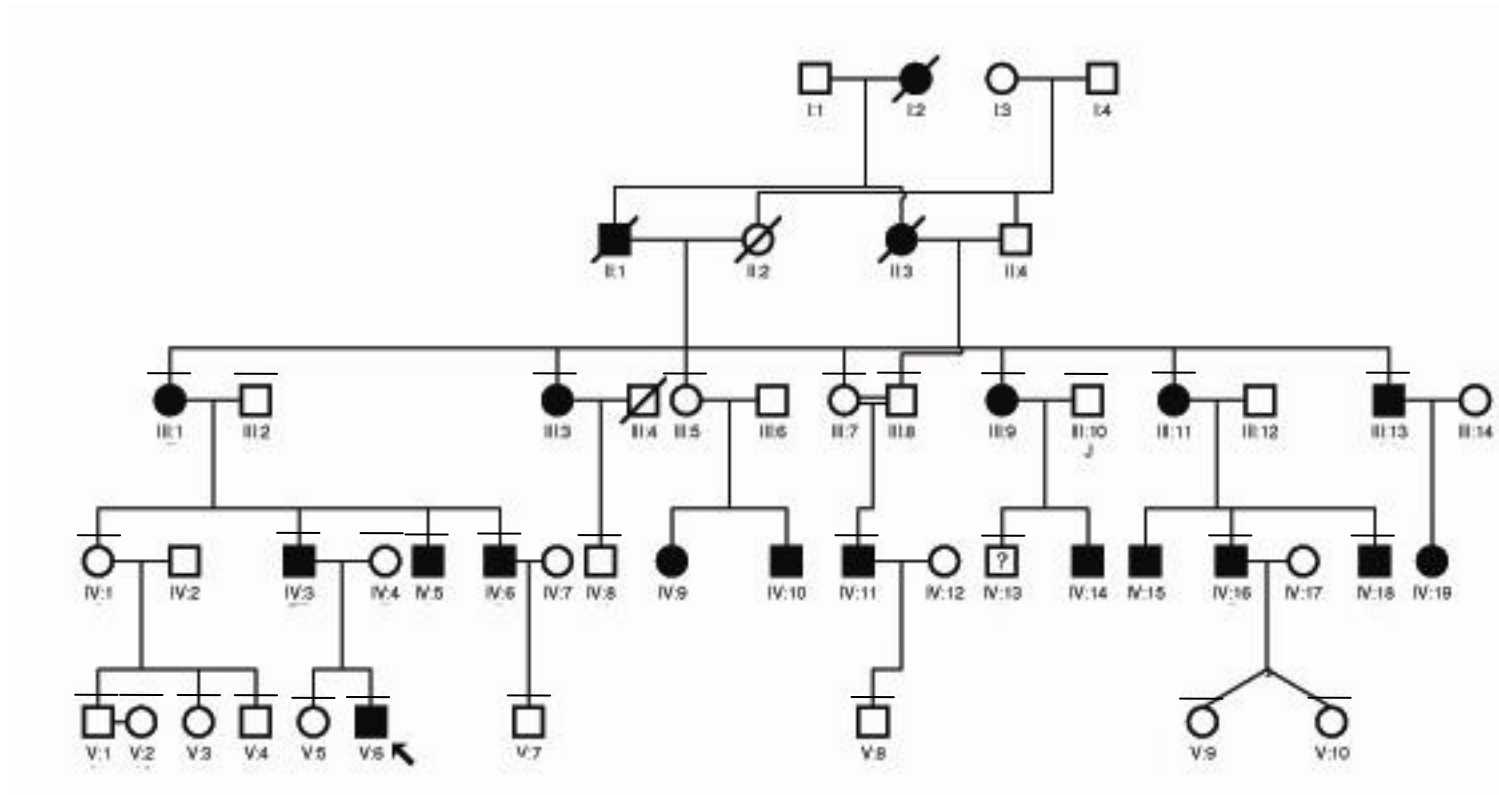


Figura 3.1: Genealogia da família 1, mostrando os 20 indivíduos afetados (em negro) e os indivíduos fenotipicamente normais (em branco). O indivíduo assinalado com o sinal (?) se declarou afetado, porém não foram obtidos resultados da avaliação audiológica. Contamos com amostras de DNA dos indivíduos assinalados com (—).

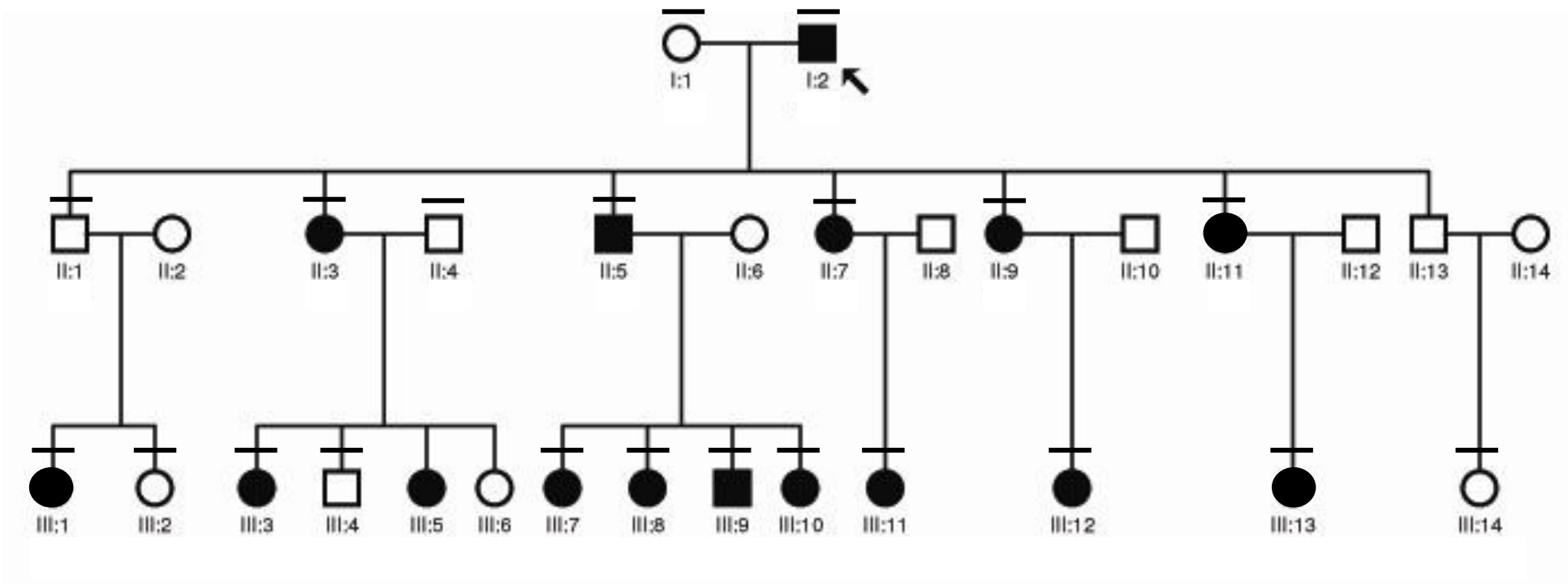


Figura 3.2: Genealogia da família 2, mostrando os 16 indivíduos afetados (em negro) e os indivíduos fenotipicamente normais (em branco). Contamos com amostras de DNA dos indivíduos assinalados com (➔).

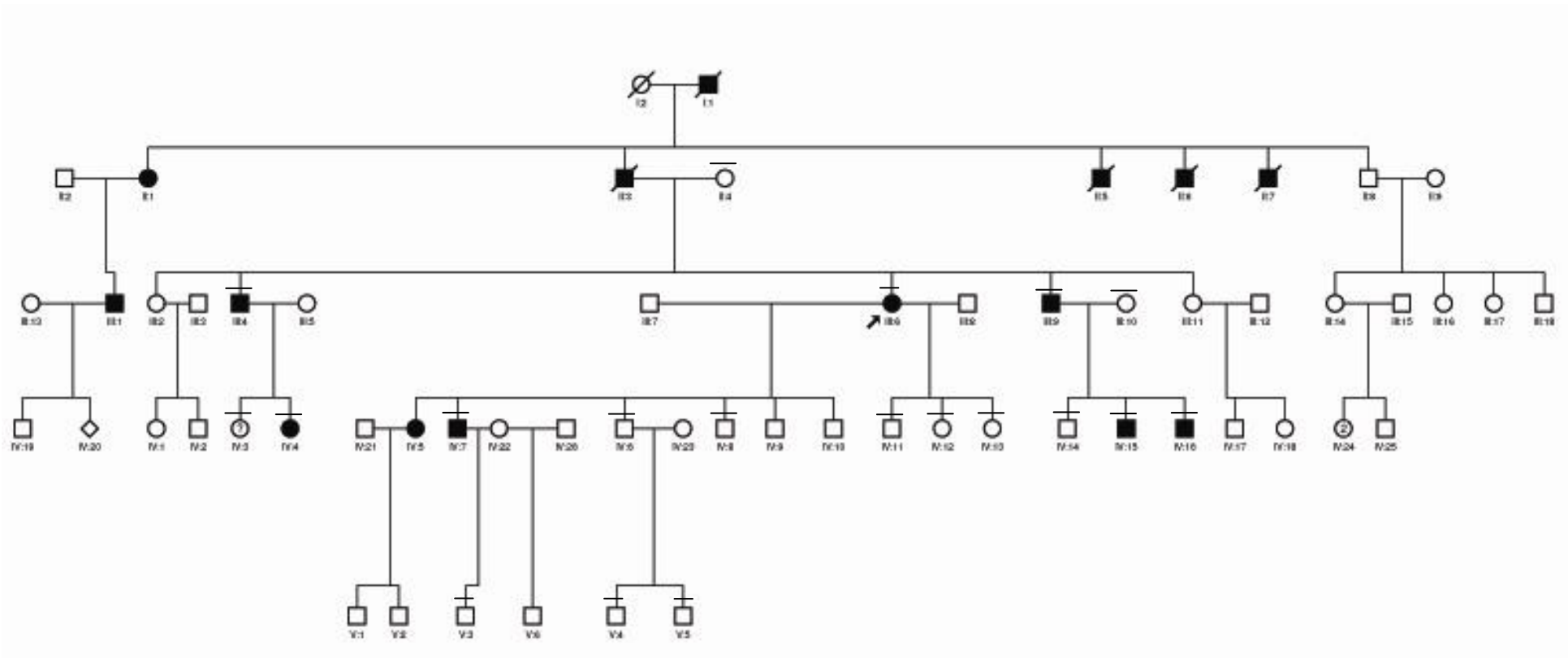


Figura 3.3: Genealogia da família 3, mostrando os 15 indivíduos afetados (em negro) e os indivíduos fenotipicamente normais (em branco). O indivíduo assinalado com o sinal (?) se declarou normal, porém resultados da avaliação audiológica por meio de emissões otoacústicas sugerem perda auditiva. Contamos com amostras de DNA dos indivíduos assinalados com (—).

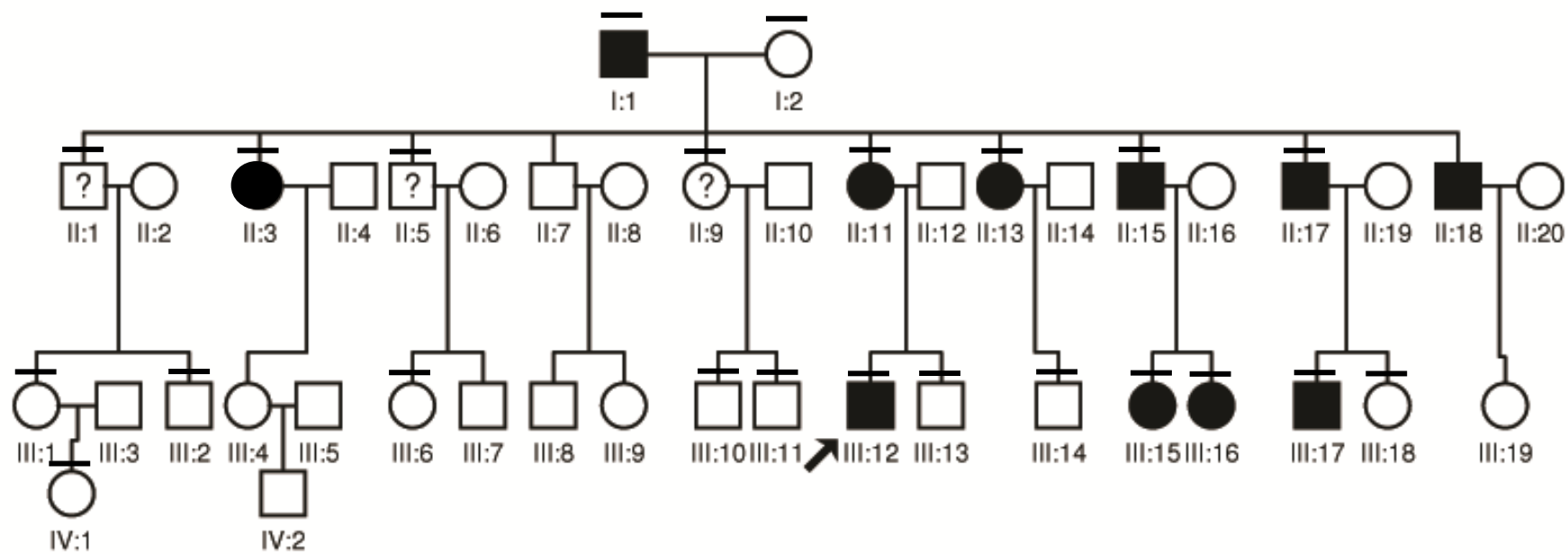


Figura 3.4: Genealogia da família 4, mostrando os 11 indivíduos afetados (em negro) e os indivíduos fenotipicamente normais (em branco). Os três indivíduos assinalados com o sinal (?) são afetados por perda auditiva leve, somente em altas frequências, após 40 anos de idade. Contamos com amostras de DNA dos indivíduos assinalados com (—).

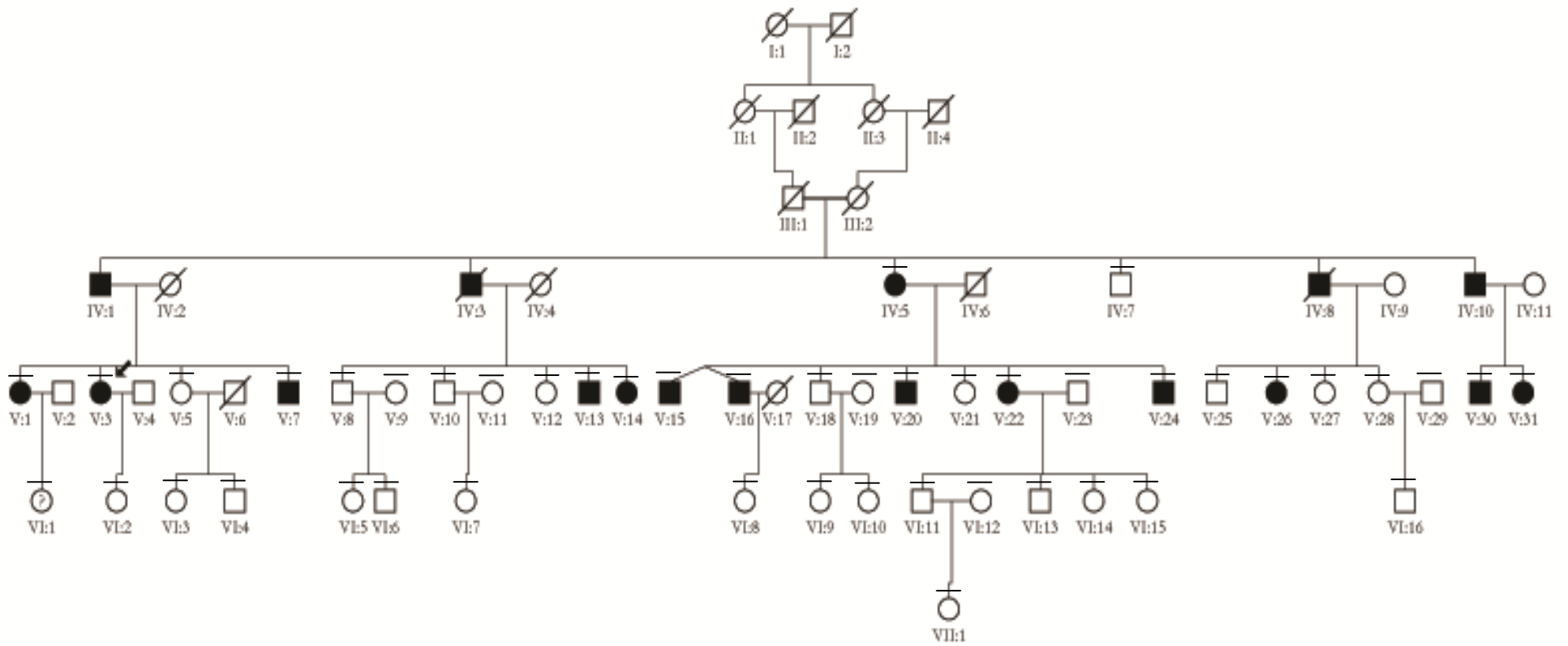


Figura 3.5: Genealogia resumida da família 5, mostrando 18 indivíduos afetados (em negro) e os indivíduos fenotipicamente normais (em branco). O indivíduo assinalado com o sinal (?) se declarou afetado, porém não contamos com resultados da avaliação audiológica. Contamos com amostras de DNA dos indivíduos assinalados com (→).

3.3. Quantificação do DNA: Cada amostra de DNA foi quantificada pelo espectrofotômetro *NanoDrop ND-1000* (NanoDrop Technologies, Rockland, Delaware, USA).

3.4. Análise de mutações específicas: A pesquisa de mutações frequentes em casos de perda auditiva foi realizada conforme rotina do Laboratório de Genética Humana. Foram testadas a mutação mitocondrial m.A1555G no gene 12SrRNA, as mutações c.35delG e c.167delT no gene *GJB2*, e as deleções $\Delta(GJB6-D13S1830)$ e $\Delta(GJB6-D13S1854)$ que incluem parte próxima ao gene *GJB6*. A região de código do gene *GJB2* também foi completamente sequenciada nos propósitos. Todos esses testes moleculares foram executados em amostras de pelo menos alguns indivíduos afetados em cada família, pela técnica do laboratório Maria Teresa Balester de Mello Auricchio.

3.5. Análise dos Microssatélites para Varredura Genômica: A varredura genômica com microssatélites foi realizada utilizando-se o *kit* “ABI PRISM® Linkage Mapping Set v. 2.5-MD10” da Applied Biosystems (Foster City, CA, USA). Esse *kit* inclui 400 pares de *primers* para amplificar marcadores do tipo microssatélites, distantes cerca de 10cM um do outro, e distribuídos por todos os cromossomos (exceto o Y). Dos 400 microssatélites, 382 estão nos autossomos e 18 estão no cromossomo X. Foram utilizados nesse trabalho os 382 microssatélites autossômicos. O *primer forward* correspondente a cada um dos loci é marcado com fluorescência. *Primers* do mesmo conjunto também foram utilizados na amplificação de microssatélites correspondentes a regiões cromossômicas específicas para confirmar resultados de varredura baseada em SNPs.

Outros microssatélites nas regiões cromossômicas que se mostraram candidatas a conter os genes responsáveis pela doença em cada família, para confirmação e refinamento do mapeamento da região candidata, também foram amplificados. Os protocolos para amplificação desses microssatélites encontram-se na descrição dos estudos moleculares realizados em cada uma das famílias.

3.6. Condições de amplificação: Para a amplificação dos microssatélites, o volume final de reação foi de 10µL contendo entre 50ng e 100ng de DNA genômico, 0,33µM de uma mistura de *primers*, 250µM de cada dNTP, 1,5U de *Taq* polimerase e 10% do volume final de tampão [300mM Tris pH=8,5, 100mM Hepes (C₈H₁₈O₄S – N-2-hidroxietilpiperazina-N'-2-ácido etanosulfônico – variação do pH:6,8-8,2), 25mM MgCl₂, 100mM KCL e 100mM (NH₄)₂SO₄]. As condições de amplificação foram: desnaturação inicial por 12 min a 95°C, 10 ciclos de 15s a 94°C, hibridação a 55°C por 15s e 30s a 72°C, 20 ciclos de 15s a 89°C, hibridação a 54°C por 15s e extensão a 72°C por 30s, extensão final a 72°C por 10min.

3.7. Eletroforese e Análise dos fragmentos: Para a análise do tamanho dos fragmentos amplificados contendo os microssatélites, os produtos da amplificação foram separados por meio de eletroforese em capilar no aparelho MegaBACE™ 1000 (sistema com 96 capilares) da Amersham Biosciences (Buckinghamshire, UK) juntamente com o padrão de peso molecular “MegaBACE™ ET 550-R Size Standard” do mesmo fabricante ou no aparelho ABI 3730 (sistema com 48 capilares) da Applied Biosystems (Foster City, CA, USA), juntamente com o padrão de peso molecular GeneScan 500 ROX (FAM, HEX e NED) e GeneScan 500 LIZ (FAM, VIC, NED e PET). A análise dos marcadores moleculares fluorescentes foi realizada utilizando o programa “Genetic Profiler versão 2.2”, que acompanha o aparelho MegaBACE™ 1000 ou Peak Scanner versão 1.0 (download em [http://marketing.appliedbiosystems.com/mk/get/PS1_login.](http://marketing.appliedbiosystems.com/mk/get/PS1_login)) e Gene Mapper (<http://www.appliedbiosystems.com/absite/us/en/home/support/software/dna-sequencing/genemapper.html>) versão 4.0, no caso dos fragmentos analisados no ABI3730.

3.8. Varredura genômica por meio de “microarrays” de SNPs com a tecnologia Affymetrix: A varredura genômica foi realizada por meio de hibridação das amostras de DNA dos pacientes com “chips” de 50K, ou seja, 50.000 SNPs (*GeneChip® Human Mapping K Array Hind 240* e *GeneChip® Human Mapping K Array Xba 240*, Affymetrix, Santa Clara, CA, USA). O DNA original foi diluído à

concentração de 50 ng/μl primeiramente. Após esse processo, 5 μl desse DNA foi fragmentado por meio do uso de uma enzima de restrição (*XbaI* ou *HindIII*). Em seguida, foi feita uma reação de ligação onde um adaptador sintético foi ligado às pontas não coesivas dos fragmentos digeridos. Utilizando um único par de *primers*, que se liga ao adaptador sintético, amplificaram-se os fragmentos digeridos e após a PCR o produto foi purificado. Após a quantificação do DNA (concentração superior a 1300 ng/μl), realizou-se então uma segunda etapa de fragmentação (por meio de uma endonuclease, DNase I) do produto de PCR, para a obtenção de fragmentos de DNA com tamanho entre 205 a 1000 pb. Por último, as extremidades coesivas desses fragmentos de DNA foram marcadas com fluoróforos. Desse modo, quando é feita a leitura do *chip*, são verificados os padrões diferentes de hibridação dependendo do alelo que o indivíduo apresenta em cada SNP. Seguiu-se exatamente o protocolo do fabricante para a realização desses experimentos (Uniscience website; GeneChip Mapping 10K 2.0 Assay Manual).

A interpretação dos resultados foi feita em um leitor *Genechip 3000 Scanner* (Affymetrix, Santa Clara, CA, USA) e os resultados foram interpretados por *softwares* adequados (*GeneChip Command Console Software*, http://www.affymetrix.com/estore/browse/products.jsp?productId=131429#1_1).

3.9. Cálculos de *Lod Scores*: Os resultados da determinação dos genótipos em relação aos microssatélites e aos SNPs das varreduras genômicas foram analisados para obtenção de *Lod Scores* de dois pontos e de múltiplos pontos. No caso de *Lod score* de dois pontos, as frequências dos alelos dos marcadores foram consideradas iguais a 1/N, sendo o N o número de alelos daquele marcador encontrado na família em questão. Os *Lod Scores* foram calculados utilizando-se frequência gênica do alelo mutado de 0,0001. Admitimos também que a taxa de recombinação é semelhante em ambos os sexos e que a taxa de mutação do gene é zero.

O programa MLINK do pacote de programas FASTLINK 4.2 (Lathrop e col., 1985; Cottingham e col., 1993) foi utilizado para o cálculo de *Lod Scores* de dois

pontos (um ponto é o marcador polimórfico escolhido e o outro ponto é o gene da doença) para simular o valor máximo possível de *Lod Score* em todas as famílias.

O programa Merlin (Abecasis e col., 2002) foi utilizado para a obtenção de *Lod Scores* de múltiplos pontos com os resultados da varredura genômica em todas as famílias. Os *Lod Scores* de múltiplos pontos resultam da análise de segregação de vários marcadores de um mesmo segmento cromossômico simultaneamente e em relação à doença. As frequências alélicas em cada locus de microssatélite são calculadas pelo programa Merlin utilizando os genótipos dos indivíduos das próprias famílias. O programa Allegro (<http://www.decode.com/software/>) foi também utilizado para a obtenção de *Lod Scores* da família 5, por causa das limitações do programa Merlin em relação ao tamanho dessa genealogia. Também no caso da família 5, o programa Alohora (<http://gmc.mdc-berlin.de/aloh>) foi utilizado para converter os dados de genótipos obtidos da plataforma *Affymetrix* (Santa Clara, CA, EUA) em arquivos adequados para análise de ligação. O programa foi escrito na linguagem Perl/Tk e os dados foram executados no sistema operacional *Windows*. O programa *Pedcheck* foi usado para verificação de erros de segregação mendeliana (Ruschendorf e Nurnberg, 2005).

A penetrância do fenótipo em todas as famílias foi calculada pelo método de máxima verossimilhança (Roegatko e col., 1986) com a ajuda do professor Dr. Paulo Alberto Otto.

3.10. Seleção de genes candidatos: A seleção de genes candidatos foi realizada para indicar os genes localizados na região candidata que seriam os prioritários para o sequenciamento pelo método de Sanger. Foram utilizadas duas estratégias para selecionar os genes a serem sequenciados. O programa *PosMed* (<http://biolod.org/PosMed>) foi utilizado para gerar uma lista composta por genes, localizados na região candidata, que possam explicar a perda auditiva na família. O programa *PosMed* gera uma lista de genes em ordem de importância, cujo primeiro gene da lista é aquele que tem a maior chance de explicar o fenótipo, de acordo com informações contidas em diversos bancos de dados (como OMIM e MEDLINE)

palavras-chave utilizadas e a região cromossômica indicada. Após a obtenção da lista de genes candidatos, o banco de dados GeneAtlas (www.genatlas.org) também foi consultado. Foram verificados todos os genes que se expressam na cóclea de humanos e/ou camundongos e os genes que foram identificados em ambas as estratégias foram selecionados para serem os prioritariamente sequenciados pelo método de Sanger.

3.11. Sequenciamento do DNA pelo método de Sanger: O sequenciamento convencional do DNA foi utilizado para identificar mutações nos genes candidatos a explicar a perda auditiva nas famílias. As reações de PCR para a amplificação dos fragmentos contendo os exons dos genes pesquisados foram preparadas em duplicata. Em algumas amostras, após a amplificação, os produtos de PCR foram purificados utilizando o *GFXTM PCR DNA and Gel Band Purification Kit* (GE Healthcare) e em seguida quantificados em gel de agarose 2%, utilizando como padrão o “*low DNA mass ladder*” (Invitrogen). Na maioria das amostras, a purificação de DNA foi realizada por meio das enzimas Exonuclease I + *Shrimp Alkaline Phosphatase* (USB-Affymetrix, Santa Clara, CA, USA), segundo instruções do fabricante. Depois de purificados e quantificados, os produtos de PCR foram preparados para as reações de sequenciamento convencional em ambas as direções, nas seguintes condições: 30-60ng de DNA (amplificado e purificado), 0,5pmol (1µL) de *primer*, 2µL de *BigDye Terminator v3.1* (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), 1µL de tampão (que acompanha o *BigDye* no kit) e água para completar o volume de reação para 10µL. A mistura foi submetida a 30 ciclos de desnaturação de 20s a 95°C, hibridação de 15s à temperatura correspondente a cada fragmento e extensão de 1min a 60°C. Depois, os produtos foram precipitados com Sephadex (Amersham Biosciences, Buckinghamshire, UK).

No procedimento de precipitação por meio de Sephadex, colocou-se o Sephadex nos poços de uma placa de purificação (Millipore, Billerica, IR) com o auxílio de um preenchedor de colunas (Millipore, Billerica, IR) e adicionou-se 300µL de água milli-Q nessa placa. Depois de aguardar por 3 horas para permitir a hidratação do Sephadex, centrifugou-se por 5 minutos a 2100 rpm para remover toda a água.

Foram adicionados 150µL de água e centrifugou-se mais duas vezes (uma centrifugação por 5 minutos e outra por 2 minutos) com a finalidade de remover a água. Às amostras de sequenciamento foram adicionados 5µL de água milli-Q e as amostras com a água foram dispensadas na placa de purificação contendo o Sephadex hidratado. Depois de preencher uma placa para recolher as amostras purificadas (própria para o aparelho ABI3730) embaixo da placa de purificação, centrifugou-se novamente por 5 minutos a 2100 rpm. Após a purificação por Sephadex das amostras da reação de sequenciamento, elas foram incubadas por 20 minutos a 95°C e em seguida, foram analisadas no equipamento ABI3730 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA).

3.12. Array-CGH: Foi utilizada a plataforma da Agilent Technologies (Santa Clara, CA, USA) contendo 180.000 oligonucleotídeos. As amostras foram marcadas por *random priming* com Cy3 e Cy5-dCTPs. Posteriormente foram purificadas, hibridadas e lavadas de acordo com as recomendações dos fabricantes. As imagens foram obtidas com o *scanner* da Agilent e processadas pelo *software* Agilent Feature Extraction v9.5.1 (<http://www.chem.agilent.com/en-US/products-services/Software-Informatics/GeneSpring-GX/Pages/genespring-release-note.aspx>). Posteriormente, foram analisadas com o programa Agilent Genomic Workbench 5.0 (<http://www.chem.agilent.com/Library/usermanuals/Public/workflow.pdf>) utilizando-se o algoritmo estatístico ADM-2 e um limiar de sensibilidade de 6.0. A resolução da detecção de alterações foi estimada aproximadamente 20 Kb, que é o espaçamento médio entre os oligonucleotídeos. O tamanho mínimo das alterações consideradas como reais é de cerca de 50-60 Kb, ou seja, alteração da intensidade de hibridação com pelo menos três oligonucleotídeos mapeados como adjacentes. Esses experimentos foram realizados pela Pós-doutoranda Erika de Freitas, da equipe da Dra. Carla Rosenberg.

3.13. Sequenciamento Massivo em Paralelo (de nova geração): O sequenciamento massivo em paralelo de exomas foi realizado utilizando-se a plataforma Illumina (Illumina INC., San Diego, CA, USA). Os protocolos para a

realização dos experimentos de sequenciamento de nova geração específicos para cada família encontram-se na descrição dos estudos moleculares realizados em cada uma das famílias, assim como as análises bioinformáticas.

3.14. PCR em tempo real: As análises das reações de PCR quantitativo em tempo real foram feitas no sistema de detecção 7500 fast (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). A reação de PCR em tempo real teve volume final de 20µL, cerca de 20ng de DNA (4 µL), 10mM de cada iniciador (0,6 µL cada), 10µL de *SYBR[®]Green PCR Master Mix 2X* (Applied Biosystems Foster City, CA, USA) e adicionou-se 4,8 µL de água milliQ. As condições de amplificação foram as seguintes: um primeiro ciclo a 50 °C por 2 minutos seguido de um ciclo a 95 °C por 10 minutos, para preparação do DNA; um ciclo a 95 °C por 15 segundos, seguido de um ciclo a 65 °C por 1 minuto, esses dois ciclos são repetidos 40x para incorporação e medição da fluorescência do *SYBR[®]Green*; um ciclo a 95 °C por 15 segundos, um ciclo a 60 °C por 1 minuto, um ciclo a 95 °C por 30 segundos e um ciclo a 60 °C por 15 segundos, essa última etapa para criar uma curva de *Melting* com a finalidade de determinar se o produto desejado foi amplificado.

As sequências dos iniciadores (sequência *forward* 5'-3'= CCTGGACAGGCACCATACAG; sequência *reverse* 5'-3' CCAATCCAGTTGCCATCATC) que codificam um fragmento do exon 5 do gene *EYAI* na família 1, foram desenhadas usando o programa *Primer3* (www.frodo.wi.mit.edu).

Os gráficos de dispersão log da quantidade X Ct das amostras geraram curvas padrão lineares para a sequência de amplificação alvo (valores de R² entre 0,98 e 1), mostrando uma amplificação proporcional à quantidade de DNA inicial da reação. O coeficiente da reta (R) foi utilizado para calcular o valor de eficiência do iniciador, segundo a fórmula: $E = -1/\text{coeficiente da reta}$. Um valor de E=2 representa uma amplificação de 100% da quantidade inicial de DNA a cada ciclo do PCR. Assim, para considerarmos que o iniciador tem uma boa eficiência, este valor deve estar entre 1,7 e 2,3. Os valores de eficiência de cada iniciador são utilizados nos cálculos da

quantificação relativa das sequências alvo. Uma amostra de indivíduo ouvinte não aparentado à família testada foi usada como amostra de referência nas reações de PCR em tempo real. Amplificamos três amostras de indivíduo controle ou “referência” e a média dos valores de Ct (vide definição abaixo) das três foi utilizada como o valor de referência.

O modelo matemático utilizado para determinar a quantificação relativa de cada sequência alvo (sequências possivelmente duplicadas do gene *EYAI*) em comparação a uma sequência de referência (sequência exônica dos genes *GAPSH* e *HPRT*) foi o descrito por Pfaffl (2001). Esse modelo está apresentado na fórmula abaixo.

$$QR = \frac{(E_{\text{alvo}})^{\Delta Ct_{\text{alvo}}(\text{controle-amostra})}}{(E_{\text{ref}})^{\Delta Ct_{\text{ref}}(\text{controle-amostra})}}$$

QR: Quantificação relativa ou razão que corresponde ao número de cópias da sequência alvo por genoma. Foi calculado um valor de QR para cada sequência alvo em cada um dos experimentos realizados. Dessa forma, quando estamos estudando sequências ou genes de cópia única, são esperados valores ao redor de 1 para sequências não duplicadas e valores de pelo menos 1,7 para sequências duplicadas. O experimento de amplificação em tempo real com o objetivo de realizar a quantificação relativa das sequências alvo do gene *EYAI* foi realizado em triplicata. Dessa forma, obtivemos médias e desvios padrão do valor estimado para o número de cópias das três reações realizadas com amostra de cada um dos pacientes.

♦ **Ct (ou Cp):** O Ct (*cycle threshold*) ou Cp (*crossing point*) é o número decimal de ciclos da PCR no qual a fluorescência cruza a linha do limiar, o que ocorre quando a reação de PCR entra em sua fase exponencial. A linha do limiar (*threshold*) é o ponto ou nível no qual a reação alcança uma intensidade de fluorescência acima da fluorescência basal.

♦ **Cálculo do ΔCt :** Este valor é obtido subtraindo-se o valor de Ct obtido para a amostra experimental do valor do Ct de uma amostra referência. Utilizamos como amostra de referência uma amostra de indivíduo ouvinte não aparentado.

♦ **Cálculo do numerador e do denominador da equação:** No numerador, teremos o valor resultante da eficiência dos iniciadores da sequência alvo (calculada por meio da curva padrão) elevada ao valor do seu ΔCt , calculado conforme descrito no parágrafo acima. No denominador, teremos o valor resultante da eficiência dos iniciadores da sequência de referência elevada ao valor do seu ΔCt .

3.15. Aspectos éticos da Pesquisa: O projeto sob qual foi colhido o material das Famílias 1 e 4 foi aprovado pelo CONEP (número do processo, 25000.143724/2003-29), Comissão Nacional de Ética em Pesquisa em 12/2003 durante a vigência do projeto de doutorado da Dra. Karina Lezirovitz conduzido entre 2003 e 2007. Em virtude da inclusão de novas famílias nesse estudo (Famílias 2, 3 e 5), esse projeto foi submetido ao Comitê de Ética em pesquisa em seres humanos do IBUSP e foi aprovado em 06/2009. Todos os participantes assinaram termos de consentimento livre e esclarecido (modelos dos termos para maiores e menores de 18 anos estão apresentados nos Apêndices 1 e 2).

CAPÍTULO 4

Estudos moleculares em surdez sindrômica de herança autossômica dominante: Síndrome Oto-branquial é causada por duplicação no gene *EYAI* encontrada em uma família brasileira.

Resumo

A síndrome Oto-branquial (BOS1; OMIM#602588) é uma doença de herança autossômica dominante caracterizada por malformações da orelha externa, média e interna, cistos e fístulas branquiais, associadas com deficiência auditiva do tipo condutiva, neurossensorial ou mista. A penetrância é alta, porém, incompleta. O fenótipo é extremamente variável. Mutações no gene *EYAI* são a causa molecular mais frequentemente descrita para BOS, caracterizando o tipo BOS1. Uma grande família com 20 indivíduos afetados por deficiência auditiva foi averiguada no estado do Paraná, região Sul do Brasil. Após exames clínicos e de tomografia computadorizada em cinco indivíduos, foram detectadas malformações da orelha externa, média e interna, fístulas auriculares e cervicais. No entanto, não foi detectada nenhuma malformação renal. Foi realizada varredura genômica com lâminas Affymetrix de *microarray* de 50k com amostras de DNA de 11 indivíduos afetados. *Lod Scores* de múltiplos pontos foram calculados utilizando o modelo de herança autossômica dominante com uma penetrância estimada em 90%. Com o uso do *software* MERLIN, um pico de *Lod Score* de 2,6 foi obtido para marcadores na região do gene *EYAI*, no cromossomo 8. O sequenciamento do gene *EYAI* não revelou nenhuma mutação patogênica. Amostras de DNA de três indivíduos afetados foram submetidas a *Array-CGH* (Oxford Gene Technology, 180k) e uma duplicação incluindo o gene *EYAI* foi detectada (hg19 8: 72,174,526-72,246,351). Essa duplicação não inclui nenhum outro gene. PCR em tempo real foi utilizada para confirmar e investigar a segregação da duplicação na família. Esta duplicação está presente em 11 dos 12 indivíduos afetados e ausente em 12 indivíduos normais estudados. Esses resultados indicam que a

duplicação no gene *EYAI* encontrada é a provável causa do fenótipo de BOS observado na família.

Duplication of *EYAI* causes Branchiootic Syndrome in a Brazilian family.

Abstract

Branchiootic syndrome 1 (BOS1; OMIM#602588) is an autosomal dominant disorder characterized by malformations of the outer, middle, and inner ear, branchial fistulae and cysts, associated with conductive, neurosensorial, or mixed hearing impairment. The penetrance is high, but incomplete, and the phenotype extremely variable. Mutations in *EYAI* gene are the most frequent molecular cause of BOS characterizing BOS1. A large pedigree with 20 affected individuals presenting with hearing loss and ear malformations was ascertained in the state of Paraná in southern Brazil. After clinical exams and computer tomography (five individuals), malformations of outer, middle and inner ear, auricular and cervical fistulae were detected, albeit without renal abnormalities. Genomic scanning was performed on DNA from 11 affected individuals using 50k microarray technology from Affymetrix. Multipoint *Lod Scores* were calculated under an autosomal dominant model with a penetrance estimated to be 90%. Using MERLIN, a peak *Lod Score* of 2.6 was obtained for markers in the *EYAI* gene region on chromosome 8. Sequencing of *EYAI* did not reveal pathogenic mutations. Array-CGH (Oxford Gene Technology, 180k) was then performed with DNA samples from three affected individuals and a duplication including the *EYAI* gene was detected (hg19 8: 72,174,526-72,246,351). No other gene was included in the duplicated segment. In order to confirm this alteration and to investigate the segregation of the duplication, real time PCR was performed. The duplication was present in eleven of the twelve affected individuals and absent in the 12 unaffected individuals studied. Our findings implicate this *EYAI* duplication in the BOS1 phenotype observed in the pedigree.

4.1. *Introdução*

A síndrome oto-branquial (BOS) é uma afecção de herança autossômica dominante caracterizada por malformações da orelha externa, média e interna, fístulas e cistos branquiais, associadas com perda auditiva do tipo condutiva, neurossensorial ou mista. Outra síndrome relacionada a essa é denominada síndrome branquio-oto-renal 1 (BOR1; OMIM#113650) que apresenta os mesmos sinais clínicos de BOS, porém incluindo comprometimento renal. Ambas fazem parte de um mesmo grupo de afecções chamado de distúrbios do espectro branquio-oto-renal.

Nas pessoas afetadas por esses quadros, o segundo arco branquial é a estrutura embrionária cujo desenvolvimento se apresenta comprometido. O desenvolvimento anormal do segundo arco branquial pode resultar na formação de cistos branquiais e de fístulas, que são canais que ligam os cistos à superfície do pescoço. As fístulas geralmente ocorrem no terço inferior do pescoço. Ocasionalmente, abrem-se internamente na região das amígdalas (Torrielo e col., 2004). A maioria das pessoas com síndrome BOS ou BOR têm perda de audição e outras anormalidades da orelha como: malformações da orelha externa, média ou interna e fossetas pré-auriculares. Na síndrome BOR, as malformações variam desde uma hipoplasia da região mediana do rim até agenesia renal (Heimler e Lieber, 1986; Ni e col. 1994). Os sinais das síndromes são muito variáveis, e indivíduos clinicamente classificados com a síndrome BOS e BOR podem ser observados em uma mesma família (Smith, 2009).

A prevalência das síndromes BOS e BOR em conjunto é estimada em 1:40.000 nascimentos e foi descrita em 2% das crianças profundamente surdas. (Fraser e col., 1980). A penetrância é alta, mas incompleta e a expressão é extremamente variável entre famílias diferentes e entre os membros de uma mesma família (Konig e col., 1994; Stratakis e col., 1998). Diminuição da capacidade auditiva é encontrada em 70 a 93% dos indivíduos afetados. A perda auditiva pode se manifestar do início da infância até o começo da vida adulta e a gravidade da perda auditiva varia de leve a profunda, podendo ser condutiva, neurossensorial ou mista.

Dos diversos sinais das síndromes BOS/BOR, há sinais que são mais frequentes. Atualmente, o diagnóstico é baseado nas características frequentes descritas por Chen e col. (1995). Essas características incluem: perda auditiva (até 93% dos pacientes), fossetas pré-auriculares (82%), anormalidades renais (67%), fístula branquial (49%), malformações da orelha externa (36%) e estenose do meato acústico externo (29%).

O locus BOS1/BOR1 foi mapeado inicialmente na região cromossômica 8q12-22 por Haan e col. (1989), Kue e col. (1992) e Smith e col. (1992) estudaram uma família com um rearranjo cromossômico hereditário do cromossomo 8, der ins (q24.11q13.3q21.13), que foi considerado responsável pela síndrome de BOR1. Em 1994, a região mapeada foi delimitada na região cromossômica 8q13.3 por Ni e col. (1994) e Wang e col. (1994). O gene responsável por BOS1/BOR1 foi identificado por Abdelhak e col. (1997a). Neste estudo foram encontradas pequenas mutações diferentes e uma deleção no gene chamado *EYAI* em sete probandos com fenótipo BOR. O gene *EYAI* é composto por 16 exons e tem 156 kb de tamanho (Abdelhak e col., 1997b). Esse gene codifica um polipeptídeo composto por 559 aminoácidos com aproximadamente 61,2kD (<http://www.omim.org/entry/601653?search=EYAI&highlight=eya1>). O produto do gene *EYAI* é expresso na orelha externa, cóclea, neuroepitélio vestibular e rim durante o início do desenvolvimento (Abdelhak e col. 1997a, b). Este gene é homólogo ao gene *eyes absent* de *Drosophila* e produz quatro transcritos variantes devido a *splicing* alternativo (Abdelhak e col. 1997b) que correspondem a 4 isoformas de proteínas (www.genatlas.org). Várias mutações foram descritas no gene *EYAI*. Estas mutações incluem mutações no quadro de leitura, mutações de sentido errado e mutações sem sentido, em sítios de *splicing*, além de deleções e rearranjos cromossômicos (www.medicine.uiowa.edu/pendredandbor/). Há também outros genes responsáveis por síndromes do espectro oto-branquial. Mutações no gene *SIX5* na região cromossômica 19q13 são responsáveis por outro tipo de síndrome brânquio-otorrenal (BOR2; OMIM#610896) e mutações no gene *SIX1* na região cromossômica 14q23.1

são responsáveis pela síndrome oto-branquial 3 (BOS3; OMIM#608389). As manifestações clínicas que ocorrem nos diferentes tipos não diferem significativamente.

Nesse estudo relatamos a ocorrência de uma duplicação de um segmento do gene *EYAI*, que segrega com perda auditiva de herança autossômica dominante.

4.2. Pacientes e Métodos

4.2.1. Pacientes

A família 1 (Figura 3.1) foi averiguada na cidade de Maringá-PR, região Sul do Brasil, pelos geneticistas Dr. Valter Della Rosa e Dra. Maria Cristina Célio Braga. A família apresenta 20 afetados por perda auditiva. A perda auditiva nessa família é de herança autossômica dominante de penetrância incompleta, estimada em 90%. Alguns indivíduos apresentam perda do tipo neurosensorial e em 5 indivíduos foi constatado que a perda auditiva era mista. Alguns indivíduos apresentam malformações da orelha, cistos e fístulas branquiais.

4.2.2. Estudos Clínicos

4.2.2.1. Avaliação audiológica

As audiometrias tonais dos indivíduos dessa família foram conduzidas pela fonoaudióloga Elaine Cristina de Souza Rodrigues, da equipe da Dra. Silvia Barreto Ramos, do Centro Universitário de Maringá, CESUMAR – Clínica de Fonoaudiologia.

4.2.2.2. Avaliação Genético-Clínica

A avaliação clínica de 10 dos indivíduos afetados foi realizada pela Dra. Ana Maria Machado de Moraes, do Departamento de Medicina da Universidade Estadual de Maringá-PR. Foram averiguados os sinais clínicos frequentes da síndrome, com base na lista de sinais descritos em Jones e Smith (2007).

4.2.2.3. Exames de Imagem

Os exames de tomografia computadorizada da mastoide foram conduzidos nos indivíduos caracterizados com perda auditiva mista, no Instituto Maringá de Imagem. Os exames foram solicitados e interpretados pelo Dr. Jefferson Cedaro de Mendonça.

4.2.3. Estudos moleculares

Foram coletadas amostras de DNA de 30 indivíduos, 12 afetados (III:1, III:3, III:9, III:11, III:13, IV:3, IV:5, IV:6, IV:11, IV:16, IV:18 e propósito) e 18 fenotipicamente normais incluindo cônjuges (III:2, III:5, III:7, III:8, III:10, IV:1, IV:4, IV:8, IV:13, V:1, V:2, V:3, V:4, V:5, V:7, V:8, V:9 e V:10). O DNA dessa família foi extraído pela metodologia de fenol/clorofórmio a partir de linfócitos do sangue periférico.

4.2.4. Estudos de Ligação

A varredura genômica foi realizada por meio da tecnologia *Affymetrix* com o uso de “chips” de 50k, ou seja 50,000 SNPs (*GeneChip*[®] *Human Mapping K Array Hind 240* e *GeneChip*[®] *Human Mapping K Array Xba 240*) em 11 indivíduos afetados, conforme instruções do fabricante.

4.2.5. Cálculos de *Lod Score*

Com o uso do programa MERLIN (Abecassis e col., 2002), os *Lod Scores* de múltiplos pontos foram calculados. As frequências alélicas foram calculadas pelo próprio *software* baseado nos genótipos analisados. A penetrância utilizada nesse estudo foi de 90%.

4.2.6. *Array-CGH*

A técnica de *microarray-Comparative Genomic Hybridization (array-CGH)* foi realizada para investigar as alterações cromossômicas submicroscópicas. A investigação foi realizada em três afetados (IV:3, IV:18 e propósito) utilizando a plataforma *Agilent (Agilent Technologies)* contendo 180.000 oligonucleotídeos.

4.2.7. Sequenciamento do Gene *EYAI*

A sequência dos *primers* utilizados para sequenciar o gene *EYAI* se encontram na Tabela 4.1. As sequências dos *primers* foram baseadas em Abdelhak e col. (1997b).

A reação de PCR para amplificar todos os exons teve volume final de 26µL, cerca de 100ng de DNA, 0,3 a 0,6µM de cada *primer*, 200µM de cada dNTP, 10% do volume final de Tampão confeccionado no Laboratório de Genética Humana e 1U de Taq DNA polimerase. As condições de amplificação foram: desnaturação inicial por 5

minutos a 95°C, segunda desnaturação por 1 minuto a 95°C, hibridização por 1 minuto a 60°C, extensão por 1 minuto a 72°C, repetição dos passos 2 a 4 16 vezes com diminuição de 0,5°C da temperatura de hibridização, nova desnaturação por 1 minuto a 95°C, hibridização por 1 minuto a 52°C, extensão por 1 minuto a 72°C, repetição dos passos 6 a 8 30 vezes, extensão final a 72°C por 5 minutos.

Tabela 4.1: Sequência dos *primers* utilizados para sequenciar o gene *EYAI*.

| Exon | <i>Primer Forward 5'-3'</i> | <i>Primer Reverse 5'-3'</i> |
|------|-----------------------------|-----------------------------|
| 1 | CACTGAAGCAGAGTAACAACA | CCAACAGAGGCTGTTACTATT |
| 2 | TTATGATATATGTTTCAGTTAGGG | CATACACAGGGACATTACATG |
| 3 | CGCAGGTCACAAAGACCAAA | AGATGGAACATGTGGGCACA |
| 4 | GTGATGTGGTTGTTAATCGGT | ACACAGAAGGTGACAACACTG |
| 5 | GAGATAAGATTGGGGAAGCAT | CCAATCCAGTTGCCATCATC |
| 6 | GCTATTTTCCTGTACCCACATT | GAAAGCTCTCACTTATAAACAG |
| 7 | GGCTCAGAAACCCAAACATAC | GTGCAACCACTGCATGAATAT |
| 8 | AGGCTAATCTTGGCACCATGG | CACTGCTGTTTACGTAGCAGG |
| 9 | TGAATAACAGCTTTCTCAGCC | GACTATATAGTTCTTCTCCATTT |
| 10 | CTTTCAGCCTCTCCCAATGC | ACCAACAAACTCCTGTCTCAC |
| 11 | ACCTACTGATTGACATAGTTGA | ACTATAAAAGGGAGATGGTCAC |
| 12 | GTGACCATCTCCCTTTTATAGT | ATGAAACTGCCCAAATAGAAGC |
| 13 | AAATCTGGAGGCTGGTATTC | ATGAACAAGCACGAGCATTGC |
| 14 | GCAATGCTCGTGCTTGTTTCAT | TGCTTTATGTTTCTTCTTACGTC |
| 15 | TGCTGTGGCACATACAACCC | AGAGTACTGCACATATTCATCA |
| 16 | AGCTGGCATTTC AATGATACT | GTGGCAGACACATAACGCTG |

4.3. Resultados

4.3.1. Avaliação Audiológica

A perda auditiva nessa família se caracterizou por um quadro de gravidade muito variável, caracterizado por surdez bilateral, dos tipos neurossensorial ou mista, comprometendo todas as frequências. Os resultados das audiometrias tonais dos indivíduos dessa família estão mostradas nas Figura 4.1 e Figura 4.2.

4.3.2. Exames Clínicos

Onze indivíduos foram avaliados, do ponto de vista clínico. O resumo da avaliação, mostrado na Tabela 4.2, mostra malformações de várias estruturas. Os achados corroboram o diagnóstico de síndrome BOS na família.

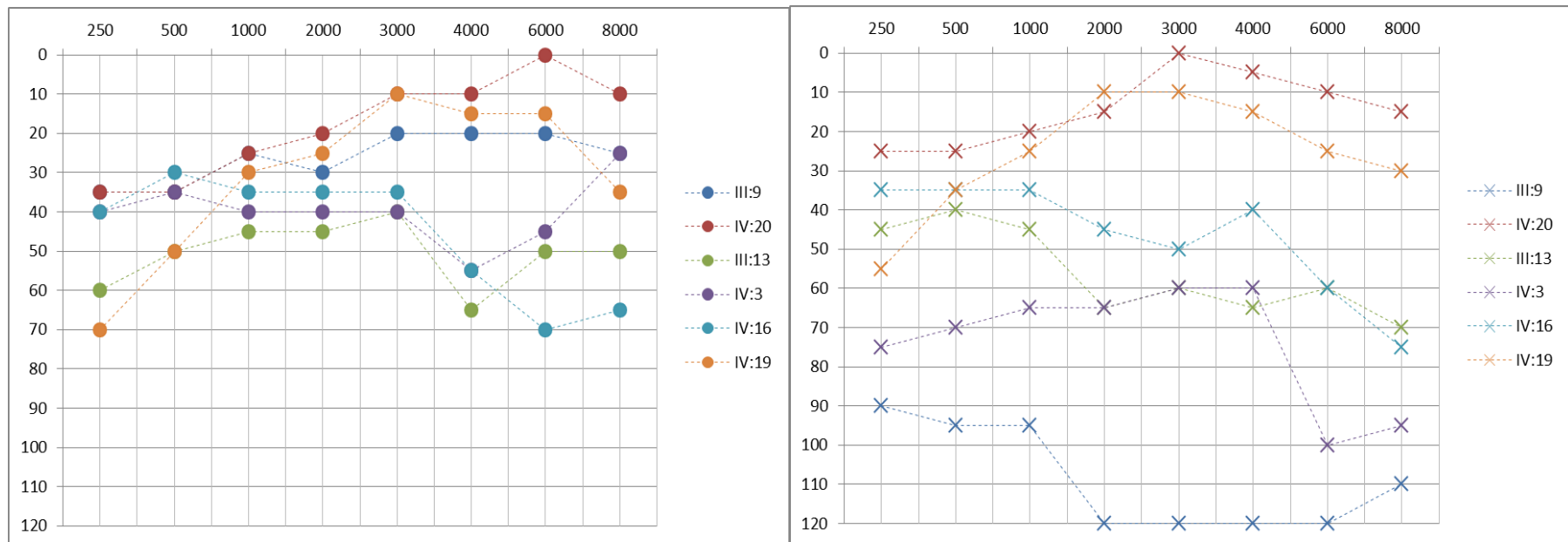


Figura 4.1: Audiogramas de seis indivíduos afetados por perda auditiva neurosensorial. Limiares auditivos até 20dB (decibéis – unidade de intensidade sonora, varia de 0 a 120) são considerados normais (Hz = Hertz – unidade de frequência da onda sonora, varia de 250 a 8000). Os símbolos (●) e (X) representam os resultados obtidos através da via aérea de condução do som.

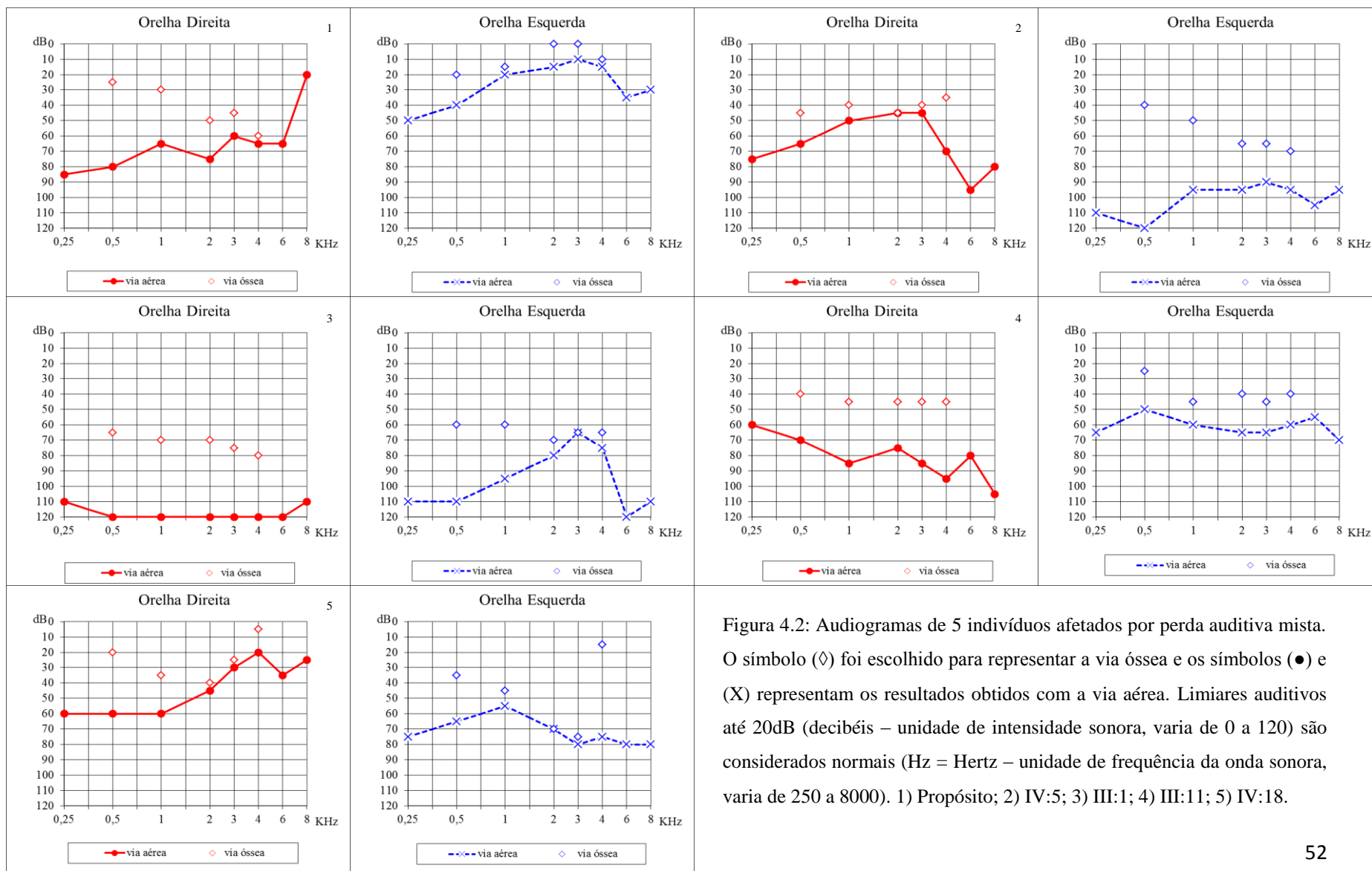


Figura 4.2: Audiogramas de 5 indivíduos afetados por perda auditiva mista. O símbolo (\diamond) foi escolhido para representar a via óssea e os símbolos (\bullet) e (\times) representam os resultados obtidos com a via aérea. Limiares auditivos até 20dB (decibéis – unidade de intensidade sonora, varia de 0 a 120) são considerados normais (Hz = Hertz – unidade de frequência da onda sonora, varia de 250 a 8000). 1) Propósito; 2) IV:5; 3) III:1; 4) III:11; 5) IV:18.

Tabela 4.2: Resultado do exame clínico realizado nos membros da família com perda auditiva neurossensorial.

| Características frequentes | III:1 | III:11 | III:13 | IV:3 | IV:5 | IV:15 | IV:16 | IV:18 | IV:19 | Propósito |
|---------------------------------------|-------------|------------------------|---------|------|------|-------|-------|---------|-------|-----------|
| Surdez | SIM | SIM | SIM | SIM | SIM | SIM | SIM | SIM | SIM | SIM |
| Cisto branquial | SIM | NÃO | NÃO | SIM | SIM | SIM | NÃO | NÃO | NÃO | NÃO |
| Displasia auricular | SIM | SIM | NÃO | SIM | SIM | NÃO | SIM | SIM | NÃO | SIM |
| Displasia renal | NÃO | NÃO | NÃO | NI | NÃO | NÃO | NÃO | SIM (?) | NÃO | NI |
| Estenose do CA externo | NÃO | NÃO | NÃO | NÃO | NÃO | NÃO | NÃO | NÃO | NÃO | NÃO |
| Estenose ou aplasia do ducto lacrimal | NÃO | NÃO | SIM (?) | NÃO | NÃO | NÃO | NÃO | NÃO | NÃO | NÃO |
| Fístula branquial | NÃO | NÃO | NÃO | NÃO | SIM | SIM | SIM | NÃO | NÃO | NÃO |
| Fosseta pré-auricular | SIM | SIM | SIM | SIM | SIM | SIM | SIM | SIM | SIM | SIM |
| Má formação da orelha interna | SIM | NÃO | NI | NI | NÃO | NI | NI | SIM | NI | NÃO |
| Má formação da orelha média | SIM | SIM | NI | NI | NÃO | NI | NI | SIM | NI | SIM |
| Características eventuais | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Anomalias do nervo facial | NÃO | NÃO | NÃO | NÃO | NÃO | NÃO | NÃO | NÃO | NÃO | NÃO |
| Apêndice pré-auricular | NÃO | NÃO | NÃO | NÃO | NÃO | NÃO | NÃO | NÃO | SIM | NÃO |
| Bócio eutireoideo | NÃO | NÃO | NÃO | NÃO | NÃO | NÃO | NÃO | NÃO | NÃO | NÃO |
| Cisto de duplicação pancreática | NI | NI | NI | NI | NI | NI | NI | NI | NI | NI |
| Colesteatoma congênito | NI | NI | NI | NI | NI | NI | NI | NI | NI | NI |
| Face longa e estreita | SIM | SIM | SIM | SIM | SIM | NÃO | SIM | SIM | NÃO | SIM |
| Fenda palatina | NÃO | NÃO | NÃO | NÃO | NÃO | NÃO | NÃO | NÃO | NÃO | SIM |
| Lacrimejamento gustativo | NÃO | NÃO | NÃO | NÃO | NÃO | NÃO | NÃO | NÃO | NÃO | NÃO |
| Luxação congênita de quadril | NÃO | NÃO | NÃO | NÃO | NÃO | NÃO | NÃO | NÃO | NÃO | NÃO |
| Má-oclusão dentária | SIM | SIM (referida) | SIM | NI | SIM | NÃO | SIM | SIM | SIM | SIM |
| Microdontia dos dentes permanentes | Usa prótese | NÃO (prótese superior) | NÃO | NI | NÃO | NÃO | NÃO | NÃO | NÃO | NÃO |
| Ausente-rotação do intestino | NÃO | NÃO | NÃO | NÃO | NÃO | NÃO | NÃO | NÃO | NÃO | NÃO |
| Palato estreito | NÃO | NÃO | NÃO | NI | NÃO | NÃO | SIM | NÃO | NÃO | SIM |
| Paralisia Facial | NÃO | NÃO | NÃO | NÃO | NÃO | NÃO | NÃO | NÃO | NÃO | NÃO |
| Tumor intracraniano benigno | NI | NI | NI | NI | NI | NI | NI | NI | NI | NI |
| Úvula bífida | NI | NÃO | NÃO | NI | NI | NÃO | NÃO | NÃO | NÃO | NI |

NI – Não investigado; CA – Canal Auditivo

4.3.3. Exames de Imagem

Cinco indivíduos que apresentam perda auditiva caracterizada como mista foram submetidos a exames de imagem (tomografia computadorizada de mastoide). O resumo das características clínicas dos 5 indivíduos estão apresentados na Tabela 4.3. Além de malformações visíveis externamente, alterações internas foram vistas após tomografia.

As estruturas alteradas identificadas nos indivíduos afetados confirmam o provável diagnóstico de síndrome BOS.

Tabela 4.3: Resumo dos resultados dos exames clínicos e de tomografia computadorizada dos ossos temporais dos indivíduos caracterizados com perda auditiva mista. N.I. - não investigado.

| | III:1 | III:11 | IV:5 | IV:18 | Propósito |
|---------------------------------------|-------------------------------|-----------|-------------------------------|-------------------------------|---------------------|
| Malformação da cóclea | Redução volumétrica bilateral | Ausente | Redução volumétrica bilateral | Redução volumétrica bilateral | Displasia a direita |
| Malformação do vestíbulo | À direita | Ausente | À esquerda | À direita | Ausente |
| Malformação dos canais semicirculares | À direita | À direita | Bilateral | À direita | Bilateral |
| Malformação do conduto auditivo | N.I. | Ausente | Presente | Ausente | N.I. |
| Alargamento do aqueduto vestibular | À esquerda | À direita | Ausente | Ausente | À direita |

4.3.4. Estudos Moleculares

4.3.4.1. Mutações excluídas

Mutações frequentemente associadas com perda auditiva foram excluídas como sendo a causa da perda auditiva nessa família. As mutações excluídas foram: c.35delG e c.167delT presentes no gene *GJB2*, del*GJB6* (D13S1830) e del*GJB6* (D13S1854), a mutação mitocondrial m.A1555G e outras mutações na região de código do gene *GJB2* foram excluídas no propósito. A mutação c.35delG foi excluída nos demais afetados, exceto no indivíduo IV:11, que não foi testado.

4.3.4.2. Locus DFNAs e OTSCs excluídos

Durante o período do doutorado da Dra. Karina Lezirovitz, foram utilizados microssatélites ligados a vários DFNA já mapeados. Os microssatélites utilizados para investigar a ligação do fenótipo com os DFNAs conhecidos permitiu excluir os seguintes locus de perda auditiva de herança autossômica dominante: DFNA1, DFNA2, DFNA3, DFNA4, DFNA6, DFNA7, DFNA8, DFNA9, DFNA10, DFNA11, DFNA13, DFNA15, DFNA17, DFNA18, DFNA20, DFNA22, DFNA23, DFNA27, DFNA28, DFNA30, DFNA31, DFNA32, DFNA36, DFNA37, DFNA39, DFNA40, DFNA42, DFNA43, DFNA44 e DFNA47.

Ao realizar análise das avaliações audiológicas realizadas nos afetados dessa família, observamos os quadros de perda auditiva mista em alguns indivíduos, característica presente em casos de otosclerose, doença caracterizada por uma esclerose isolada da região endocondral do labirinto (Tomek e col., 1998). Como os casos herdados de otosclerose têm herança autossômica dominante e já foram mapeados 7 locus, foram também realizados estudos de ligação com microssatélites ligados às regiões conhecidas. A possibilidade de ligação com quatro locus de otosclerose (OTSC3, OTSC5, OTSC7, OTSC2) foi excluída pela análise com microssatélites.

4.3.4.3. Array de SNPs

A varredura genômica dessa família foi realizada usando a tecnologia de *array* de SNPs com o uso da plataforma *Affymetrix*. Foram utilizadas lâminas de 50k para analisar 11 indivíduos, 10 com perda auditiva e um normal: III:9, III:11, III:13, IV:1, IV:3, IV:5, IV:6, IV:18, IV:16, V:1, propósito.

4.3.4.4. Cálculos de *Lod Score*

O programa MERLIN foi utilizado para a obtenção de *Lod Scores* de múltiplos pontos. O único *Lod Score* superior a 1 foi obtido para uma região do cromossomo 8, com um valor máximo de 2,6 (Figura 4.3).

4.3.4.5. Sequenciamento de Sanger

Priorizou-se estudar a região candidata do cromossomo 8, que exibiu *Lod Scores* mais elevados. Essa região engloba a região mapeada do locus da síndrome BOS1, onde está presente o gene *EYA1*. O gene foi sequenciado e nenhuma variação que pudesse explicar a perda auditiva na família foi identificada.

4.3.4.6. Array-CGH

A investigação das alterações submicroscópicas foi realizada através da técnica de *Array-CGH*. O experimento foi realizado utilizando amostras de três indivíduos (IV:3, IV:18 e propósito). Uma duplicação na região do gene da síndrome BOS1 foi identificada (Figura 4.4, construída com base no hg18). Em análise posterior, utilizando uma versão atualizada do genoma de referência (hg19), a duplicação foi delimitada na área que compreende a região 8: 72,174,526-72,246,351, de aproximadamente 72 kb, que engloba os exons de 4 ao 10.

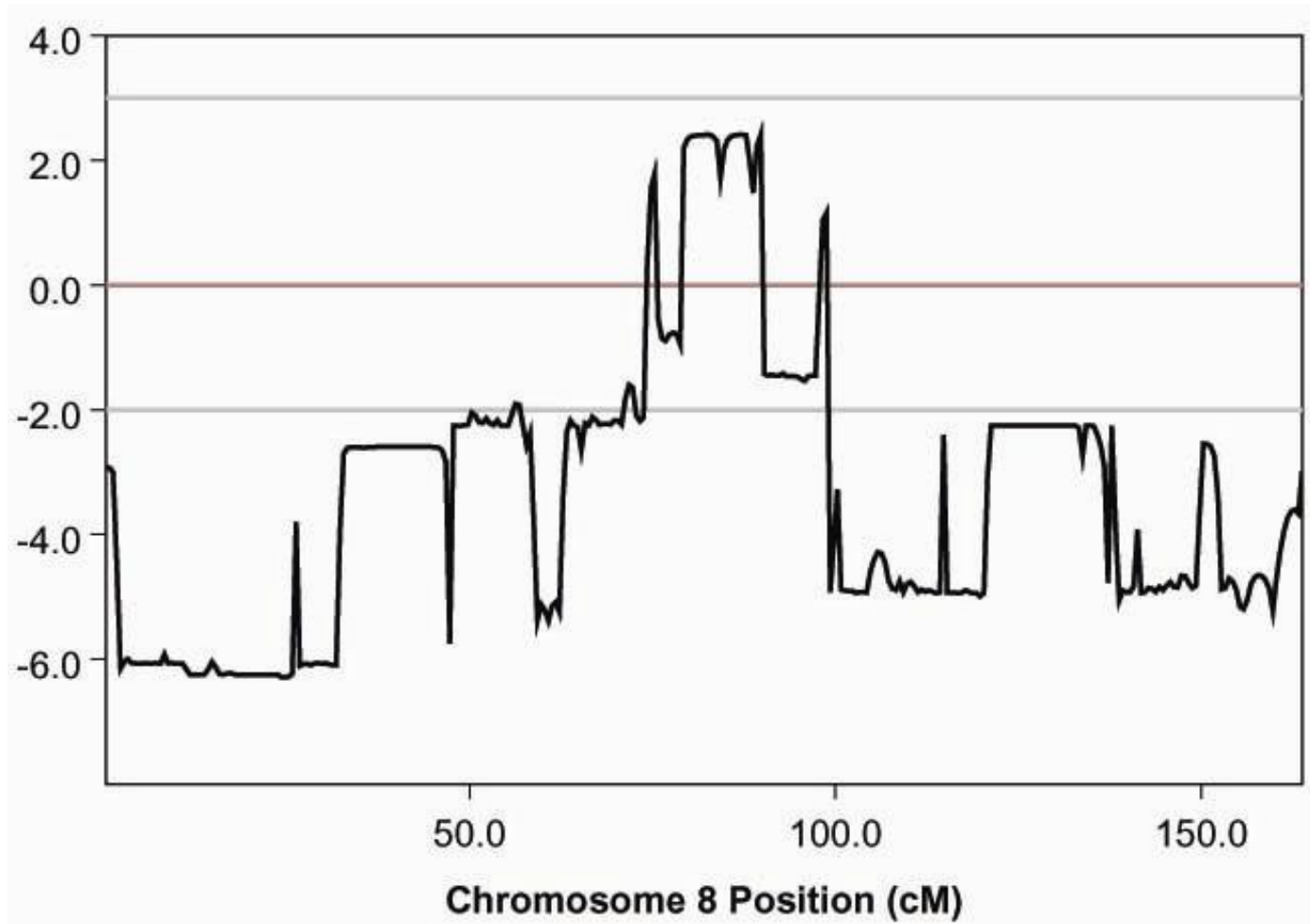


Figura 4.3: Valores de *Lod Score* no cromossomo 8.

8: 71723604-72919903, 1.19 Mb

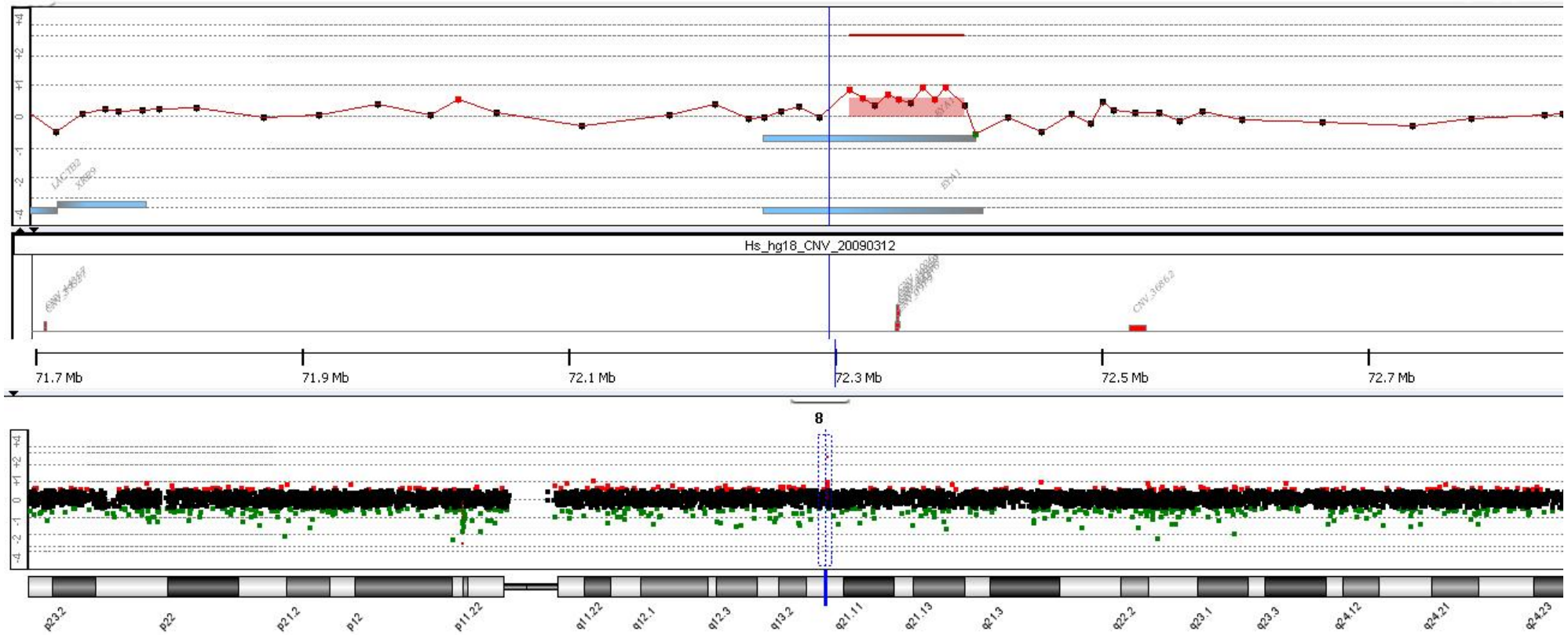


Figura 4.4: Duplicação encontrada no gene *EYAI* por meio da técnica de *Array-CGH*. Marcada com a fluorescência vermelha está a amostra do afetado e marcada com a fluorescência verde está a amostra controle. Os pontos em preto indicam que não houve diferença na concentração da fluorescência na comparação entre as amostras. A região em destaque mostra maior concentração da fluorescência vermelha, indicando DNA duplicado na amostra do indivíduo afetado.

4.3.4.7. PCR em tempo real quantitativo

Análises de PCR em tempo real foram realizadas em todas as amostras de DNA disponíveis da família para estudar a segregação da duplicação. Verificamos a presença da duplicação em 11 dos 12 indivíduos afetados e a ausência de duplicação em um afetado por perda auditiva (IV:11) e nos 12 membros normais (resultados na Figura 4.5). O indivíduo IV:11 provavelmente não é afetado pela síndrome BOS1, apesar de apresentar perda auditiva. Seus pais (III:7 e III:8) são fenotipicamente normais e não apresentam a duplicação. O filho de IV:11 (V:8) também é normal e não apresenta a duplicação.

Em vista dos resultados encontrados de segregação da duplicação que compreende o gene *EYAI* (previamente associado à síndrome BOS1), com os sinais clínicos que incluem malformações em diversas estruturas, características da síndrome BOS, concluímos que a duplicação é a causa do quadro nessa família. Exceção a essa conclusão é o indivíduo IV:11, que não herdou a duplicação. Como esse indivíduo é filho de consanguíneos, supomos que ele deve ser afetado por uma forma de perda auditiva de herança autossômica recessiva.

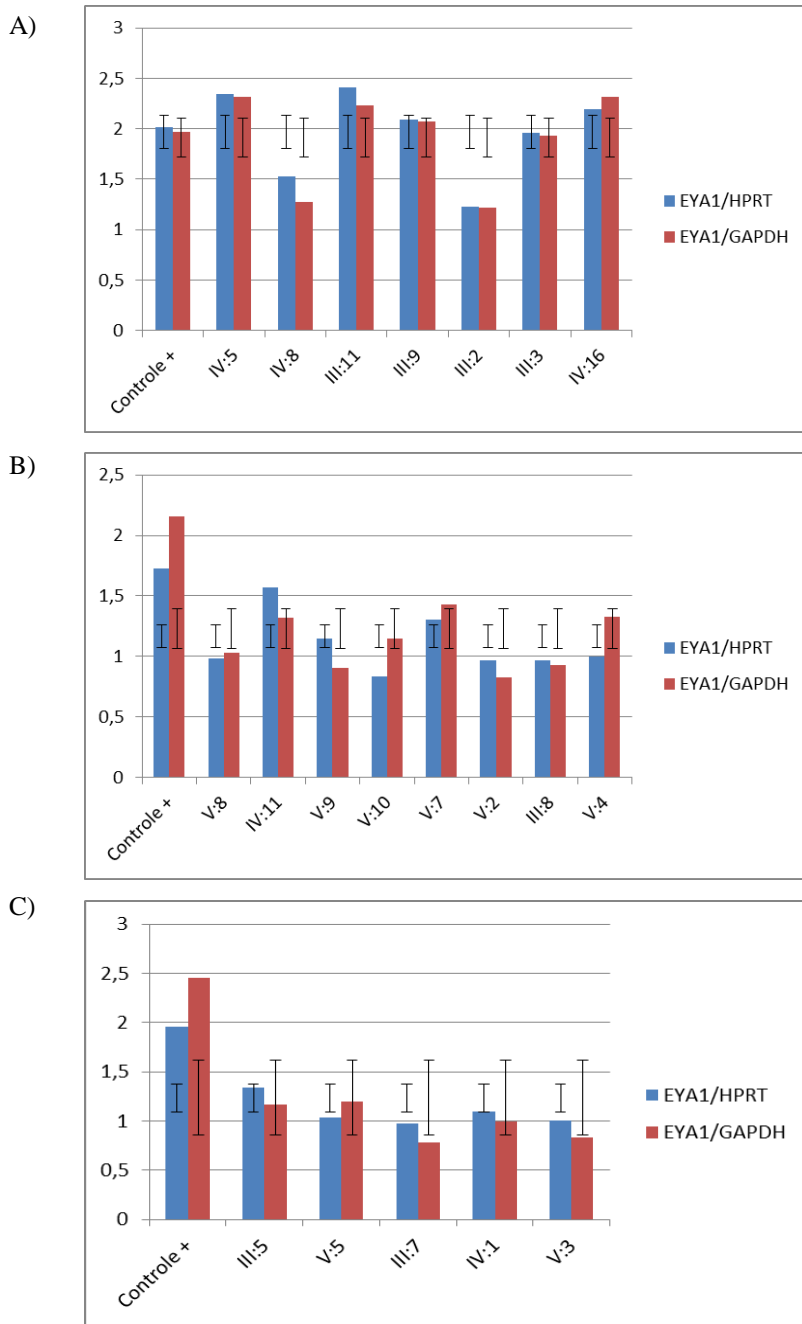


Figura 4.5: Resultados das razões de quantificação do número de cópias do gene *EYA1* comparadas com os genes controles *GAPDH* e *HPRT* (estimativa do número de cópias). Controle + é a denominação do indivíduo com duplicação detectada por *array-CGH*. A) Experimento 1, mostrando os resultados de indivíduos com duplicação e sem duplicação; B) Experimento 2, mostrando resultados de indivíduos sem duplicação; C) Experimento 3, mostrando os resultados de indivíduos sem duplicação

4.4. Discussão

Várias mutações no gene *EYAI* já foram descritas como sendo a causa da síndrome BOS1/BOR1. Essas mutações incluem os seguintes tipos: substituições, inversões de poucas bases, deleções de poucas bases e mutações de *splicing*. Essas mutações no gene *EYAI* são a causa mais frequente da síndrome BOS1/BOR1 (Abdelhak e col., 1997b; Shimasaki e col., 2004; Spruijt e col., 2006; Stockley e col., 2009; Shih-Hao Wang e col., 2012 e Gigante e col., 2013).

Abdelhak e col. (1997a) estudaram 21 probandos afetados por síndrome BOR1 (casos familiares e esporádicos) utilizando *Southern Blot* para caracterizar rearranjos cromossômicos. Foram estudados 7 dos 16 exons do gene *EYAI* e em um probando (caso esporádico) foi detectada uma deleção de aproximadamente 7kb que compreende os exons de 11 a 15.

Em outro estudo, Abdelhak e col. (1997b) estudaram todos os exons do gene *EYAI* em 20 probandos não aparentados afetados pela síndrome BOR1 através da técnica de *Southern Blot*. Foram identificados os seguintes rearranjos: uma deleção de 5,6 kb em 2 indivíduos aparentados afetados, localizada na região que compreende do exon 9 ao íntron IX; uma deleção de aproximadamente 20 – 37 kb, localizada na região que compreende do íntron X ao exon 16 em afetados de uma mesma família; uma inserção *Alu* foi identificada no exon 10 causando uma duplicação de aproximadamente 16 pares de bases no exon 10 (além da própria inserção de *Alu*), em dois indivíduos afetados de uma mesma família.

As comparações entre os quadros clínicos resultantes das deleções encontradas por Abdelhak e col. em ambos os estudos (1997a e 1997b) com o quadro da duplicação identificada em nosso estudo não mostraram nenhuma diferença significativa entre os sinais clínicos apresentados. Em teoria, as características clínicas resultantes de duplicações não deveriam ser comparadas com características clínicas resultantes de deleções, uma vez que os efeitos de ambos os rearranjos são diferentes no que diz respeito à expressão gênica. No entanto, não existem outras grandes duplicações de segmentos do gene *EYAI* identificadas até o momento para comparação dos quadros clínicos.

Vários estudos apontam alterações no gene *EYAI* como uma causa frequente da síndrome BOS1/BOR1. A duplicação encontrada nesse estudo é mais um mecanismo mutacional responsável pela síndrome. A grande duplicação identificada em nosso estudo é a única do tipo já descrita no gene *EYAI* como sendo a causa da síndrome.

CAPÍTULO 5

Estudos moleculares em famílias com surdez não síndrômica de herança autossômica dominante.

5.1. FAMÍLIA 2:

Novo gene candidato mapeado no cromossomo 3 responsável por perda auditiva em uma família do Rio Grande do Norte.

Resumo

Uma família com 16 afetados por perda auditiva de herança autossômica dominante foi submetida a estudos de mapeamento genético. Foram coletadas amostras de DNA de 21 indivíduos (15 afetados e 6 aparentemente normais). A varredura genômica foi realizada utilizando 382 microssatélites marcados com fluorescência e separados entre si por 10 cM (*ABI PRISM® Linkage Mapping Set v. 2.5; Applied Biosystems, Foster City, CA*) em amostras de 11 afetados e de um indivíduo aparentemente normal. O *Lod Score* de múltiplos pontos foi calculado utilizando um modelo de herança autossômica dominante com penetrância completa. Um resultado de *Lod Score* significativo, de 3,2, foi obtido para a região cromossômica 3q22. A região candidata foi mapeada entre os marcadores D3S3576 e D3S1569 (aproximadamente 20cM, 21,13Mb). A região mapeada se sobrepõe ao locus DFNA18, previamente mapeado por Bonsch e col. (2001). O sequenciamento massivo em paralelo do exoma de um afetado indicou 3 variantes como sendo as possíveis causas do fenótipo [*ESYT3* (NM_031913), c.T1472C:p.L491P 138,188,315; *CHST2* (NM_004267), c.G1118A:p.G373D 142,840,776 and *PLS1* (NM_001145319) c.C28T:p.R10W 142,383,107]. O estudo de segregação das três variantes em famílias com surdez por meio de sequenciamento de Sanger permitiu a exclusão das variantes nos genes *ESYT3* e *CHST2* como causas do fenótipo. A variante no gene *PLS1* permanece como a candidata mais provável a explicar o fenótipo. A análise de patogenicidade da variante no gene *PLS1* foi realizada e foi obtida uma probabilidade de 99,9% dessa

variante causar dano na função da proteína. Em humanos, o gene *PLS1* é expresso no intestino delgado, cólon e rins. Em níveis baixos, o RNAm do gene é encontrado também nos pulmões e no estômago. O gene *PLS1* participa na organização dos feixes de actina na ausência de íons Ca^{+2} . Em camundongos, esse gene é altamente expresso logo no início do desenvolvimento da cóclea, na porção apical, auxiliando no correto desenvolvimento do órgão. A mutação não está presente na coleção de amostras de 47 probandos de famílias com perda auditiva de transmissão dominante, do nosso laboratório. Estudos de outras famílias e da função do gene *PLS1* são necessários para confirmar o significado desse achado.

Novel deafness gene mapped on chromosome 3 in a family from Rio Grande do Norte, Brazil.

Abstract

A family with 16 individuals affected by autosomal dominant hearing loss was molecularly investigated and 21 DNA samples from 15 affected and 6 unaffected individuals were collected. Genomic scanning with 382 fluorescent-labeled microsatellites with an average spacing of 10 cM (ABI PRISM® Linkage Mapping Set v. 2.5; Applied Biosystems, Foster City, CA) was performed in 11 affected and 1 unaffected individuals. Multipoint *Lod Scores* were calculated under autosomal dominant inheritance model with a complete penetrance. A significant peak *Lod Score* of 3.2 was obtained, in the chromosome region 3q22. The chromosomal candidate region was defined between D3S3576 and D3S1569, a region of 20cM (21.13Mb). The most likely region to harbor the gene overlaps with the region defined for DFNA18, previously mapped by Bonsch et al. (2001). Massive parallel sequencing of the exome was performed in one sample from affected individual and 3 variants were selected as candidates [*ESYT3* (NM_031913), c.T1472C:p.L491P 138,188,315; *CHST2* (NM_004267), c.G1118A:p.G373D 142,840,776 and *PLS1* (NM_001145319) c.C28T: p.R10W 142,383,107]. Sanger sequencing was performed to investigate the segregation of the three variants in families with hearing loss and the variants in the genes *ESYT3* and *CHST2* were excluded as the cause of the phenotype. The *PLS1* variant is the best candidate to explain the phenotype in this family. The probability that this variation could damage the protein was calculated to 99.9%. In humans, this gene is expressed in colon, small intestine and kidney. It is also expressed in low levels in lungs and stomach. *PLS1* participates in the organization of actin bundles in absence of Ca²⁺. In mice, it is highly expressed in the early development of the cochlea, in the apex. This mutation was not found in the collection of DNA samples from 47 probands affected by autosomal dominant hearing loss from our laboratory. To confirm the significance of these findings, other studies with more families with

affected individuals by autosomal dominant hearing loss and functional investigations are needed.

5.1.1. Pacientes e Métodos

5.1.1.1. Pacientes

A família 2 (Figura 3.2, pág. 30) foi averiguada na cidade São Miguel RN, região Nordeste do Brasil, pela pesquisadora Dra. Silvana Santos da Universidade Estadual da Paraíba (UEPB). A família apresenta 16 afetados por perda auditiva. A perda auditiva nessa família é neurossensorial e exibe herança autossômica dominante de penetrância completa.

5.1.1.2. Avaliação audiológica

As audiometrias tonais dos indivíduos dessa família foram realizadas pela fonoaudióloga Sônia Paiva, da equipe do Dr. Washington F. Leite, na clínica Washington Faelante LTDA, Natal-RN.

5.1.1.3. Estudos Moleculares

Foram coletadas amostras de DNA de 21 indivíduos, dos quais 15 são afetados (I:2, II:3, II:5, II:7, II:9, II:11, III:1, III:3, III:7, III:8, III:9, III:10, III:11, III:12, III:13) e 6 indivíduos normais, incluindo um cônjuge (I:1, II:1, II:4, III:2, III:4, III:14). O DNA foi extraído com o auxílio do equipamento Autopure LS (Gentra Systems, Minneapolis, Minnesota, USA). Os *kits* utilizados para a extração do DNA pela estação de extração Autopure estão descritos no capítulo 3.

5.1.1.3.1. Estudos de Ligação

A varredura genômica dessa família foi realizada com 382 marcadores moleculares do tipo microssatélites, separados por uma distância média de 10 cM, com *primers* obtidos do *kit* (*ABI Prism Linkage Mapping Set 2.5*, Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Foram estudadas inicialmente 12 amostras de DNA provenientes de 11 indivíduos afetados e de um indivíduo normal. Fragmentos de outros quatro marcadores moleculares do tipo microssatélite foram posteriormente amplificados, com *primers* marcados com fluorescência, dentro da região cromossômica mapeada (Tabela 5.1). Esses quatro marcadores foram analisados em 16 indivíduos, juntamente com os cinco marcadores do *kit*, caracterizando um haplótipo de nove marcadores.

Para a amplificação dos quatro novos marcadores moleculares selecionados, as mesmas condições e metodologias para amplificação dos marcadores moleculares provenientes do *kit* foram utilizadas (pág. 35).

Tabela 5.1: Sequência dos *primers* utilizados na amplificação dos fragmentos dos quatro marcadores de microssatélites posteriormente utilizados. A sequência F de cada marcador é marcada com a fluorescência 56-FAM.

| Microssatélite | Sequência F 5'-3' | Sequência R 5'-3' |
|----------------|----------------------|-------------------------|
| D3S1764 | TCCCCTTTGAAAGTCCTACC | TCCCTGGGTGAAAATGAGTA |
| D3S1744 | TTTAAGCGGAAGGAAGTGTG | CTGGCCCCATCTCTCTAT |
| D3S3607 | ACAGGCTCAGGACCAC | CTAAGAATAGCTTCCCAGAACGG |
| D3S3576 | GATCTAGTTGGCAAGGCGT | TTGGACTCGAGCAATCC |

5.1.1.3.2. Cálculos de *Lod Score*.

Com o uso do programa MERLIN (Abecassis e col., 2002), os *Lod Scores* de múltiplos pontos foram calculados. As frequências alélicas foram calculadas pelo próprio *software* baseado nos genótipos observados na família. O programa MLINK do pacote de programas FASTLINK (Lahtrop e col., 1985; Cottingham e col., 1993) foi utilizado para a obtenção do resultado de simulação do *Lod Score* máximo observável nessa família. Foi considerada a penetrância completa (100%) nos cálculos de *Lod Score*.

5.1.1.3.3. Busca de Genes Candidatos.

O *software PosMed* (<http://omicspace.riken.jp/PosMed/>) foi utilizado para identificar os mais prováveis genes candidatos na região cromossômica mapeada. Após a obtenção da lista de prováveis genes candidatos o banco de dados do portal <http://www.genatlas.org/> foi utilizado para identificar padrões de expressão desses genes e restringir a lista de candidatos para estudos de sequenciamento de Sanger.

5.1.1.3.4. Sequenciamento de Sanger.

As sequências dos *primers* para sequenciamento dos exons dos genes *GATA2*, *RAB6B*, *CLDN18*, *Slc12a8*, *RAB7A* selecionados estão listadas na Tabela 5.2. Os

primers foram desenhados com o auxílio do *software* Primer3 (Rozen and Skaletsky, 2000).

As condições para a reação de PCR e, posteriormente, sequenciamento de Sanger, estão descritas no capítulo 3.

Tabela 5.2: Sequência dos *primers* utilizados na amplificação dos exons dos genes *GATA2*, *RAB6B*, *SLC12A8* e *RAB7A*.

| <i>Primers</i> | Sequência 5'-3' | <i>Primer</i> | Sequência 5'-3' |
|------------------|------------------------|--------------------|-------------------------|
| GATA2-1F | GCAAAGTGATGTGCGAAATAA | SLC12A8-1F | ATGAGGTAGACAAGGTTTCTT |
| GATA2-1R | CCAAATACTCCCTCTGGTT | SLC12A8-1R | CTCATTGAACTGGATGACC |
| GATA2-2F | ACCTCGTGGTGGGACTTT | SLC12A8-2F | TGTGCGCATGTGTGTGTA |
| GATA2-2R | AATTTTTCAGCAGCTCGATT | SLC12A8-2R | CTTCACAGGATGCTCATTTAA |
| GATA2-3F | GTTCTGGGAGTCGTGATCT | SLC12A8-3F | GGTGCTTGCTTTGTCCTTT |
| GATA2-3R | GGGTCTCAAACATCTGCTG | SLC12A8-3R | TCAGGCCCTGGATAGTGA |
| GATA2-4F | CGAGAACTTGCCGGTTAA | SLC12A8-4F | TTTAACCCTGCACTGGTC |
| GATA2-4R | CCAGAAAGAGAGACGACCC | SLC12A8-4R | TCATGAAGCTGCTCCAA |
| GATA2-5F | ATTTAGCCCTCCTTGACTGA | SLC12A8-5F | CCCTACCTTTCCAATATTTAA |
| GATA2-5R | TCTTACGGGAAGCCCTT | SLC12A8-5R | TACATACCAAGAGTACCTGCAG |
| GATA2-6F | CACAATTCCTGGCTTCTT | SLC12A8-6F | GGAGATTGAAAAGCAGCCTAT |
| GATA2-6R | GTCAGTGGCAAATCAGAC | SLC12A8-6R | CCCACCAGACGTGAATTT |
| RAB6B-1F | CCCCTAGACATCAGAG | SLC12A8-7F | GATACAAGTCCCTTTGGAAA |
| RAB6B-1R | TCCCTGTCCCTCTCCTCTA | SLC12A8-7R | TCCCAGACAGTATGCAAG |
| RAB6B-2F | CTTCAAATGCAGTGTGTTTAGA | SLC12A8-8F | AAACCATGGAATGAATGG |
| RAB6B-2R | AAAATGACAGCCTGGGAA | SLC12A8-8R | AAAGAAAATGACCTCTGCAT |
| RAB6B-3F | TGTGGTCGCTAGGCTTTT | SLC12A8-9F | TCGCATGCATGAACTAATC |
| RAB6B-3R | CTAGGGGATAAGCCCAAA | SLC12A8-9R | AATAATTCAGCTGATACCTGAA |
| RAB6B-4F | TTTGGGCTTATCCCCTAG | SLC12A8-10F | GGGAGGCCATAAACACTT |
| RAB6B-4R | TGGTGTTCAAAGGCAACT | SLC12A8-10R | ACATTGCTTCTAATTAGGCC |
| RAB6B-5F | CTGATCTGTGTTGACTGAGCT | SLC12A8-11F | TGCCCAAATATCTGCTTAAG |
| RAB6B-5R | GTCTACCAGGTGTCCTCAAA | SLC12A8-11R | GTGCTTGTACAGTTCTCC |
| RAB6B-6F | TTTGTGTAGCGAGACTGTG | SLC12A8-12F | TAGGCTGCTGTGATGGAAGA |
| RAB6B-6R | GAAATTAGCTCTCCCCTCC | SLC12A8-12R | GGAGCAACATCTGAGTCTCC |
| RAB6B-7F | GGAGAGTAAAGCTGCAGGTT | SLC12A8-13F | TTTGTATTCTCATGCTTTGAG |
| RAB6B-7R | ACTGGGCGAGTGTCTGTC | SLC12A8-13R | TGTAGATTTCCATTGTCCAA |
| RAB6B-8F | AGGGTACAGTGCACAGGG | RAB7A-1F | AACGTGACGCAAGGTTGAG |
| RAB6B-8R | AGAACAGGAAGGAGGAGGT | RAB7A-1R | GCCGGGTGGGGTCTT |
| CLDN18-1F | AAATAATGCCCTTGAACC | RAB7A-2F | CTAGCAGGAAGGTTGAGGG |
| CLDN18-1R | GAGCCAGCTTCTCCTTTT | RAB7A-2R | TAAGGCCCTAAGCCCTAT |
| CLDN18-2F | GTATTTCCCAATTCACA | RAB7A-3F | CCTTCAGGTCAGGCAGATTC |
| CLDN18-2R | GACCTCCACACTCAGATCA | RAB7A-3R | GAAGAACAGGGAAGGAAAATGTC |
| CLDN18-3F | GCTTGGTTATAGGGATACAA | RAB7A-6F | TTTCTCTGCTACTCCCCTGA |
| CLDN18-3R | ACAGGTGATTGTTGATTTATG | RAB7A-6R | TTTCTGCCTGAAGCACCA |
| CLDN18-4F | TACTCTCCAGGGTACCTGA | RAB7A-4F | AAATTTGCTTCTGAAAGTCTGG |
| CLDN18-4R | CCATTCTGTTCTTTAGGTTCC | RAB7A-4R | GGCATATGGTAATGAAGACTCCC |
| CLDN18-5F | AGGCAGTAAACCAGTGTACC | RAB7A-5F | CATGTCTGTGCTCCTCACCTGTA |
| CLDN18-5R | CAGCTGTTTTATGGTGGAATA | RAB7A-5R | CTGGCTATACAGAAAAGAGTGGG |

Posteriormente, outros 3 genes foram selecionados para sequenciamento de Sanger após os resultados do sequenciamento massivo em paralelo. As sequências dos *primers* para sequenciamento dos exons contendo as variantes dos genes

ESYT3, *CHST2*, *PLS1* estão listadas na Tabela 5.3. Os *primers* foram desenhados com o auxílio do *software* Primer3 (Rozen and Skaletsky, 2000).

Tabela 5.3: Sequência dos *primers* utilizados na amplificação dos exons que contêm as variantes dos genes *ESYT3*, *CHST2* e *PLS1*.

| <i>Primers</i> | Sequência 5'-3' |
|----------------|--------------------------|
| ESYT3F | CTCAAGCTGATATTGACTATG |
| ESYT3R | CCTCTCTCCCTGAGAAGG |
| CHST2F | CGCACACTAGTCATAAAGGG |
| CHST2R | AGGGCTGTCTGCAGC |
| PLS1F | TGCAGGTACTTGGATCTCCAG |
| PLS1R | CTTCCTCTGAATAAGAATGCTGTG |

5.1.1.3.5. Array-CGH.

A investigação das alterações submicroscópicas foi realizada por meio da técnica de *Array-CGH*. O experimento foi realizado utilizando amostra de um indivíduo afetado (propósito). Foi utilizada a plataforma *Agilent (Agilent Technologies)* contendo 180,000 oligonucleotídeos.

5.1.1.3.6. Sequenciamento Massivo em Paralelo (sequenciamento de nova geração).

O sequenciamento de todo o exoma foi realizado pela empresa Mendelics Análise Genômica (São Paulo, SP, BR) sob a responsabilidade dos Drs. João Paulo Kitajima e David Schlesinger. O preparo da biblioteca foi realizado na Mendelics utilizando o *kit* de captura de exons SureSelect V4 (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA). O exoma foi sequenciado com a plataforma Illumina Hiseq2000 (Illumina INC., San Diego, CA, USA).

A partir dos arquivos com os resultados gerados pelo sequenciamento massivo em paralelo, a análise bioinformática consistiu nos seguintes passos:

1. Verificação da consistência dos arquivos (cujo tamanho varia de dezenas a centenas de gigabytes) e cálculo de estatísticas básicas como número de sequências produzidas, com o programa *md5sum* (<http://www.md5summer.org/>).

2. Alinhamento das sequências das amostras a uma sequência referência do genoma humano (b37 GRC/NCBI). Nesta etapa, a localização de cada fragmento do DNA sequenciado (*read*) em relação ao genoma de referência é determinada. Foi utilizado o programa BWA (<http://bio-bwa.sourceforge.net/>), que considera a qualidade da sequência produzida para realizar a escolha de qual a melhor posição para alinhá-la.
3. Recalibragem das sequências alinhadas: como o alinhamento é feito sequência a sequência individualmente, torna-se necessário recalibrar o alinhamento realizado na fase anterior, visto que, em algumas situações, diferentes sequências oriundas da mesma região cromossômica apresentam resultados ligeiramente diferentes de mapeamento (devido a pequenas inserções, deleções ou repetições no genoma alvo). A recalibragem pode ser considerada um realinhamento, mas agora de forma contextualizada. Para tanto, foi utilizada a ferramenta GATK (<http://www.broadinstitute.org/gatk/>).
4. A partir do melhor alinhamento possível foi realizada a genotipagem da amostra, que consiste em determinar, com bases estatísticas, todos os alelos do genoma da amostra (as bases de cada par de alelos para uma dada posição no cromossomo). Esta etapa identifica SNPs e Indels (inserções e deleções) e foi realizada com a utilização do programa GATK. Em uma outra etapa desse processo, o programa R ExomeDepth (<http://cran.r-project.org/web/packages/ExomeDepth/index.html>) foi utilizado para identificação de CNVs (*Copy Number Variations* - grandes duplicações e deleções genômicas).
5. Recalibragem da genotipagem: os genótipos são recalibrados com o uso de outros parâmetros (não somente os dados do alinhamento) como dados populacionais. Falsos positivos são detectados e sinalizados a fim de que sejam descartados. Novamente, módulos do programa GATK realizaram

esta tarefa para SNPs e Indels. CNVs identificados não são recalibrados e passam diretamente para a próxima etapa da análise.

6. Anotação dos genótipos variantes detectados: esta etapa consiste em (a) anotar as variantes encontradas (com SnpEff, <http://snpeff.sourceforge.net/>); (b) filtrar de acordo com bancos públicos de variantes (por exemplo, os do projeto *1000 genomes*; www.1000genomes.org); e (c) estimar o efeito de cada variante na função da proteína em decorrência da mudança ou não do aminoácido com os programas VAAST (<http://www.yandell-lab.org/software/vaast.html>) e PolyPhen2 (<http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/>).
7. Priorização das variantes candidatas: com a base de dados gerada a partir das etapas anteriores, o pesquisador decide critérios para que sejam priorizadas algumas variantes. No nosso caso, foi priorizada a região cromossômica candidata mapeada, mas todos os genes já identificados correspondentes a DFNAs e DFNBs foram analisados e excluídos como os responsáveis pelo fenótipo.

5.1.3. Resultados

5.1.3.1. Avaliação Audiológica

A perda auditiva nessa família é neurosensorial, não sindrômica e profunda. O resumo dos resultados das audiometrias tonais dos indivíduos dessa família está mostrado na Figura 5.1.

A idade de manifestação média da perda auditiva foi de 21,3 anos, variando de 8 a 42.

5.1.3.2. Estudos Moleculares

5.1.3.2.1. Mutações excluídas

Mutações frequentemente associadas com perda auditiva foram excluídas como sendo a causa da perda auditiva nessa família. As mutações c.35delG e c.167delT presentes no gene *GJB2*, del*GJB6* (D13S1830) e del*GJB6* (D13S1854), a mutação

mitocondrial m.A1555G e outras mutações na região de código do gene *GJB2* foram excluídas no propósito. A mutação c.35delG foi excluída nos demais afetados.

5.1.3.2.2. Array-CGH

Foi realizada a investigação de alterações cromossômicas submicroscópicas por meio de *array-CGH* no propósito. No entanto, nenhuma alteração foi verificada.

5.1.3.2.3. Estudos de Ligação e Cálculos de *Lod Score*

A varredura genômica foi realizada com DNA de 11 indivíduos afetados por perda auditiva (propósito, II:3, II:5, II:7, II:9, II:11, III:1, III:3, III:11, III:12, III:13) e um indivíduo normal (II:1), que foi inicialmente considerado não penetrante, por ser pai de uma criança afetada por perda auditiva (III:1, Figura 3.2). Nesse caso, a análise foi realizada com penetrância estimada em 92%. Não foram encontrados resultados significativos de *Lod Score* de múltiplos pontos. O valor de *Lod Score* máximo para essa família poderia chegar a +3,24, valor estimado por meio de simulação.

Em uma segunda análise, observamos cautelosamente os resultados da avaliação audiológica do indivíduo III:1 (Figura 5.1, página 73). Constatamos que o padrão da perda auditiva desse indivíduo diferia do padrão das perdas dos demais afetados da família, sendo em média mais leve. Após essa observação, repetimos a análise, considerando esse indivíduo uma fenocópia e seu pai (II:1) normal. A penetrância, nesse caso, foi considerada completa. Foi encontrado um resultado significativo de *Lod Score* de múltiplos pontos (+3,15) no cromossomo 3. Os gráficos com os resultados dos cálculos de *Lod Score* de múltiplos pontos para todos os autossomos estão mostrados na Figura 5.2.

Essa região cromossômica havia sido mapeada anteriormente por Bonsch e col. (2001) e denominada DFNA18. Essa região compreende cerca de 10cM. A região crítica mapeada em nosso estudo compreende cerca de 20cM e está localizada na região 3: 119,033,130 - 140,159,284 e inclui a região de 10 cM mapeada por Bonsch e col.. No entanto, nenhum gene havia sido identificado como sendo a causa da perda auditiva na família alemã.

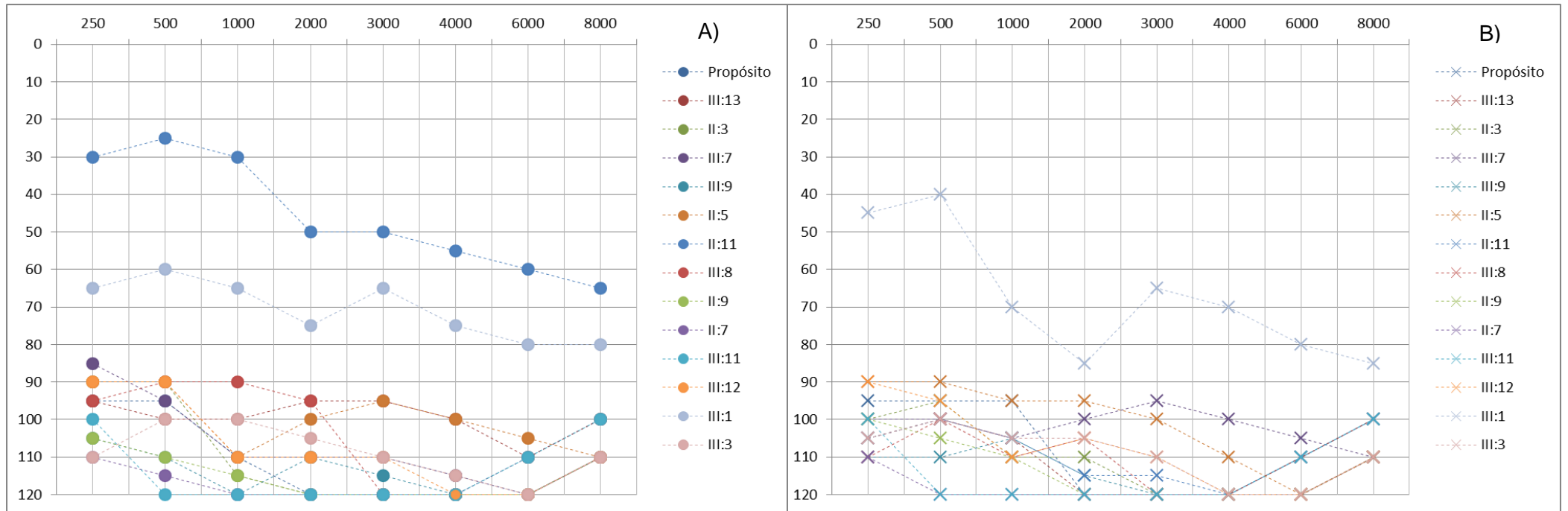


Figura 5.1: Audiogramas de 14 dos 16 indivíduos afetados por perda auditiva neurossensorial. Limiares auditivos até 20dB (decibéis – unidade de intensidade sonora, varia de 0 a 120) são considerados normais (Hz = Hertz – unidade de frequência da onda sonora, que varia de 250 a 8000). Os símbolos (●) e (X) representam os resultados obtidos através da via aérea de condução do som. A) Orelha direita; B) Orelha esquerda.

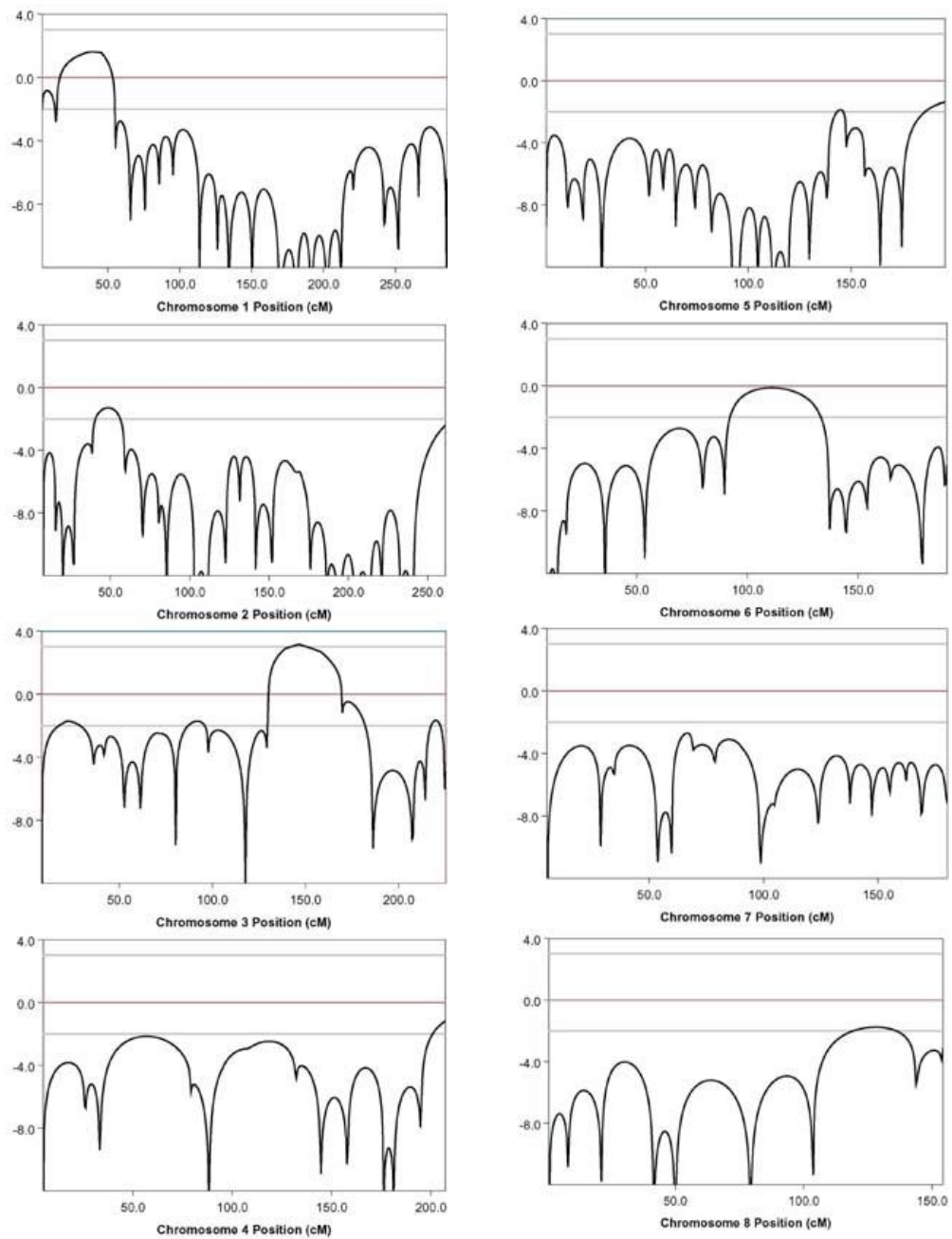
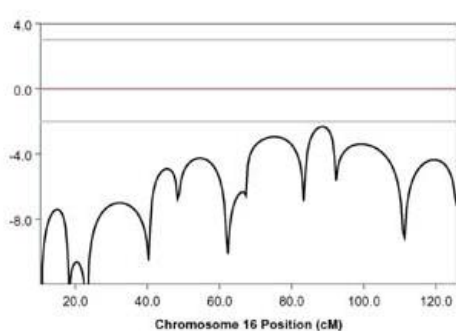
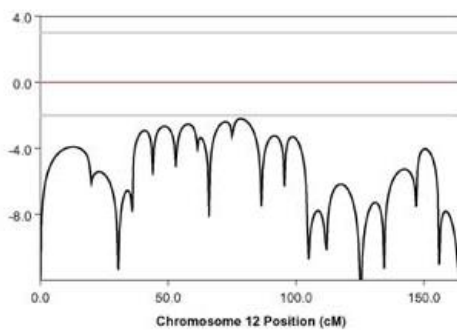
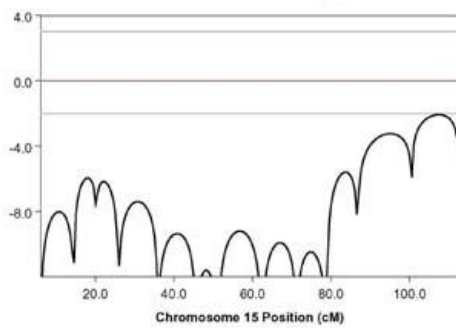
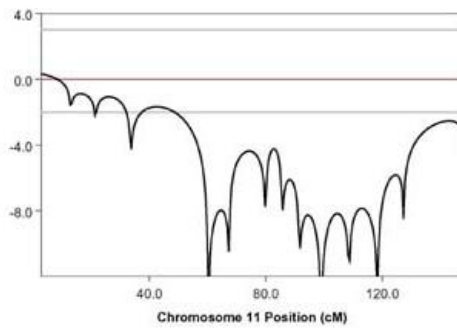
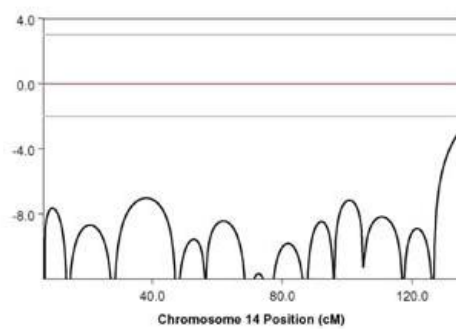
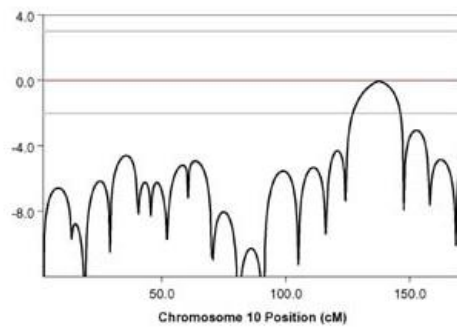
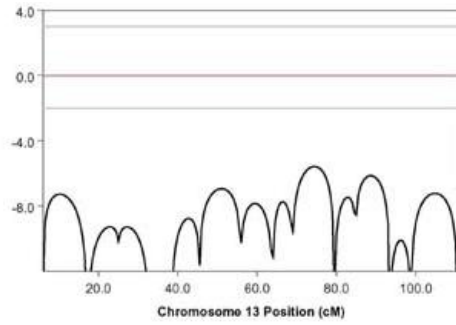
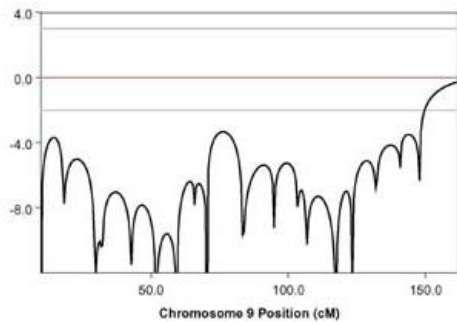
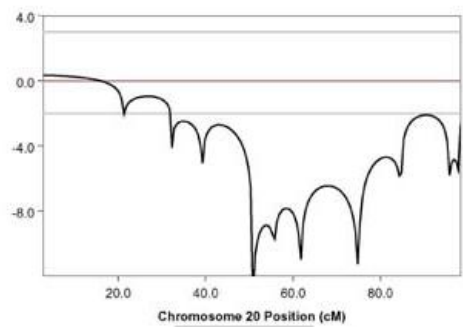
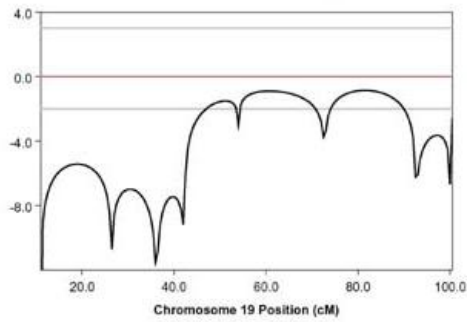
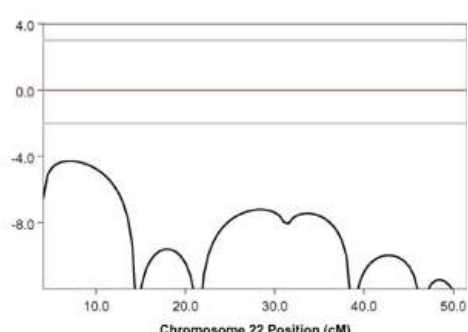
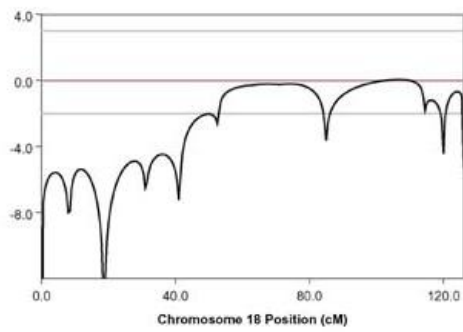
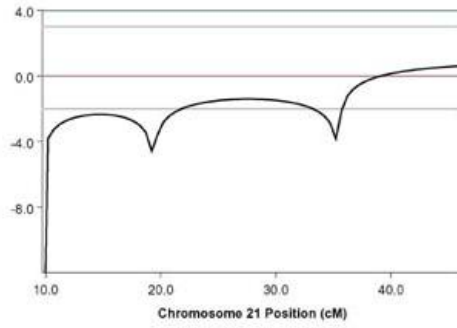
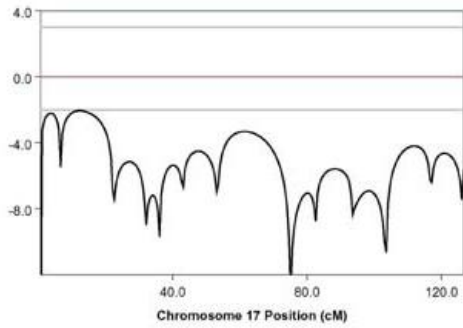


Figura 5.2: Resultados de *Lod Scores* de múltiplos pontos obtidos com resultados de marcadores do tipo microssatélites para cada autossomo, calculados pelo programa Merlin. As linhas horizontais de coloração cinza claro em cada gráfico indicam os valores convencionais para exclusão de ligação (-2.00) e ligação significativa (+3.00).



Continuação da Figura 5.2.



Continuação da Figura 5.2.

Solicitamos amostras de DNA de mais quatro indivíduos afetados (III:7, III:8, III:9, III:10) à Dra. Silvana Santos. Essas quatro amostras foram estudadas em relação aos 9 marcadores moleculares do tipo microssatélites dessa região cromossômica. Mesmo após a inclusão das novas amostras (a amostra III:10 foi considerada uma fenocópia, devido ao fato da mãe ter contraído rubéola durante o período da gravidez), não conseguimos detectar nenhum recombinante que pudesse restringir a região previamente mapeada (Figura 5.3), entre os marcadores D3S3576 e D3S1569, compreendendo uma região de aproximadamente 20cM.

5.1.3.2.4. Sequenciamento de Sanger de genes candidatos

Existem, ao todo, 240 genes conhecidos na região candidata delimitada pelos marcadores D3S3576 e D3S1569. Desses 240 genes, 48 se expressam na cóclea. Cinco deles se expressam na cóclea de humanos (*CLDN18*, *NPHP3*, *RAB6B*, *RAB7A*, *GATA2*) e 43 se expressam na cóclea de *Mus musculus* (*Slc12a8*, *MCM2*, *PODXL2*, *ABTB1*, *MGLL*, *SEC61A1*, *RUVBL1*, *EEFSEC*, *RPN1*, *ACAD9*, *CCDC48*, *GP9*, *RAB43*, *ISY1*, *CNBP*, *COPG*, *H1FX*, *MBD4*, *IFT122*, *RHO*, *PLXND1*, *TMCC1*, *PLS1*, *ATP2C1*, *MRPL3*, *ACAD11*, *CCRL1*, *UBA5*, *CDV3*, *TOPBP1*, *TF*, *SRPRB*, *SLCO2A1*, *AMOTL2*, *CEP63*, *EPHB1*, *STAG1*, *NCK1*, *DZIP1L*, *ARMC8*, *MRAS*, *CEP70*, *COPB2*) (www.genatlas.org).

Para facilitar nossa procura pelo gene responsável, utilizamos o *software* de busca por genes candidatos *PosMed* (<http://omicspace.riken.jp/PosMed/>). O *software* forneceu uma lista com 21 genes candidatos em ordem de prioridade (*CASR*, *RBP2*, *RBP1*, *GAP43*, *TF*, *RHO*, *NCK1*, *TRH*, *DRD3*, *PIK3CB*, *NR1L2*, *BFSP2*, *CD80*, *DIRC2*, *SOX14*, *GATA2*, *GSK3B*, *CD86*, *CLDN18*, *PCCB*, *ITGB5*). Com base nessa lista, consultamos o banco de dados do Genatlas (<http://www.genatlas.org/>) e, com base no padrão de expressão desses genes, foram selecionados aqueles que se expressam na cóclea humana. Os genes selecionados primeiramente para sequenciamento de Sanger foram *CLDN18*, *SLC12A8*, *GATA2*, *RAB6B* e *RAB7A* e nenhuma mutação patogênica foi identificada nesses genes.

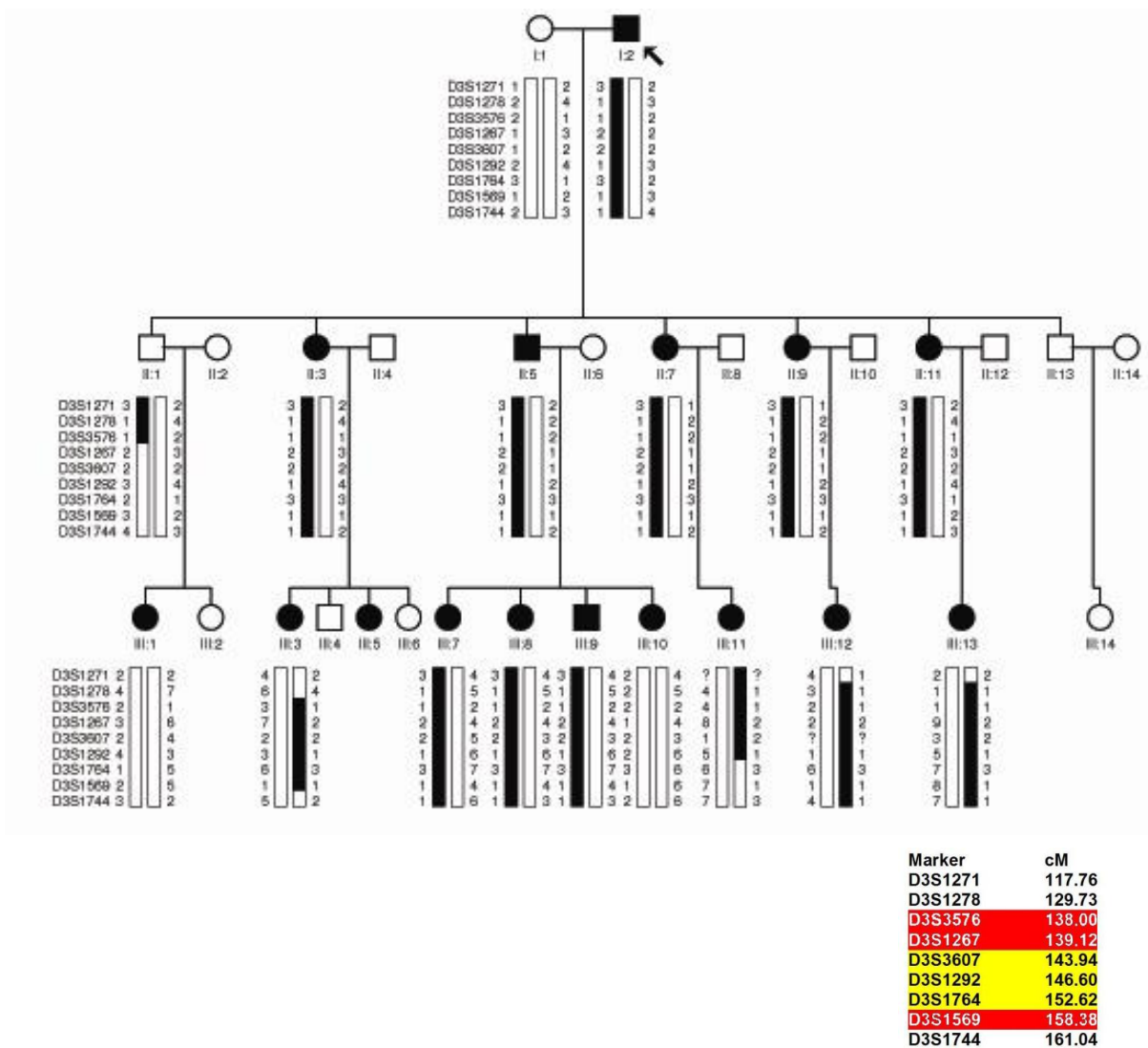


Figura 5.3: Genealogia da família mostrando os haplótipos do cromossomo 3 que compreendem a região DFNA18 e seus marcadores adjacentes, após a inclusão dos indivíduos II:7, III:8, III:9 e III:10. Em vermelho está apresentada a região mapeada por nós e em amarelo a região do DFNA18 mapeada anteriormente por Bonsch e col. (2001).

5.1.3.2.5. Sequenciamento Massivo em Paralelo

O sequenciamento massivo em paralelo foi realizado utilizando a plataforma Illumina (Illumina INC., San Diego, CA, USA) que permitiu a geração de 80.200.676 leituras de 99 bp cada, gerando uma cobertura aproximada de 124X para um exoma que cobre cerca de 64 Mbp. Foram observadas 26.121 variantes em heterozigose ao todo (mutações de sentido trocado, mutações de códon de parada prematuro, mutações de perda de códon de parada e mutações de matriz de leitura). Com base nas informações de mapeamento cromossômico, foi examinada a região que compreende as posições chr3:122.245.440-143.371.594. Essa região continha inicialmente somente 184 variantes *missense* (de sentido trocado) em heterozigose. A frequência das variantes selecionadas publicadas no banco de dados do *1000 genomes (1000 genome project, <http://www.1000genomes.org/>)* foi observada e foram selecionadas as variantes cujas frequências eram inferiores a 1%, o que reduziu o número de variantes a um total de 12 *missense*. Verificou-se se o aminoácido substituído era conservado entre espécies e qual a probabilidade da modificação do aminoácido causar algum dano a proteína (por meio dos programas Polyphen2 e Vaast). Após essa análise, foram selecionadas três variantes em heterozigose candidatas a explicar a perda auditiva, que são conservadas e foram indicadas como acarretando provável dano causado pela mudança do aminoácido nos dois programas:

- c.T1472C:p.L491P 138,188,315 no gene *ESYT3* (NM_031913).
- c.G1118A:p.G373D 142,840,776 no gene *CHST2* (NM_004267).
- c.C28T: p.R10W 142,383,107 no gene *PLS1* (NM_001145319).

Foi realizado o sequenciamento de Sanger da variante no gene *ESYT3* com a finalidade de observar a sua segregação na família. O padrão de segregação dessa variante na família está de acordo com a segregação do fenótipo. Esta variante está presente em heterozigose em 13 indivíduos afetados pela perda auditiva hereditária e ausente em quatro indivíduos normais e nas duas supostas fenocópias, os indivíduos III-1 e III-10 (Tabela 5.4).

Em vista desses resultados, foi realizado sequenciamento de Sanger do exon 15, onde está localizada a variante do gene *ESYT3*, utilizando-se as amostras de DNA de 47 probandos afetados por perda auditiva de provável herança autossômica dominante averiguados em nosso laboratório. Em um probando de uma família não aparentada à família 2 foi observada essa variante em heterozigose. No entanto, o sequenciamento de Sanger realizado com as amostras de DNA da família desse probando mostrou que a variante não segrega com o fenótipo. Além disso, experimentos de *Array-CGH* identificaram uma variação no número de cópias no gene *EYA4* nessa mesma família, que segrega com a perda auditiva e que provavelmente explica o fenótipo.

Foi realizado o sequenciamento de Sanger em busca da variante do gene *CHST2* nos demais membros da família 2 e foi verificado que a variante não segrega com o fenótipo (Tabela 5.4).

Foi realizado o sequenciamento de Sanger da variante no gene *PLS1* com a finalidade de estudar a segregação na família. O padrão de segregação dessa variante na família está de acordo com a segregação do fenótipo. Esta variante está presente em heterozigose em 13 indivíduos afetados pela perda auditiva hereditária e ausente nos 4 indivíduos normais e nas duas supostas fenocópias, os indivíduos III-1 e III-10 (Tabela 5.4).

Todos os genes já identificados como associados a perda auditiva de herança autossômica dominante e recessiva também foram analisados no exoma. Não foi encontrada nenhuma variante que pudesse explicar o fenótipo nessa família.

A variante c.C28T no gene *PLS1* foi triada em amostras de 47 probandos de famílias com indivíduos afetados por surdez dominante e não foi encontrada nessas amostras.

5.1.4. Discussão

Bonsch e col. (2001) estudaram uma família alemã cuja perda auditiva é de herança autossômica dominante não sindrômica. Nesse estudo, um novo locus responsável pela perda auditiva foi mapeado por meio de estudos de ligação com marcadores moleculares do tipo microssatélites. A região mapeada por Bonsch e col.,

Tabela 5.4: Segregação das variantes dos genes *ESYT3*, *CHST2* e *PLS1* na família 2.

| | <i>ESYT3</i> (c.T1472C) | <i>CHST2</i> (c.G1118A) | <i>PLS1</i> (c.C28T) | |
|---------|----------------------------|----------------------------|-------------------------|----------|
| I:2 | S | N | S | |
| II:3 | S | n. amp. | S | |
| II:5 | S | n. amp. | S | |
| II:7 | S | S | S | |
| II:9 | S | S | S | |
| II:11 | S | N | S | |
| III:3 | S | n. amp. | S | AFETADOS |
| III:7 | S | n. amp. | S | |
| III:8 | S | N | S | |
| III:9 | S | N | S | |
| III:11 | S | N | S | |
| III:12 | S | N | S | |
| III:13 | S | N | S | |
| I:1 | N | S | N | |
| II:2 | N | n. amp. | N | |
| *III:1 | N | n.amp. | N | NORMAIS |
| III:2 | N | n. amp. | N | |
| III:4 | N | S | N | |
| *III:10 | N | S | N | |

S - Presente; N - Ausente; n. amp. - não amplificado.; * Afetados, porém considerados fenocópia.

(2001) compreende cerca de 10cM e está localizada na região cromossômica 3q22, entre os marcadores moleculares D3S3606 e D3S1764, com um resultado de *Lod score* de dois pontos de +3,77 encontrado para o marcador D3S19292. No entanto, nenhum gene nesse locus foi sequenciado em busca da causa da perda auditiva.

Nossos resultados mostram que a região mapeada por nós incluiu a região do DFNA18. Nossa região, de cerca de 20 cM, é maior que a região mapeada por Bonsch e col. (2001).

O sequenciamento de todo o exoma identificou 3 genes e suas variantes como as prováveis causas que poderiam explicar o fenótipo na família. Dentre esses três,

somente o gene *ESYT3* se encontra na região previamente mapeada por Bonsch e col. (2001), mas essa variante foi excluída pelos nossos estudos de segregação nas famílias com surdez de herança autossômica dominante. Ela não ocorre no banco de dados *1000 genomes*.

A variante do gene *CHST2* não foi encontrada em nenhuma base pública de dados. A análise do possível dano que essa variação possa causar na proteína, utilizando o programa *PolyPhen2* (<http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/>) revelou que a probabilidade dessa variante ser patogênica é de 82,1%. Em humanos, esse gene se expressa no sistema hematopoiético (medula óssea), sistema nervoso (cérebro e medula espinhal), sistema reprodutivo (ovários), sistema respiratório (pulmões), sistema urinário (rins) nas células endoteliais cardíacas, linfáticas e epiteliais de revestimento, mas não se expressa na cóclea (www.Genatlas.org). O produto desse gene é uma sulfotransferase associada ao complexo de Golgi. O produto do gene *CHST2* também está relacionado à matriz extracelular. Foi especulado que esse gene teria relação com a otosclerose, condição que pode ser decorrente de problemas na matriz extracelular (Van Den Bogaert e col. 2004). Van Den Bogaert e col. (2004) mapearam o locus *OSTC5* na região 3q22-24, onde o gene *CHST2* está localizado. No entanto, não foi encontrada nenhuma mutação nesse gene em famílias com otosclerose. Nossos estudos de segregação excluíram a variante do gene *CHST2* como candidata a explicar o fenótipo da família.

A variante do gene *ESYT3* foi detectada em um (1) alelo em um total de 13,005 na versão atual do *RVS* do *NHLBI Exome Sequencing Project* (ESP). Em humanos, o gene se expressa no sistema digestório (nas glândulas salivares), no sistema endócrino (na glândula adrenal), no sistema reprodutivo (testículos), no sistema respiratório (laringe), no sistema urinário (rim), no sistema hematopoiético (medula óssea) e nos músculos, porém, não foi detectada sua expressão na cóclea (www.genatlas.org). A variante encontrada foi verificada quanto à sua possibilidade de causar dano na proteína pelo *software PolyPhen2* (<http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/>). O resultado da análise mostra uma alta probabilidade (91,3%) de que essa variante seja patogênica.

A proteína se localiza na membrana celular e tem como função regular a passagem de Ca^{2+} . Não foram encontradas referências bibliográficas sobre esse gene que o relacionem diretamente com audição. Os íons Ca^{2+} têm função tanto na manutenção do potencial elétrico coclear, como no funcionamento correto das células ciliadas. Alguns genes relacionados à homeostase iônica já são conhecidos como sendo responsáveis por perda auditiva. O gene *WFS1*, por exemplo, localizado no locus DFNA6/DFNA14/DFNA38 tem como função participar na formação de canais iônicos. Quando alterado o gene, os canais não são corretamente formados e a passagem de íons através do canal fica comprometida, causando um desequilíbrio homeostático (Bespalova e col., 2001; Young e col. 2001). O gene *CDH23* é responsável pela síndrome de USHER1D e sua função está relacionada com a organização dos estereocílios em feixes mediante a presença de íons Ca^{2+} (referencia). O estudo da variante no gene *ESYT3* em nossa coleção de amostras de DNA de probandos afetados por perda auditiva de herança autossômica dominante revelou a sua presença em um dos probandos. No entanto, o estudo da segregação dessa variante na família não evidenciou a sua segregação com o fenótipo. A causa da perda auditiva nessa família havia sido relacionada anteriormente à mutação do tipo variação do número de cópias no gene *EYA4*, que corresponde ao locus DFNA10 (Freitas E., comunicação pessoal).

A variante do gene *PLS1* não foi detectada em nenhuma base pública de dados genômicos. Em humanos, esse gene se expressa no sistema digestório (intestino, fígado e estômago), no sistema respiratório (pulmões), no sistema urinário (rim) e nas células epiteliais, mas não foi detectada sua expressão na cóclea em humanos (www.genatlas.org). O produto do gene interage com formas monoméricas e multiméricas de actina, incluindo as fibras de actina, ajudando na sua organização na ausência de íons cálcio (Lin e col., 1994). Em camundongos, esse gene se expressa na cóclea (Son e col., 2012), o que o torna um candidato interessante a explicar a perda auditiva. A variante encontrada foi avaliada quanto à sua possibilidade de causar dano na função da proteína, pelo software *PolyPhen2*

(<http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/>). O resultado mostra uma probabilidade de 99,9% dessa variante ser patogênica.

Em vista dos resultados de segregação observados para o gene *PLS1* e da função do gene descrita por Lin e col. (1994) e Son e col. (2012), podemos supor que a variante nesse gene é a melhor candidata a explicar o fenótipo, uma vez que esse gene tem como função auxiliar no correto desenvolvimento e formação da cóclea em camundongos (Son e col., 2012) e organizar as fibras de actina em filamentos (Lin e col., 1994) no intestino de humanos. Até o momento, a expressão desse gene não foi estudada em humanos. Sabemos que as células ciliadas são cruciais para o correto funcionamento da cóclea e o estudo de expressão e função desse gene na cóclea de humanos se faz necessário.

Informamos o grupo de pesquisadores que mapeou o DFNA18 sobre a variante candidata no gene *PLS1* e convidamos esse grupo a colaborar em nossa pesquisa. Aguardamos o resultado do estudo do gene *PLS1* na família alemã para definir a estratégia de continuação do nosso estudo. Além disso, todos os exons do gene *PLS1* serão em breve rastreados em busca de mutações na mesma coleção de 47 probandos afetados por perda auditiva de transmissão dominante. Esses resultados são importantes no processo de confirmação do papel do gene na origem da perda auditiva hereditária.

5.2. FAMÍLIA 3

Novo locus de perda auditiva de herança autossômica dominante mapeado no cromossomo 20.

Resumo

Uma família proveniente do estado de São Paulo com indivíduos afetados por perda auditiva de herança autossômica dominante foi molecularmente estudada. Foram coletadas amostras de DNA de 19 indivíduos (7 afetados e 12 aparentemente normais). A varredura genômica foi realizada por meio da tecnologia Affymetrix, utilizando *arrays* de SNPs de 50K (*GeneChip® Human Mapping K Array Xba 240*) em amostras de 7 afetados. O cálculo de *Lod Score* foi realizado utilizando o modelo de herança autossômica dominante com penetrância completa. Foi obtido um resultado de *Lod Score* igual a 1,8 para uma região localizada no cromossomo 20. O *Lod Score* máximo possível para essa família foi calculado com o pacote de programas *fastlink* e foi obtido um resultado de 1,8. Marcadores moleculares localizados no cromossomo 20 e separados cerca de 10 cM entre si foram utilizados para refinar a região candidata (*ABI PRISM® Linkage Mapping Set v. 2.5; Applied Biosystems, Foster City, CA*). A região candidata mais provável se localiza entre os marcadores D20S119 e D20S196 (13,24 cM). Sequenciamento massivo em paralelo do exoma foi realizado com amostras de 2 afetados e 3 variantes foram selecionadas como sendo as prováveis causas do fenótipo [*PREX1* (NM_020820), c.A1727G: p.Q576R 47,256,372; *SEMG1* (NM_198139), c.A934C: p.S312R 43,836, 872 e *NCOA3* (NM_181659), c.C2195G: p.S732C 46,268,423]. O sequenciamento pelo método de Sanger foi realizado em todas as amostras de DNA e verificou-se que somente a variante do gene *NCOA3* segrega com o haplótipo. As demais variantes foram excluídas pelos estudos de segregação. Não há locus de surdez (DFNA ou DFNB) mapeado previamente nessa região cromossômica. Nossos dados indicam que essa região seja um novo locus de perda auditiva de herança autossômica dominante e que a variante do gene *NCOA3* seja a causa mais provável do fenótipo. A mesma variante foi pesquisada em nossa coleção de 47

amostras de probandos de famílias com surdez dominante e não foi detectada. O gene *NCOA3* funciona como coativador transcricional para receptores nucleares e outros fatores de transcrição. O produto do gene não foi previamente relacionado à perda auditiva. No entanto, vários estudos indicam que o produto do gene *NCOA3* interfere na expressão de outro gene, chamado de *IGF1*. O produto do gene *IGF1* já foi previamente relacionado com perda auditiva tanto em camundongos quanto em humanos. A variante no gene *NCOA3* foi considerada a melhor candidata a explicar o fenótipo até o momento.

Novel locus for autosomal dominant hearing loss mapped to chromosome 20.

Abstract

A family ascertained in the state of São Paulo, Brazil, presenting with autosomal dominant hearing impairment was selected for mapping studies and 19 DNA samples from seven affected and 12 unaffected individuals were collected. Genomic scanning was performed using the 50k microarray technology from Affymetrix (GeneChip[®] Human Mapping K Array *Xba* 240) in samples from seven affected individuals. Multipoint *Lod Scores* were calculated under an autosomal dominant inheritance model with complete penetrance. A peak *Lod Score* of 1.8 was obtained for a region in chromosome 20. The maximum possible *Lod Score* in the pedigree is 1.8, calculated using fastlink package. Refinement of the genetic mapping using microsatellites from chromosome 20 was performed with an average spacing of 10 cM between markers (ABI PRISM[®] Linkage Mapping Set v. 2.5; Applied Biosystems, Foster City, CA). The most probable candidate region lies between markers D20S119 and D20S196 (13.24 cM). Exome sequencing was performed with samples from 2 affected individuals and 3 variants were selected as the most likely candidates [*PREX1* (NM_020820), c.A1727G: p.Q576R 47,256,372; *SEMG1* (NM_198139), c.A934C: p.S312R 43,836, 872 and *NCOA3* (NM_181659), c.C2195G: p.S732C 46,268,423]. Sanger sequencing was performed and only the *NCOA3* variant was found as segregating with the haplotype. The other variants were excluded due to segregation data. Since there are no previously mapped deafness loci (DFNA or DFNB) in this chromosomal region, our data suggest that we mapped a novel autosomal dominant deafness loci and *NCOA3* is the most probably cause of the phenotype. We search for this variant in our sample collection of 47 probands affected by autosomal dominant hearing loss and we did not find it. *NCOA3* functions as transcriptional coactivator of nuclear receptors and transcriptional factors. This gene was not previously related to hearing loss. However, previous studies showed the relationship between the products of *NCOA3* and *IGF1*. The *IGF1* gene was previously related with hearing loss in mice

and humans. The *NCOA3* variant is presently the best candidate to explain the hearing loss phenotype.

5.2.1. Pacientes e Métodos

5.2.1.1. Pacientes

A família 3 (Figura 3.3, pág. 31) foi averiguada em nosso serviço de aconselhamento genético no IBUSP. A família apresenta 15 afetados por perda auditiva, dos quais sete foram examinados por nós. A perda auditiva nessa família é de herança autossômica dominante de penetrância completa.

5.2.1.2. Avaliação audiológica

As audiometrias tonais dos indivíduos dessa família foram conduzidas por diferentes profissionais e instituições e foram fornecidas pelos próprios pacientes. No entanto, a maioria dos exames foi realizada pela fonoaudióloga Márcia Zucheratto, da DERDIC (Divisão de Educação e Reabilitação dos Distúrbios da Comunicação, PUC-SP).

5.2.1.3. Exames de imagem

Os exames de imagem de tomografia de ossos temporais e ressonância magnética do crânio foram solicitados e interpretados pela Dra. Jeanne Oiticica Ramalho Ferraz do Departamento de Otorrinolaringologia e Oftalmologia da Faculdade de Medicina de São Paulo - SP.

5.2.1.4. Estudos moleculares

Foram coletadas amostras de DNA de 19 indivíduos, 7 afetados (propósito III-6, III:4, III:9, IV:4, IV:7, IV:15, IV:16) e 12 fenotipicamente normais incluindo cônjuges (II:4, III:10, IV:3, IV:6, IV:10, IV:11, IV:12, IV:13, IV:14, V:3, V:4 e V:5). O DNA dos indivíduos dessa família foi extraído com o auxílio do equipamento Autopure LS (Gentra Systems, Minneapolis, Minnesota, USA). Os *kits* utilizados para a extração do DNA pela estação de extração estão descritos no capítulo 3.

5.2.1.4.1. Estudos de Ligação

A varredura genômica foi realizada por meio da tecnologia *Affymetrix* com o uso de “chips” de 50k, ou seja 50,000 SNPs (*GeneChip*[®] *Human Mapping K Array Xba* 240) em amostras de 7 indivíduos afetados, conforme instruções do fabricante.

5.2.1.4.2. Cálculos de *Lod Score*

Com o uso do programa MERLIN (Abecassis e col., 2002), os *Lod Scores* de múltiplos pontos foram calculados. As frequências alélicas foram calculadas pelo próprio *software* baseado nos genótipos observados na família. O programa MLINK do pacote de programas FASTLINK (Lahtrop e col., 1985; Cottingham e col., 1993) foi utilizado para a obtenção do resultado de simulação do *Lod Score* máximo observável nessa família. Foi considerada a penetrância completa (100%).

5.2.1.4.3. Busca de Genes Candidatos

O *software PosMed* (<http://omicspace.riken.jp/PosMed/>) foi utilizado para identificar os mais prováveis genes candidatos na região cromossômica mapeada. Após a obtenção da lista de prováveis genes candidatos, o banco de dados do portal <http://www.genatlas.org/> foi utilizado para identificar padrões de expressão desses genes e restringir a lista de candidatos para estudos de sequenciamento de Sanger.

5.2.1.4.4. Sequenciamento de Sanger

As sequências dos *primers* para sequenciamento das variantes dos genes *NCOA3*, *SEMG1*, *PREX1* selecionados estão listadas na Tabela 6.1. Os primers foram desenhados com o auxílio do *software* Primer3 (Rozen and Skaletsky, 2000).

As condições para a reação de PCR e, posteriormente, sequenciamento de Sanger, estão descritas no capítulo 3.

Tabela 6.1: Sequência dos *primers* utilizados na amplificação dos exons dos genes *NCOA3*, *SEMG1* e *PREX1* contendo as variantes candidatas.

| <i>Primers</i> | Sequência 5'-3' |
|----------------|----------------------------|
| NCOA3-F | GGCTGTACTTACATGGTATAAGAAGG |
| NCOA3-R | AGGGGAGGGTGGACACTTAC |
| SEMG1F | TCTACCCAAGATGAGCTCCTAG |
| SEMG1R | GCCTTTTGGCTATGCTCTT |
| PREX1F | CACAGAACTGGATCCATTCC |
| PREX1R | TCTAGGATTATGAGCTCTGGGA |

5.2.1.4.5. Array-CGH

A técnica de *microarray-Comparative Genomic Hybridization (array-CGH)* foi realizada para investigar as alterações cromossômicas submicroscópicas. A

investigação foi realizada com a amostra do propósito utilizando a plataforma *Agilent* (*Agilent Technologies*) contendo 180.000 oligonucleotídeos.

5.2.1.4.6. Sequenciamento massivo em paralelo (sequenciamento de nova geração)

O sequenciamento de todo o exoma foi realizado no Laboratório de Biotecnologia Animal (ESALQ-USP, Piracicaba, SP, BR) sob responsabilidade do Dr. Luiz Lehmann Coutinho. O preparo da biblioteca genômica foi realizado no CEGH utilizando os kits *TruSeq Library preparation kit*, *TruSeq exome enrichment kit* e *HiScan SBS kit* (Illumina INC., San Diego, CA, USA) conforme instruções do fabricante. O exoma foi sequenciado com a plataforma Illumina HiSeq 2000 (Illumina INC., San Diego, CA, USA).

A partir dos arquivos com os resultados gerados pelo sequenciamento massivo em paralelo, a análise bioinformática foi realizada no CEGH, com a ajuda do pesquisador Guilherme Yamamoto e consistiu nos seguintes passos:

1. Verificação da consistência dos arquivos (cujo tamanho varia de dezenas a centenas de gigabytes) e cálculo de estatísticas básicas como número de sequências produzidas com o programa `md5sum` (<http://www.md5summer.org/>).
2. Alinhamento das sequências das amostras a uma sequência referência do genoma humano (Hg19). Nesta etapa, a localização de cada fragmento do DNA sequenciado (*reads*) em relação ao genoma de referência é determinada. Foi utilizado o programa BWA (<http://bio-bwa.sourceforge.net/>), que considera a qualidade da sequência produzida para realizar a escolha de qual a melhor posição para alinhá-la.
3. Recalibragem das sequências alinhadas: como o alinhamento é feito sequência a sequência individualmente, torna-se necessário recalibrar o alinhamento realizado na fase anterior, visto que, em algumas situações, diferentes sequências oriundas da mesma região cromossômica apresentam resultados ligeiramente diferentes de mapeamento (devido a

pequenas inserções, deleções ou repetições no genoma alvo). A recalibragem pode ser considerada um realinhamento, mas agora de forma contextualizada. Para tanto, foi utilizada a ferramenta GATK (<http://www.broadinstitute.org/gatk/>).

4. A partir do melhor alinhamento possível foi realizada uma genotipagem da amostra, que consiste em determinar, com bases estatísticas, todos os alelos do genoma da amostra (as bases de cada par para uma dada posição no cromossomo). Esta etapa identifica SNPs e Indels (inserções e deleções) e foi realizada com a utilização do programa GATK. Em uma outra etapa desse processo, o programa Pindel (<https://trac.nbic.nl/pindel/>) foi utilizado para identificação de CNVs (*Copy Number Variations* - duplicações e grandes deleções genômicas).
5. Recalibragem da genotipagem: os genótipos foram recalibrados com o uso de outros parâmetros (não somente os dados do alinhamento), como dados populacionais. Falsos positivos foram detectados e sinalizados para serem descartados. Novamente, módulos do programa GATK realizaram esta tarefa para SNPs e Indels. CNVs identificados não são recalibrados e passam diretamente para a próxima etapa da análise.
6. Anotação dos genótipos variantes detectados: esta etapa consiste em (a) anotar as variantes encontradas (com Annovar, <http://www.openbioinformatics.org/annovar/>); (b) filtrar de acordo com bancos públicos de variantes (por exemplo, os do projeto *1000 genomes*, www.1000genomes.org); e (c) estimar o efeito de cada variante na função da proteína em decorrência da mudança do aminoácido com os programas SIFT (<http://sift.jcvi.org/>), PolyPhen2 (<http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/>) e *MutationTaster* (<http://www.mutationtaster.org/>).
7. Priorização das variantes candidatas: com a base de dados gerada a partir das etapas anteriores, o pesquisador decide quais critérios considerar para

que sejam priorizadas algumas variantes. No nosso caso, foi priorizada a região cromossômica candidata mapeada, mas todos os genes já identificados correspondentes a DFNA5 e DFNB1 foram analisados e excluídos como os responsáveis pelo fenótipo.

5.2.2. Resultados

5.2.2.1. Avaliação Audiológica

A perda auditiva nessa família é neurossensorial, não sindrômica e de grau moderado a profundo. A penetrância da perda auditiva nessa família é completa. O resumo dos resultados das audiometrias tonais dos indivíduos dessa família está mostrado na Figura 6.1.

A idade de manifestação média do quadro clínico na família é de 12,8 anos, variando desde o nascimento até os 28 anos de idade.

5.2.2.2. Outros estudos clínicos

Três indivíduos foram submetidos a exames de tomografia computadorizada de ossos temporais e ressonância magnética de crânio.

Em relação à probanda, os exames de tomografia computadorizada dos ossos temporais não identificaram nenhuma alteração. Entretanto, o exame de ressonância magnética do crânio identificou imagens puntiformes de alteração de sinal na substância branca dos hemisférios cerebrais de caráter inespecífico, podendo corresponder a zonas de gliose/microangiopatia. Esse resultado pode ser considerado inespecífico ou pode ter relação com a hipercolesterolemia, também detectada no sangue da paciente. O nível de colesterol total observado foi de 345mg/dL (valores \geq 240mg/dL são considerados altos).

Em relação ao indivíduo III:4, os exames de tomografia computadorizada de ossos temporais não identificaram nenhuma alteração. No entanto, o exame de ressonância magnética do crânio identificou imagens puntiformes de alteração de sinal na substância branca dos hemisférios cerebrais de caráter inespecífico, podendo corresponder a zonas de gliose/microangiopatia. Esse resultado também poderia ser relacionado à hiperlipidemia. O nível de colesterol total observado foi de 307mg/dL.

Em relação ao indivíduo III:9, não foram observadas alterações em nenhum dos exames de imagem realizados. O nível de colesterol total observado foi de 388mg/dL.

5.2.2.3. Estudos Moleculares

5.2.2.3.1. Mutações excluídas

Mutações frequentemente associadas com perda auditiva foram excluídas como sendo a causa da perda auditiva nessa família. Foram excluídas as mutações c.35delG e c.167delT presentes no gene *GJB2*, del*GJB6* (D13S1830) e del*GJB6* (D13S1854), a mutação mitocondrial m.A1555G e outras mutações na região de código do gene *GJB2* foram excluídas no propósito. A mutação c.35delG foi excluída nos demais afetados.

5.2.2.3.2. Array-CGH

Foi realizada a investigação de alterações cromossômicas submicroscópicas por meio de *array-CGH* no propósito. No entanto, nenhuma alteração foi verificada.

5.2.2.3.3. Estudos de Ligação e Cálculos de *Lod Score*

A varredura genômica foi realizada com DNA de 7 indivíduos afetados por perda auditiva (propósito, II:4, II:6, III:4, III:9, III:11, III:12). O máximo valor encontrado de *Lod Score* foi de 1,8 em uma região do cromossomo 20. Os resultados dos cálculos de *Lod Score* para todos os autossomos estão mostrados na Figura 6.2. O valor de *Lod Score* máximo para essa família poderia chegar a +1,8, valor estimado por meio de simulação.

Foi realizada análise de ligação também com marcadores moleculares do tipo microssatélites mapeados nesse cromossomo e verificamos que a região candidata mais provável se localiza entre os marcadores D20S107 e D20S100 (20: 37,522,294 - 52,953,811) compreendendo uma região de cerca de 29,04cM (Figura 6.3).

5.2.2.3.4. Busca por genes candidatos e Sequenciamento de Sanger

O *software* de busca por genes candidatos *PosMed* forneceu uma lista com 19 genes candidatos na região mapeada. Em ordem de prioridade, os genes apontados pelo *software PosMed* foram: *PTPN1*, *SDC4*, *ARFGEF2*, *MMP9*, *CD40*, *CEBPB*, *SLC13A3*, *NCOA3*, *ADNP*, *EYA2*, *SULF2*, *CTSA*, *SPINT2*, *PTGIS*, *KCNB1*,

B4GALT5, *RBPJL*, *ACOT8* e *DNTTIP1*. Consultamos, então, os dados do site <http://www.genatlas.org/> para verificar os locais de expressão dos genes candidatos indicados pelo programa PosMed, com a finalidade de selecionar os genes prioritários

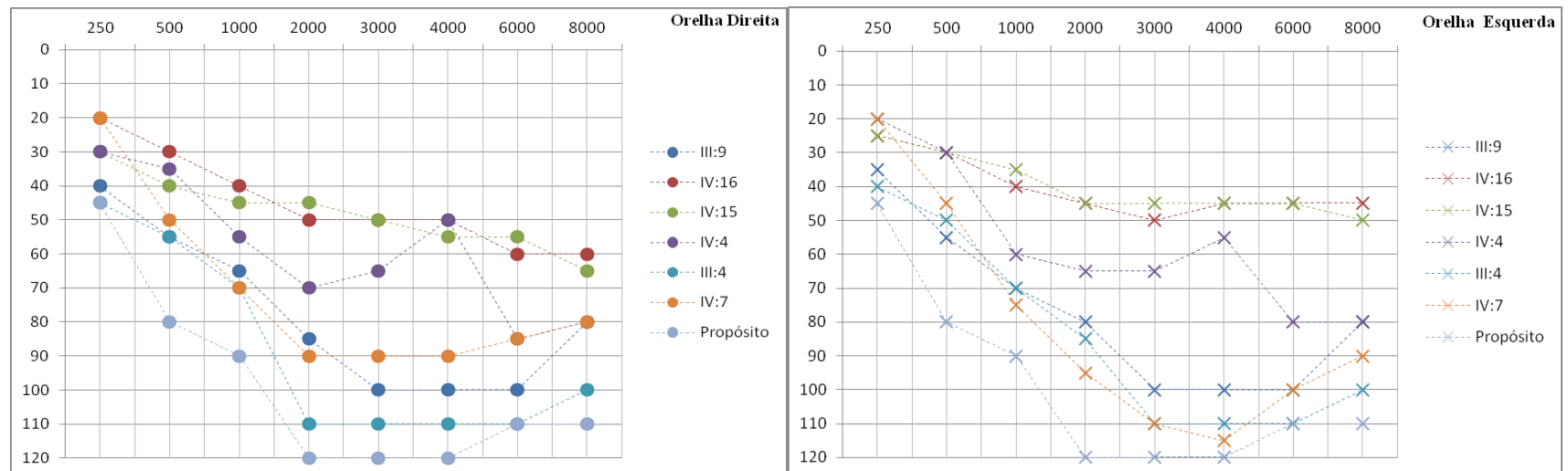


Figura 6.1: Audiogramas de 7 dos 15 indivíduos afetados por perda auditiva neurossensorial. Limiares auditivos até 20dB (decibéis – unidade de intensidade sonora, varia de 0 a 120) são considerados normais (Hz = Hertz – unidade de frequência da onda sonora, que varia de 250 a 8000). Os símbolos (●) e (X) representam os resultados obtidos através da via aérea de condução do som. A) Orelha direita; B) Orelha esquerda.

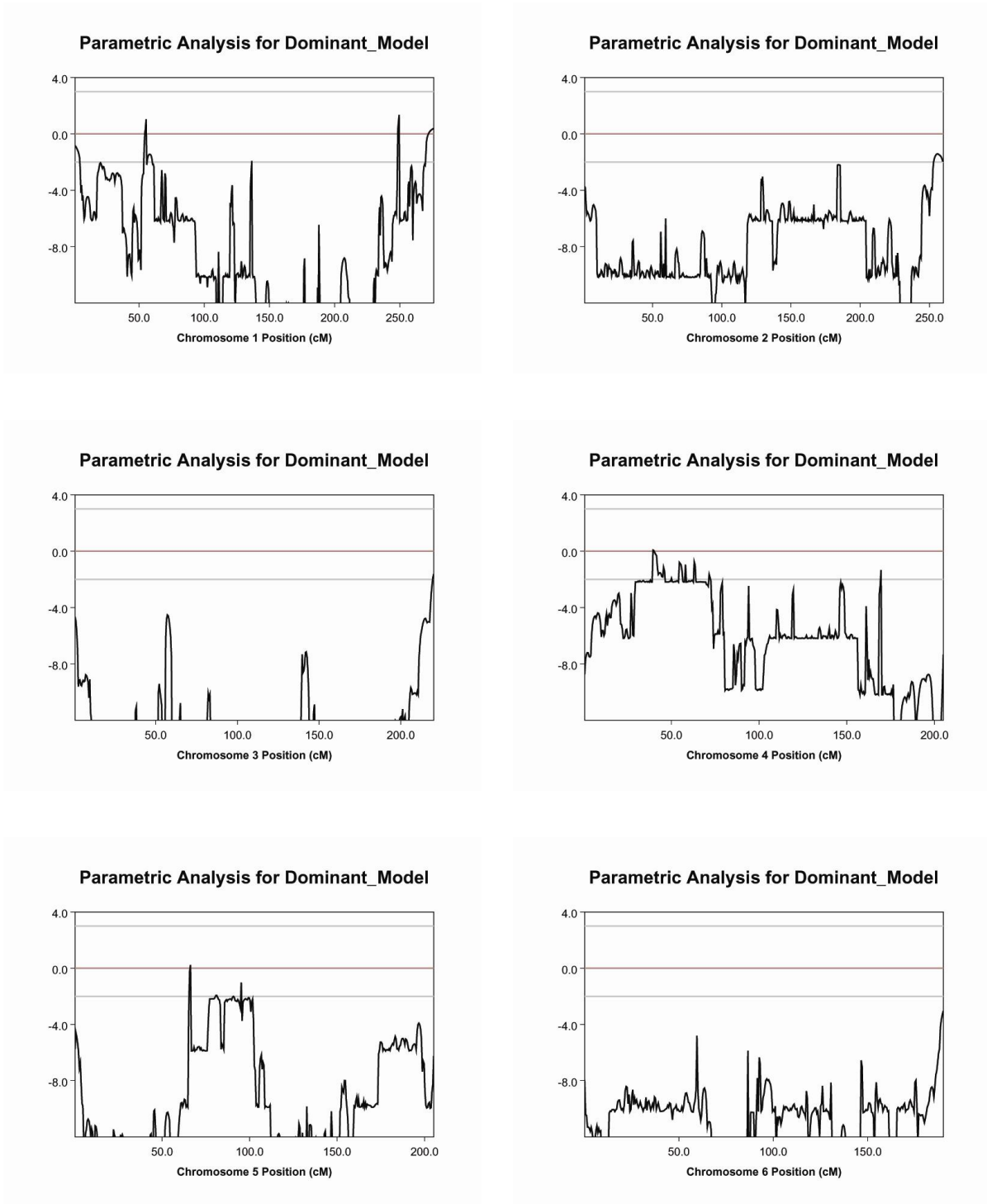
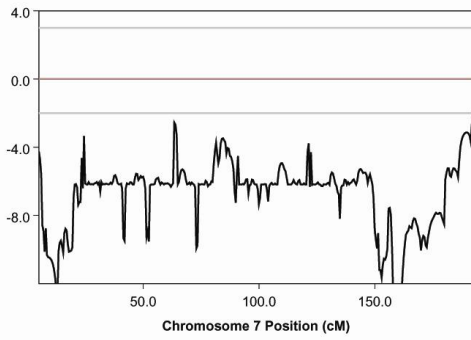
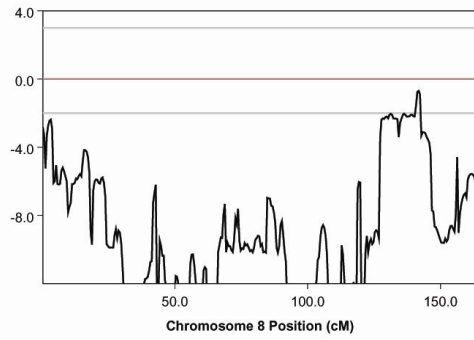


Figura 6.2: Resultados de *Lod Scores* de múltiplos pontos obtidos com resultados de *Arrays* de SNPs, para cada autossomo, calculados pelo programa Merlin. As linhas horizontais de coloração cinza claro em cada gráfico indicam os valores convencionais para exclusão de ligação (-2.00) e de ligação significativa (+3.00).

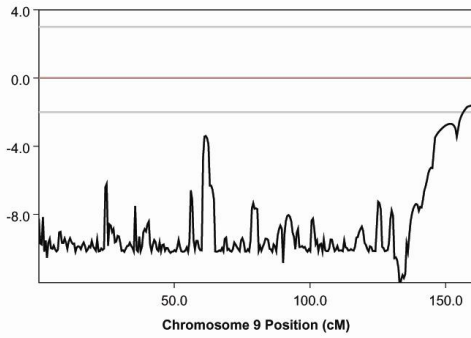
Parametric Analysis for Dominant_Model



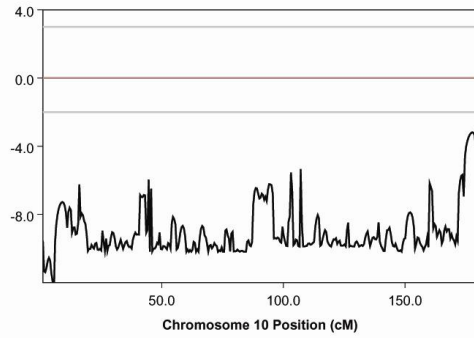
Parametric Analysis for Dominant_Model



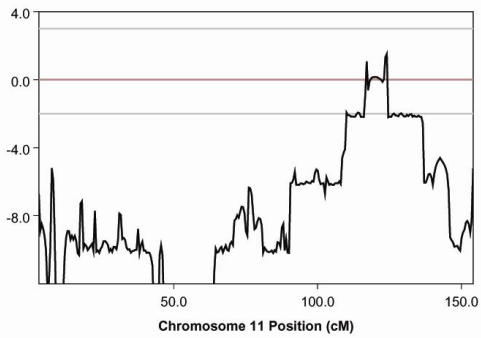
Parametric Analysis for Dominant_Model



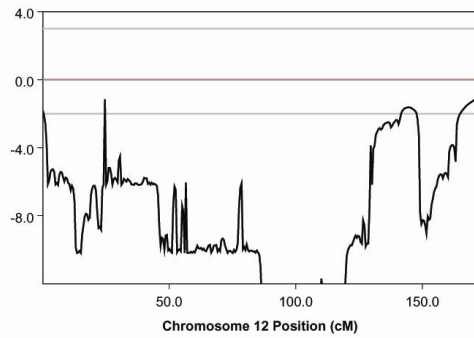
Parametric Analysis for Dominant_Model



Parametric Analysis for Dominant_Model

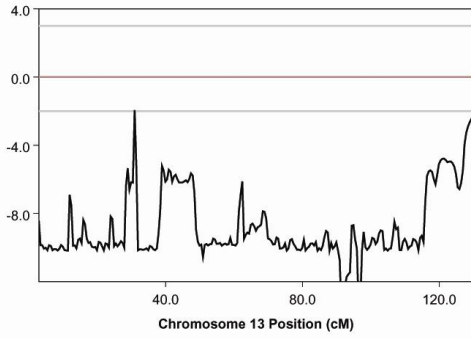


Parametric Analysis for Dominant_Model

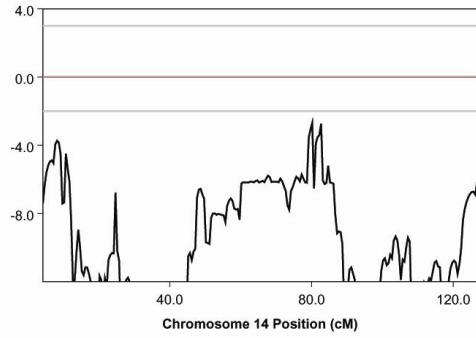


Continuação da Figura 6.2.

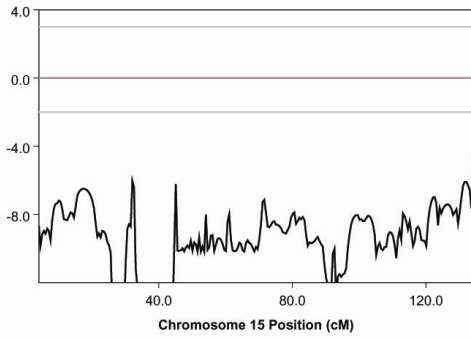
Parametric Analysis for Dominant_Model



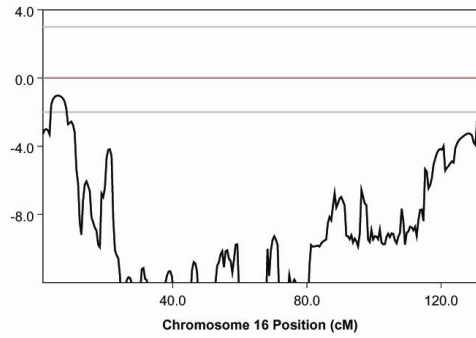
Parametric Analysis for Dominant_Model



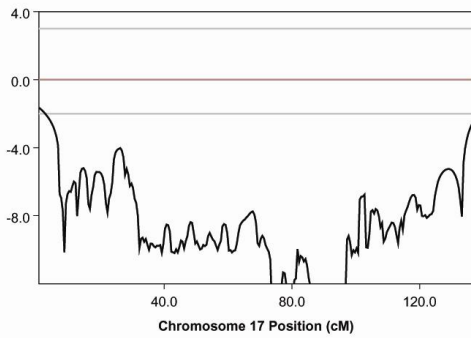
Parametric Analysis for Dominant_Model



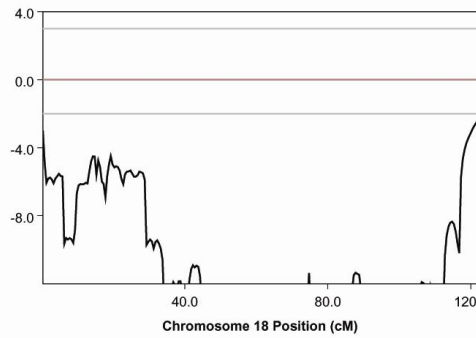
Parametric Analysis for Dominant_Model



Parametric Analysis for Dominant_Model

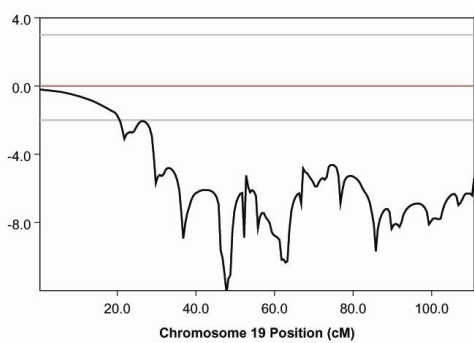


Parametric Analysis for Dominant_Model

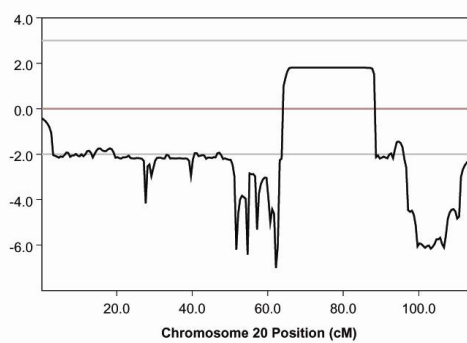


Continuação da Figura 6.2.

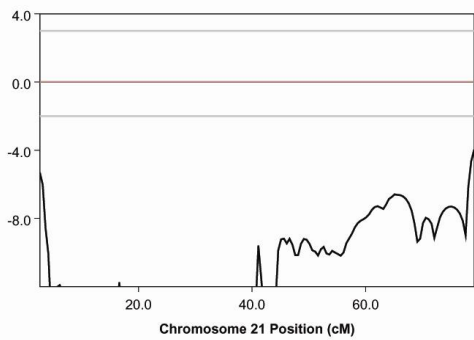
Parametric Analysis for Dominant_Model



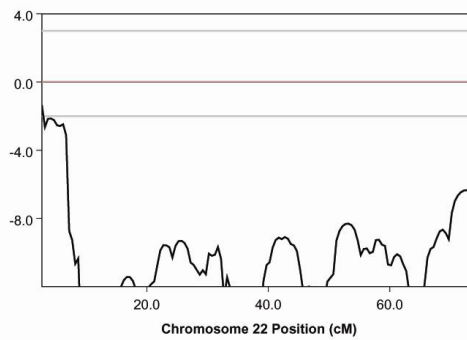
Parametric Analysis for Dominant_Model



Parametric Analysis for Dominant_Model



Parametric Analysis for Dominant_Model



Continuação da Figura 6.2.

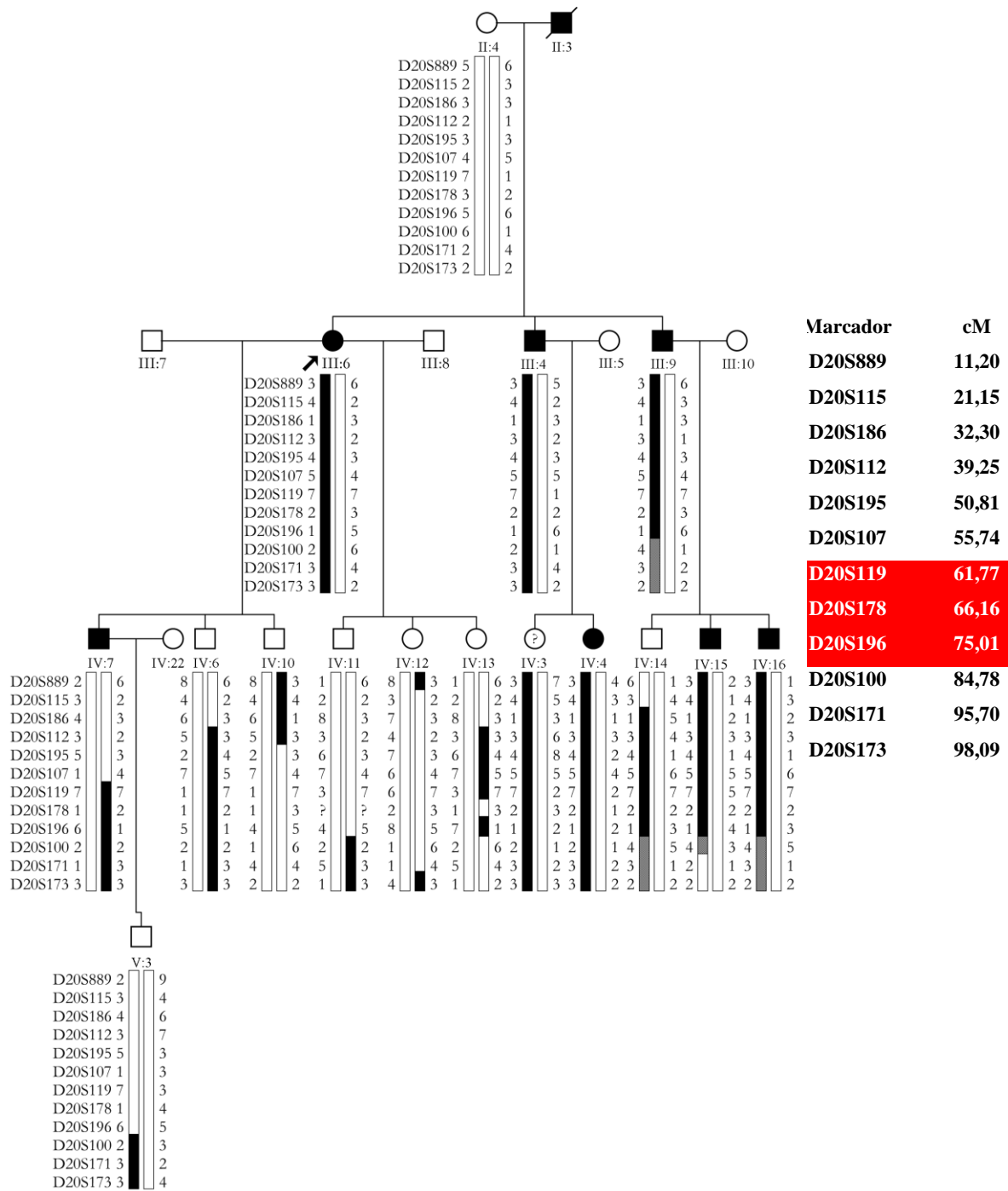


Figura 6.3. Genealogia resumida da família mostrando análise de ligação com marcadores moleculares do tipo microssatélites nos indivíduos afetados e normais. O indivíduo assinalado com o sinal de (?) se declarou normal. No entanto, a avaliação de emissões otoacústicas mostrou um resultado fora do padrão de normalidade. A numeração das gerações está de acordo com a numeração da Figura 3.1. Em vermelho está a região mapeada com base na segregação dos haplótipos.

para sequenciamento de Sanger. Existem 127 genes nessa região. Desses genes, nenhum se expressa na cóclea de humanos e cerca de 13 genes se expressam na cóclea de camundongos (*MAFB*, *PLCG1*, *ZHX3*, *PTPRT*, *L3MBTL1*, *MNF4A*, *ADA*, *RBPJL*, *PIGT*, *ACOT8*, *CTSA*, *SLC35C2*). O gene *SLC12A10* não se expressa na cóclea, mas sim no gânglio vestibulococlear.

No entanto, nenhum desses genes chegou a ser sequenciado pelo método de Sanger, pois duas amostras de indivíduos afetados dessa família foram enviadas para sequenciamento massivo em paralelo de todo o exoma.

5.2.2.3.5. Sequenciamento Massivo em Paralelo

O sequenciamento massivo em paralelo foi realizado utilizando a plataforma Illumina (Illumina INC., San Diego, CA, USA) que permitiu a geração de 80.200.676 *reads* de 99 bp cada, gerando uma cobertura aproximada de 124X para um exoma que cobre cerca de 64 Mbp. A versão atual do genoma de referência (hg19) foi utilizada no alinhamento dos *reads*.

O cromossomo 20 foi analisado e verificou-se que ele continha 2.218 variantes, somente do tipo *missense* (de sentido trocado) em heterozigose. Para reduzir a quantidade de variantes para estudo foi levada em conta a ocorrência das variantes em uma amostra de 19 indivíduos brasileiros, do CEGH com o exoma sequenciado. Era esperado que a variante ocorresse somente nos membros da família sequenciados, ou seja, somente duas vezes. Excluímos como candidatas todas as variantes que ocorreram cinco ou mais vezes nessa amostra. Dessa exclusão, restaram 13 variantes *missense*. Além disso, a frequência das variantes selecionadas foi observada no banco de dados *1000 genomes* (<http://www.1000genomes.org/>) e foram mantidas as variantes cujas frequências eram inferiores a 1%, reduzindo o número de variantes a um total de 7 *missense*. Verificou-se a região cromossômica mapeada (chr20:43649052 – 49561918) e reduziu-se a quantidade de variantes candidatas a 3:

- c.A1727G: p.Q576R 47,256,372 no gene *PREX1* (NM_020820).
- c.A934C: p.S312R 43,836,872 no gene *SEMG1* (NM_198139).
- c.C2195G: p.S732C 46,268,423 no gene *NCOA3* (NM_181659).

Foi realizado o sequenciamento de Sanger da região que contém a variante no gene *PREX1* com a finalidade de observar a segregação da variante com o fenótipo na família. Foi observado que essa variante não segrega com o fenótipo na família (Tabela 6.2).

Foi realizado o sequenciamento de Sanger da região que contém a variante no gene *SEMG1* nos demais membros da família e foi verificado que a variante não segrega com o fenótipo (Tabela 6.2).

O sequenciamento de Sanger da variante no gene *NCOA3* foi realizado nas amostras da família. Foi observado que a variante segrega com o fenótipo, além de ser observada em 4 indivíduos normais da família (Tabela 6.2). A segregação é compatível se considerarmos que esses 4 indivíduos normais são portadores não penetrantes da mutação. A análise com marcadores moleculares do tipo microssatélites permitiu verificar a segregação do haplótipo com o fenótipo e foi observado que todos os indivíduos normais que carregam a variante no gene *NCOA3* também carregam o haplótipo ligado à perda auditiva nessa família (Figura 6.3).

Foi realizado também o sequenciamento de Sanger do exon 15, que inclui a variante no gene *NCOA3*, utilizando as amostras de DNA de 47 probandos afetados por perda auditiva de herança autossômica dominante, averiguados em nosso laboratório. Nenhuma variante nesse exon foi observada nas amostras dos probandos. Mais 17 exons (1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16 e 17) foram sequenciados e nenhuma mutação foi encontrada nessa casuística. Restam ainda cinco exons a serem sequenciados nessas amostras.

5.2.3. Discussão

A região cromossômica mapeada por nós nessa família nunca foi mapeada previamente, o que indica possivelmente um novo locus de surdez. O sequenciamento

Tabela 6.2: Segregação das variantes dos genes *NCOA3*, *SEMG1* e *PREX1* na família 3.

| | <i>NCOA3</i> (c.C2195G) | <i>SEMG1</i> (c.A934C) | <i>PREX1</i> (c.A1727G) | |
|--------|----------------------------|---------------------------|----------------------------|----------|
| III:4 | S | S | N | |
| III:6 | S | S | S | |
| III:9 | S | S | S | |
| IV:4 | S | S | N | AFETADOS |
| IV:7 | S | S | N | |
| IV:15 | S | S | N | |
| IV:16 | S | S | N | |
| III:10 | N | S | N | |
| IV:3 | S | S | N | |
| IV:6 | S | S | N | |
| IV:9 | N | S | S | |
| IV:11 | N | S | S | |
| IV:12 | N | S | S | NORMAIS |
| IV:13 | S | S | N | |
| IV:14 | S | S | N | |
| V:3 | N | S | N | |
| V:4 | N | S | N | |
| V:5 | N | S | N | |

S- presente; N - ausente.

de todo o exoma identificou 3 genes e suas variantes como as prováveis causas do fenótipo na família.

A variante do gene *SEMG1* apresenta uma frequência de 0,04% nos bancos de dados *1000 genomes*. Através da análise do possível dano que essa variação possa causar na proteína, utilizando o programa PolyPhen2 (<http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2>), verificou-se que a probabilidade dessa variante ser patogênica é de 0,2%, sendo considerada não patogênica pelo programa. Em humanos, esse gene se expressa no sistema reprodutivo (vesícula seminal, epidídimo, próstata e vasos deferentes), no sistema respiratório (traqueia) e no músculo estriado esquelético, mas não se expressa na cóclea. O produto do gene tem participação na

formação de um gel, cuja finalidade é manter os espermatozoides juntos ao fluido seminal, formando o esperma (Liuja e col., 1989).

A variante do gene *PREX1* não foi encontrada em nenhuma base pública de dados. Através da análise do possível dano que essa variação possa causar na proteína, utilizando o programa PolyPhen2 (<http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2>), verificou-se que a probabilidade dessa variante ser patogênica é de 2,5%, sendo considerada não patogênica pelo programa. Em humanos, esse gene se expressa no sistema linfático (nódulos linfáticos, no baço e nas amígdalas), no sistema nervoso (nervos) e no sistema muscular estriado esquelético, mas não se expressa na cóclea. O produto do gene tem participação na regulação das reações oxidativas do NADPH (Welch e col., 2002).

A variante do gene *NCOA3* não ocorre no banco de dados *1000 genomes*. Através da análise do possível dano que essa variação possa causar na proteína, utilizando o programa PolyPhen2 (<http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2>), verificou-se que a probabilidade dessa variante ser patogênica é de 94%, sendo considerada patogênica pelo programa. O gene *NCOA3* também é conhecido como *AIB1*, *ACTR* e *p/CIP*. O seu produto tem função de coativador transcricional para receptores nucleares e outros fatores de transcrição (Liu e col., 2008). Esse gene é expresso no cérebro, células musculares do endotélio vascular, células musculares do intestino, células cancerígenas das glândulas mamárias, células cancerígenas da próstata, células de Sertoli e células do fígado (Xu e col., 2000). Liu e col. (2008) demonstraram que camundongos *knockout* para o gene *NCOA3*, em que somente os exons codificadores do domínio de ligação (11 e 12) foram deletados, exibem um retardo no crescimento pós-natal e apresentam baixos níveis séricos de IGF-I. A deleção completa do gene geralmente é letal nesse modelo.

Wang e col. (2000) verificaram que o gene *NCOA3* é expresso na glândula tireoide, timo, rim, pulmão, retina e pele. No mesmo estudo os camundongos *knockout* (com deleção de cinco exons) para o gene *NCOA3* exibiram um retardo no crescimento. Foi verificado que os níveis séricos de IGF-I estavam cerca de 30 – 50%

menores nos camundongos *knockout* e que havia uma assimetria facial em aproximadamente 10% dos camundongos com mutação em homozigose, por causa da baixa implantação da orelha externa. A audição desses animais não foi avaliada.

Em outro estudo, Cediell e col. (2006) estudaram camundongos *knockout* para o gene *IGF1* e verificaram que esses camundongos apresentavam perda aditiva neurossensorial.

Walenkamp e col. (2006) estudaram um indivíduo do sexo masculino com idade de 55 anos que apresentou retardo no crescimento intrauterino e pós-natal, microcefalia e perda auditiva neurossensorial e encontraram uma substituição em homozigose no gene *IGF1* (que substituía o aminoácido valina por metionina) resultando em inativação da proteína IGF-I. Essa proteína inativada não consegue se ligar ao receptor do IGF-I, causando o fenótipo observado no indivíduo estudado.

Em vista dos resultados encontrados, supomos que a variante encontrada em nosso estudo possa estar relacionada com a perda auditiva na família 3, uma vez que seu produto gênico, quando alterado em *knockouts*, aparentemente leva a uma diminuição nos níveis séricos do produto protéico IGF-I. Este último já foi identificado como relacionado à perda auditiva. No entanto, indivíduos que apresentam mutações no gene *IGF1* apresentam outras características clínicas, como retardo no crescimento (Woods e col., 1996; Bonapace e col., 2003). Os indivíduos da família estudada em nosso laboratório não relataram nenhum retardo no crescimento. Podemos supor que o efeito que variante do gene *NCOA3* cause no produto do gene *IGF1* não seja suficiente para inativar o gene *IGF1* completamente, mas somente reduzir sua expressão, o que levaria a um quadro mais brando em comparação com a inativação total que ocorre nas famílias descritas por Woods e col. (1996) e Bonapace e col. (2003).

Todos os genes já identificados como causadores de perda auditiva de herança autossômica dominante e recessiva também foram analisados no exoma e não foi encontrada nenhuma variante que pudesse estar relacionada ao fenótipo nessa família. Portanto, o melhor candidato a explicar a perda audição nessa família é o gene

NCOA3. Além do mais, o gene *NCOA3* estava presente na lista fornecida pelo programa *PosMed* como sendo um dos candidatos mais prováveis a explicar o fenótipo na família.

Alguns membros dessa família foram avaliados quanto aos níveis séricos de colesterol e foram constatados quadros de distúrbios metabólicos nos indivíduos avaliados. O gene *NCOA3* está relacionado com a diferenciação de adipócitos. Louet e col. (2006) estudaram a relação do gene com a diferenciação de células adiposas em camundongos normais e *knockout* e verificaram que a formação das células adiposas é inibida na ausência do gene. Essa relação do gene *NCOA3* com a diferenciação dos adipócitos pode ser explicada pela capacidade do gene de regular, direta ou indiretamente, a atividade de genes relacionados à adipogênese (Louet e col., 2006).

Em vista do quadro de hipercolesterolemia observado nessa família e da relação do gene *NCOA3* com o processo de diferenciação de adipócitos, é tentador especular que a mutação no gene *NCOA3* também possa ser responsável, além da perda auditiva, pelo perfil lipídico desses indivíduos. Estudos mais detalhados sobre níveis de lipídeos serão em breve conduzidos para aprofundar a possível relação entre o quadro de audição e o quadro de colesterol elevado presentes na família. Além disso, o término da triagem dos exons desse gene na casuística do laboratório está em andamento, como parte dos estudos necessários para se confirmar o papel do gene na deficiência auditiva.

5.3. FAMÍLIA 4

Mutação no gene *MYH9* (DFNA17) explica a perda auditiva de herança autossômica dominante em família do Sul do Brasil.

Resumo

Uma família com 11 afetados por perda auditiva de herança autossômica dominante foi submetida a estudos de mapeamento genético. Foram coletadas amostras de DNA de 23 indivíduos (10 afetados, 10 aparentemente normais e 3 com perda auditiva em altas frequências iniciada após os 40 anos de idade). A varredura genômica foi realizada por meio da tecnologia Affymetrix, utilizando *arrays* de SNPs de 50K (*GeneChip*[®] *Human Mapping K Array Hind 240*) em amostras de 7 afetados. O cálculo de *Lod Score* foi realizado utilizando o modelo de herança autossômica dominante com penetrância completa. Foi obtido um resultado de *Lod Score* máximo igual a 2,1 para uma região localizada no cromossomo 14 e de 1,9, no cromossomo 22. O *Lod Score* máximo para essa família foi calculado por simulação com o pacote de programas *Fastlink* e foi obtido um resultado de 2,4, considerando os 3 indivíduos com perda auditiva em altas frequências com início após os 40 anos de idade como afetados. Marcadores moleculares do tipo microssatélites localizados no cromossomo 14 e no cromossomo 22 foram utilizados para refinar as regiões candidatas (*ABI PRISM*[®] *Linkage Mapping Set v. 2.5*; *Applied Biosystems, Foster City, CA*). A região candidata mais provável no cromossomo 14 se localiza entre os marcadores D14S288 e D14S276 (8,85 cM) e a região candidata mais provável no cromossomo 22 se encontra próxima à região do marcador D22S283. O sequenciamento massivo em paralelo do exoma foi realizado em amostras de 3 afetados e 2 variantes foram selecionadas como sendo as possíveis causas do fenótipo no cromossomo 14 [*PTGDR* (NM_000953), c.G894A:p.R298R 52,741,496 e *PTGER2* (NM_000956), c.T247G:p.C83G 52,781,513] e uma variante foi selecionada como sendo a possível causa do fenótipo no cromossomo 22 [*MYH9* (NM_002473), c.G2114A:p.R705H 36,702,021]. O sequenciamento pelo método de Sanger foi realizado em todas as

amostras de DNA da família e as variantes nos genes *PTGDR* e *PTGER2* foram excluídas pelos estudos de segregação. No entanto, foi observado que a variante no gene *MYH9* segrega com o fenótipo em todos os membros afetados da família, mas não ocorre nos três indivíduos com perda somente em altas frequências. O produto do gene *MYH9* é uma miosina de cadeia pesada que tem função na mobilidade das fibras de actina. Esse gene foi identificado previamente como sendo responsável por perda auditiva por Lawani e col. (2000) e corresponde ao DFNA17. Em vista da mutação observada por nós ser a mesma identificada por Lawani e col. (2000) e já relacionada à perda auditiva, atribuímos a perda auditiva nessa família a essa mutação.

***MYH9* mutation (DFNA17) causes non-syndromic autosomal dominant hearing loss in a Brazilian family.**

Abstract

A family presenting with autosomal dominant hearing impairment with 11 affected individuals was ascertained for mapping studies and 23 DNA samples were collected (10 affected individuals, 10 unaffected and 3 affected by hearing loss only in high frequencies, with age of onset at 40 years old). Genomic scanning was performed using the 50k microarray technology from Affymetrix (GeneChip[®] Human Mapping K Array *Hind* 240) in 7 affected individuals. Multipoint *Lod Scores* were calculated under an autosomal dominant inheritance model with complete penetrance. A *Lod Score* of 2.1 was obtained to region in chromosome 14 and a *Lod Score* of 1.9 was obtained in chromosome 22. The maximum possible *Lod Score* in the pedigree is 2.4, calculated using Fastlink package (the 3 affected individuals by hearing loss only in high frequencies, with age of onset at 40 years old were considered affected by the same disorder). Refinement of the genetic mapping using microsatellites from chromosomes 14 and 22 was performed (ABI PRISM[®] Linkage Mapping Set v. 2.5; Applied Biosystems, Foster City, CA). The most probable candidate region in chromosome 14 lies between markers D14S288 and D14S276 (8.85 cM) and in chromosome 22, the most likely region maps near marker D22S283. Exome sequencing was performed with samples from 3 affected individuals and 2 variants were selected as the most likely candidates in chromosome 14 [*PTGDR* (NM_000953), c.G894A:p.R298R 52,741,496 and *PTGER2* (NM_000956), c.T247G:p.C83G 52,781,513], and one variant was selected as the most likely candidate in chromosome 22 [*MYH9* (NM_002473), c.G2114A:p.R705H 36,702,021]. Sanger sequencing was performed with all DNA samples and the *PTGDR* and *PTGER2* variants were excluded as the cause of hearing loss, after segregation studies. However, the *MYH9* variant segregates with the phenotype in all affected members, except for the three individuals with hearing loss in high frequencies. The product of *MYH9* is a myosin heavy chain related to motility of actin bundles. This gene was

previously described as a cause of hearing loss by Lawani e col. (2000) and corresponds to DFNA17. The mutation identified in our study is the same described by Lawani e col. (2000) as the cause of hearing loss. Thus, we concluded that this mutation explains the hearing loss phenotype.

5.3.1. Pacientes e Métodos

5.3.1.1. Pacientes

A família 4 (Figura 3.4) foi averiguada na cidade de Porto Alegre - RS, região Sul do Brasil pela Dra. Carolina Fischinger Moura de Souza, Médica Geneticista, no Hospital das Clínicas, Porto Alegre. A família apresenta 11 afetados por perda auditiva. A perda auditiva nessa família é neurosensorial e exibe herança autossômica dominante de penetrância aparentemente completa.

5.3.1.2. Avaliação audiológica

As audiometrias tonais dos indivíduos dessa família foram realizadas por diferentes profissionais e instituições da cidade de Marauí-RS e São Paulo-SP e foram enviadas pela Dra. Carolina Fischinger Moura de Souza.

5.3.1.3. Estudos moleculares

Foram coletadas amostras de DNA de 23 indivíduos, dos quais 10 afetados com perda auditiva em todas as frequências (I:1, II:3, II:11, II:13, II:15, II:17, propósito, III:15, III:16 e III:17), 10 fenotipicamente normais (I:2, III:1, III:3, III:6, III:10, III:11, III:13, III:14, III:18 e IV:1) e 3 indivíduos com status duvidoso, pois apresentam perda auditiva somente em altas frequências, com início dos sintomas somente após os 40 anos de idade (II:1, II:5, II:9). O DNA das amostras dessa família foi extraído pela técnica de fenol/clorofórmio.

5.3.1.3.1. Estudos de Ligação

A varredura genômica foi realizada por meio da tecnologia *Affymetrix* com o uso de “chips” de 50k, ou seja 50,000 SNPs (*GeneChip® Human Mapping K Array Hind* 240) em 7 indivíduos afetados, conforme instruções do fabricante.

5.3.1.3.2. Cálculos de *Lod Score*

Com o uso do programa MERLIN (Abecassis e col., 2002), os *Lod Scores* de múltiplos pontos foram calculados. As frequências alélicas foram calculadas pelo próprio *software* baseado nos genótipos observados na família. O programa MLINK do pacote de programas FASTLINK (Lahtrop e col., 1985; Cottingham e col., 1993) foi utilizado para a obtenção do resultado de simulação do *Lod Score*

máximo observável nessa família. Foi considerada a penetrância completa (100%) nos cálculos de *Lod Score* dessa família.

5.3.1.3.3. Busca de Genes Candidatos

O *software PosMed* (<http://omicspace.riken.jp/PosMed/>) foi utilizado para identificar os mais prováveis genes candidatos na região cromossômica mapeada. Após a obtenção da lista de prováveis genes candidatos o banco de dados do portal <http://www.genatlas.org/> foi utilizado para identificar padrões de expressão desses.

5.3.1.3.4. Sequenciamento de Sanger

As sequências dos *primers* para sequenciamento dos exons contendo as variantes dos genes *PTGDR* e *PTGER2* no cromossomo 14 e *MYH9* no cromossomo 22 estão listadas na tabela 7.1. Os *primers* foram desenhados com o auxílio do programa Primer3 (Rozen and Skaletsky, 2000).

Tabela 7.1 Sequência dos *primers* utilizados na amplificação do exon que contém a variante dos genes *PTGDR*, *PTGER2* e *MYH9*.

| <i>Primers</i> | Sequência 5' – 3' |
|-----------------|---------------------------|
| <i>PTGDR-F</i> | TAAGTGAATCCATTGCTGCC |
| <i>PTGDR-R</i> | AATCATGGTTCTTTGACTGAAAATG |
| <i>PTGER2-F</i> | TCAGACCCTCTTCCTCCA |
| <i>PTGER2-R</i> | CGAAGAGCATGAGCATCGT |
| <i>MYH9-F</i> | TTCTCCGACTGTTCTAGGCAC |
| <i>MYH9-R</i> | AAGAGAAGGAGGTGGGGAAG |

As condições para a reação de PCR e, posteriormente, sequenciamento de Sanger estão descritas no capítulo 3.

5.3.1.3.5. Array-CGH

A investigação das alterações cromossômicas submicroscópicas foi realizada por meio da técnica de *Array-CGH*. O experimento foi realizado utilizando amostra de um indivíduo afetado (propósito). Foi utilizada a plataforma *Agilent* (*Agilent Technologies*) contendo 180.000 oligonucleotídeos.

5.3.1.3.6. Sequenciamento massivo em paralelo (sequenciamento de nova geração)

O sequenciamento de todo o exoma foi realizado no Laboratório de Biotecnologia Animal (ESALQ-USP, Piracicaba, SP, BR) sob responsabilidade do Dr. Luiz Lehmann Coutinho. O preparo da biblioteca genômica foi realizado no CEGH utilizando os kits *TruSeq Library preparation kit*, *TruSeq exome enrichment kit* e *HiScan SBS kit* (Illumina INC., San Diego, CA, USA) conforme instruções do fabricante. O exoma foi sequenciado com a plataforma Illumina HiSeq 2000 (Illumina INC., San Diego, CA, USA).

A partir dos arquivos com os resultados gerados pelo sequenciamento massivo em paralelo, a análise bioinformática foi realizada no CEGH, com a ajuda do pesquisador Guilherme Yamamoto e consistiu nos seguintes passos:

1. Verificação da consistência dos arquivos (cujo tamanho varia de dezenas a centenas de gigabytes) e cálculo de estatísticas básicas como número de sequências produzidas com o programa md5sum (<http://www.md5summer.org/>).
2. Alinhamento das sequências das amostras a uma sequência referência do genoma humano (Hg19). Nesta etapa, a localização de cada fragmento do DNA sequenciado (*reads*) em relação ao genoma de referência é determinada. Foi utilizado o programa BWA (<http://bio-bwa.sourceforge.net/>), que considera a qualidade da sequência produzida para realizar a escolha de qual a melhor posição para alinhá-la.
3. Recalibragem das sequências alinhadas: como o alinhamento é feito sequência a sequência individualmente, torna-se necessário recalibrar o alinhamento realizado na fase anterior, visto que, em algumas situações, diferentes sequências oriundas da mesma região cromossômica apresentam resultados ligeiramente diferentes de mapeamento (devido a pequenas inserções, deleções ou repetições no genoma alvo). A recalibragem pode ser considerada um realinhamento, mas agora de forma

contextualizada. Para tanto, foi utilizada a ferramenta GATK (<http://www.broadinstitute.org/gatk/>).

4. A partir do melhor alinhamento possível foi realizada uma genotipagem da amostra, que consiste em determinar, com bases estatísticas, todos os alelos do genoma da amostra (as bases de cada par para uma dada posição no cromossomo), esta etapa identifica SNPs e Indels (inserções e deleções), essa etapa foi realizada com a utilização do programa GATK. Em uma outra etapa desse processo, o programa Pindel (<https://trac.nbic.nl/pindel/>) foi utilizado para identificação de CNVs (*Copy Number Variations* - duplicações e grandes deleções genômicas).
5. Recalibragem da genotipagem: os genótipos foram recalibrados com o uso de outros parâmetros (não somente os dados do alinhamento), como dados populacionais. Falsos positivos foram detectados e sinalizados para serem descartados. Novamente, módulos do programa GATK realizaram esta tarefa para SNPs e Indels. CNVs identificados não são recalibrados e passam diretamente para a próxima etapa da análise.
6. Anotação dos genótipos variantes detectados: esta etapa consiste em (a) anotar as variantes encontradas (com Annovar, <http://www.openbioinformatics.org/annovar/>); (b) filtrar de acordo com bancos públicos de variantes (por exemplo, os do projeto *1000 genomes*; www.1000genomes.org); e (c) estimar o efeito de cada variante na função da proteína em decorrência da mudança do aminoácido com os programas SIFT (<http://sift.jcvi.org/>), PolyPhen2 (<http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/>) e *MutationTaster* (<http://www.mutationtaster.org/>).
7. Priorização das variantes candidatas: com a base de dados gerada a partir das etapas anteriores, o pesquisador decide quais critérios considerar para que sejam priorizadas algumas variantes. No nosso caso, foram priorizadas as duas regiões cromossômicas candidatas mapeadas, mas todos os genes

já identificados correspondentes a DFNAs e DFNBs foram analisados e excluídos como os responsáveis pelo fenótipo.

5.3.2. Resultados

5.3.2.1. Avaliação Audiológica

A perda auditiva nessa família é neurosensorial, não sindrômica de intensidade leve a profunda. A penetrância da perda auditiva nessa família é aparentemente completa. O resumo dos resultados das audiometrias tonais de alguns indivíduos dessa família estão mostrados na Figura 7.1.

A idade média de manifestação da perda auditiva nos indivíduos da família foi de 21,8 anos, variando desde 4 anos de idade até 41 anos.

Três casos foram considerados de status duvidoso devido ao padrão da perda auditiva. Os indivíduos II:1, II:5 e II:9 apresentam a deficiência auditiva somente em altas frequências, tendo sido os primeiros sintomas percebidos após os 40 anos de idade.

5.3.2.2. Estudos Moleculares

5.3.2.2.1. Mutações excluídas.

Mutações frequentemente associadas com perda auditiva foram excluídas como sendo a causa da perda auditiva nessa família. As mutações c.35delG e c.167delT presentes no gene *GJB2*, del*GJB6* (D13S1830) e del*GJB6* (D13S1854), a mutação mitocondrial m.A1555G e outras mutações na região de código do gene *GJB2* foram excluídas no propósito.

5.3.2.2.2. Array-CGH

Foi realizada a investigação de alterações cromossômicas submicroscópicas por meio de *array-CGH* no propósito. No entanto, nenhuma alteração foi verificada.

5.3.2.2.3. Locus DFNAs excluídos

Durante o período do doutorado da Dra. Karina Lezirovitz, foram utilizados em estudos de ligação análises de microssatélites ligados a vários DFNAs já mapeados. Os microssatélites utilizados para investigar a ligação do fenótipo com os DFNAs permitiu excluir os seguintes loci de perda auditiva de herança autossômica

dominante: DFNA4, DFNA7, DFNA8, DFNA10, DFNA13, DFNA18, DFNA20, DFNA22, DFNA24, DFNA25, DFNA28, DFNA30, DFNA32, DFNA36, DFNA37, DFNA39, DFNA40, DFNA44 e DFNA47.

5.3.2.2.4. Estudos de Ligação e Cálculos de *Lod Score*

A varredura genômica foi realizada com DNA de 7 indivíduos afetados por perda auditiva (propósito, I:1, II:13, II:15, II:17, III:15, III:17). O programa Merlin foi utilizado para cálculos de *Lod Score* de múltiplos pontos. O máximo valor de *Lod Score* obtido foi de +2,1 em uma região do cromossomo 14. Os gráficos com os resultados dos cálculos de *Lod Score* de múltiplos pontos para todos os autossomos estão mostrados na Figura 7.2. O valor de *Lod Score* máximo para essa família poderia chegar a +2,4, valor estimado por meio de simulação (nessa simulação os três indivíduos de status duvidoso foram considerados afetados pelo mesmo tipo de surdez que os demais afetados).

Entretanto, observou-se que outros cromossomos também apresentaram picos de *Lod Score* positivos (cromossomos 3 e 22). Com o objetivo de verificar os resultados observados para os cromossomos 3 e 22, análises com marcadores moleculares microssatélites mapeados nesses cromossomos foram realizadas em amostras de 20 indivíduos (10 afetados, 3 de status duvidoso e 7 fenotipicamente normais). Verificamos que o padrão de segregação dos haplótipos nos indivíduos analisados não confirmou ligação do fenótipo da perda auditiva no caso do cromossomo 3 (dados não mostrados). No entanto, há resultados sugestivos de ligação na região do marcador D22S283 (Figura 7.3). O cálculo de *Lod Score* para o cromossomo 22 foi realizado, através dos resultados obtidos com microssatélites e foi obtido um valor igual a +3,00. Um segundo cálculo foi realizado considerando os indivíduos de status duvidoso como afetados e foi obtido um valor de *Lod Score* igual a 0,0 (Figura 7.4).

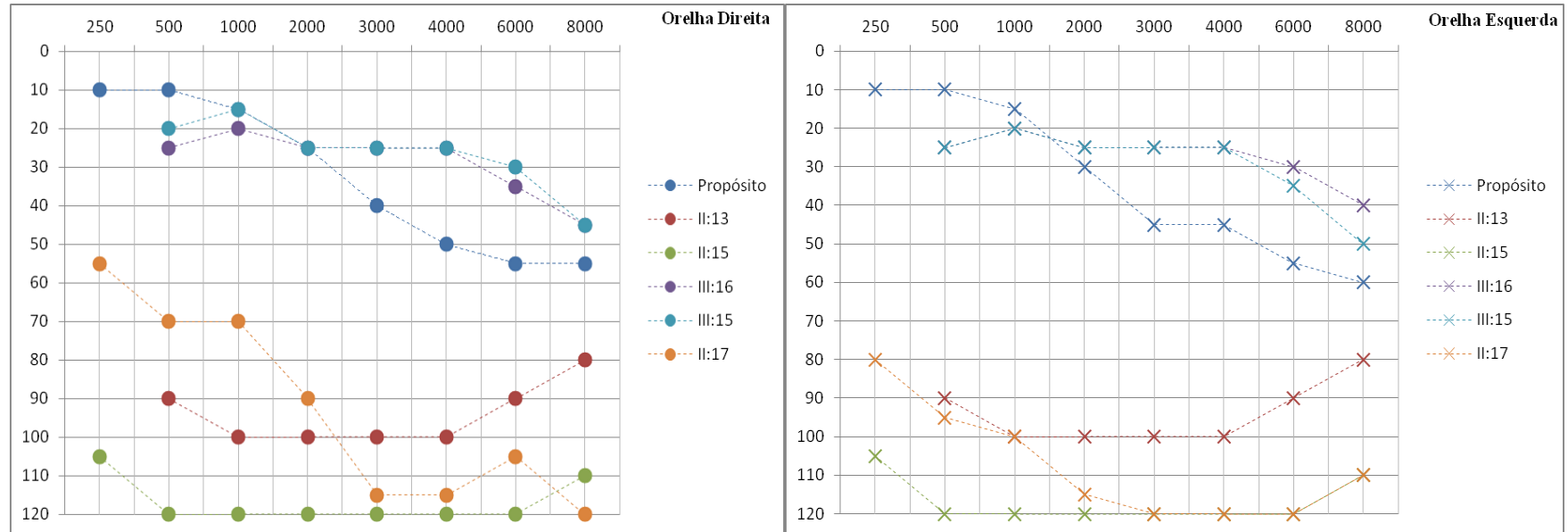


Figura 7.1: Audiogramas de 6 dos 11 indivíduos afetados por perda auditiva neurossensorial. Limiares auditivos até 20dB (decibéis – unidade de intensidade sonora, varia de 0 a 120) são considerados normais (Hz = Hertz – unidade de frequência da onda sonora, que varia de 250 a 8000). Os símbolos (●) e (X) representam os resultados obtidos através da via aérea de condução do som. A) Orelha direita; B) Orelha esquerda.

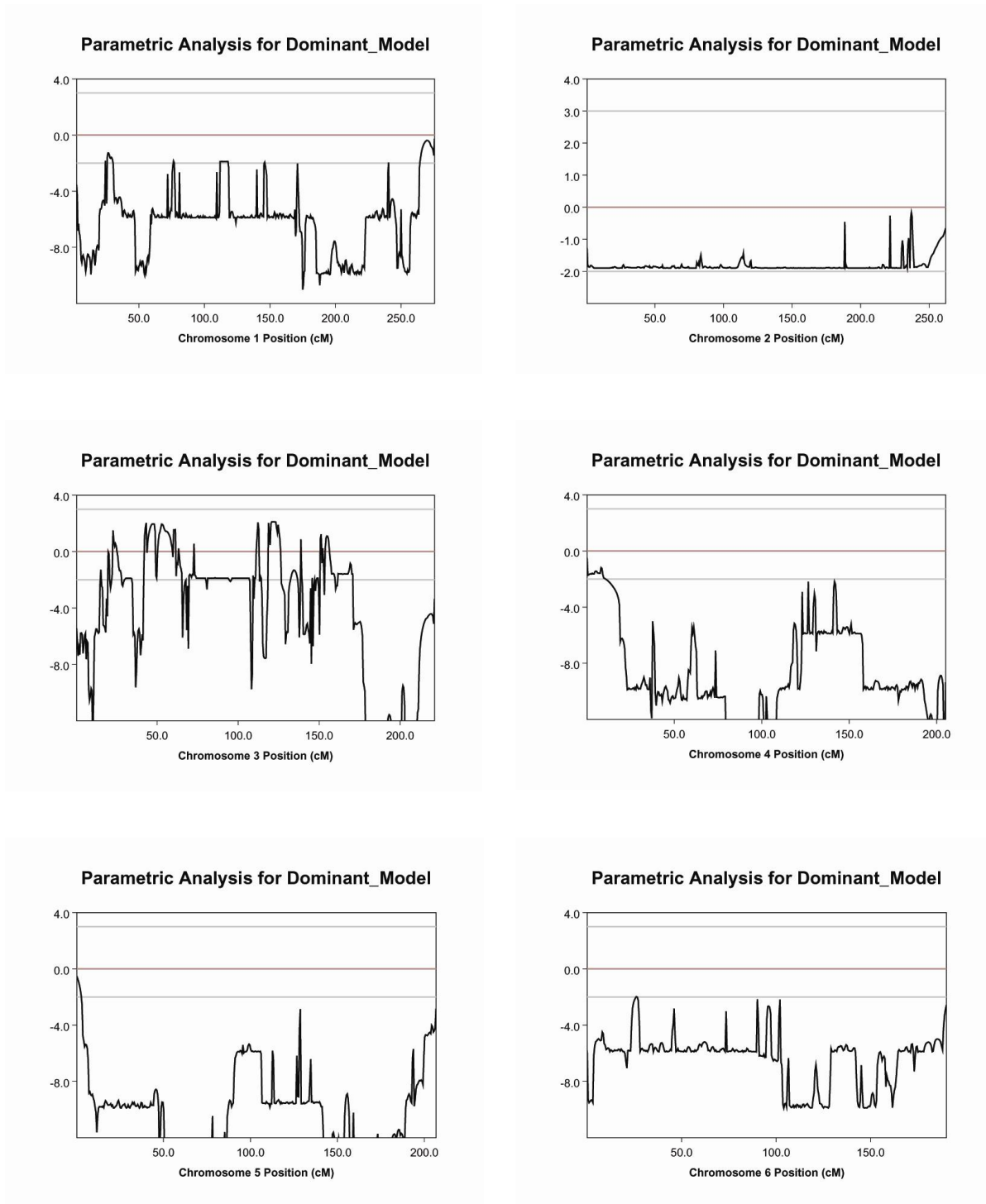
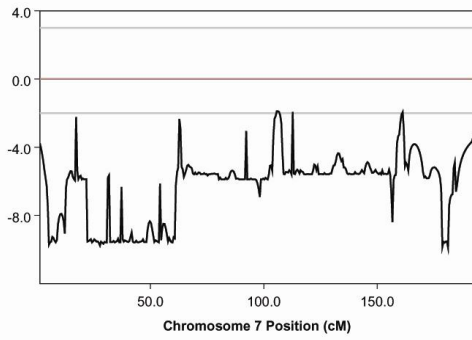
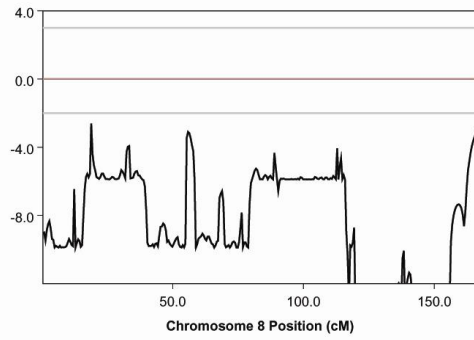


Figura 7.2: Resultados de *Lod Scores* de múltiplos pontos obtidos com resultados de *Arrays* de SNPs para cada autossomo, calculado pelo programa Merlin. As linhas horizontais de colocação cinza claro em cada gráfico indicam os valores convencionais para exclusão de ligação (-2.00) e de ligação significativa (+3.00).

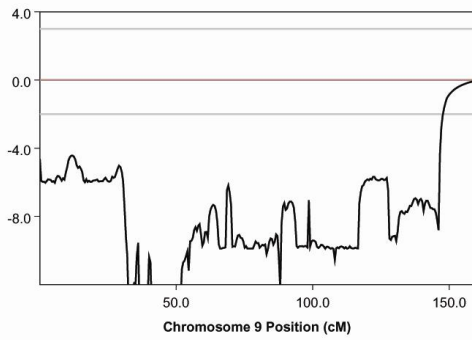
Parametric Analysis for Dominant_Model



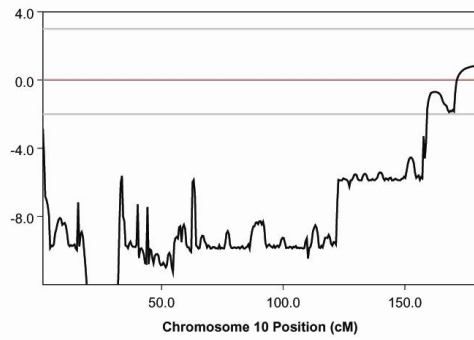
Parametric Analysis for Dominant_Model



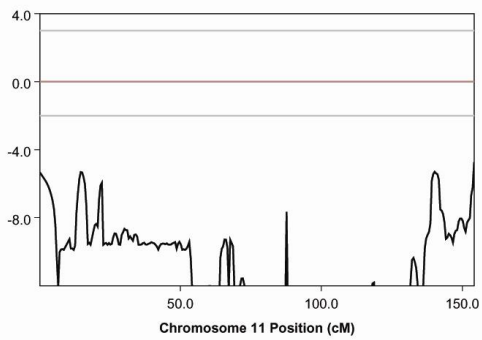
Parametric Analysis for Dominant_Model



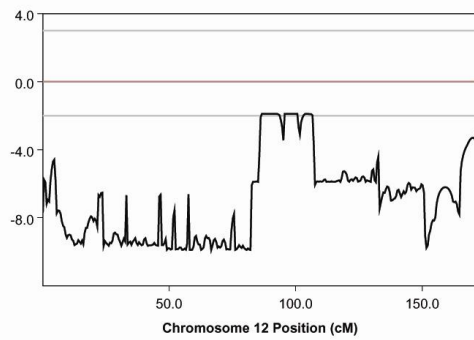
Parametric Analysis for Dominant_Model



Parametric Analysis for Dominant_Model

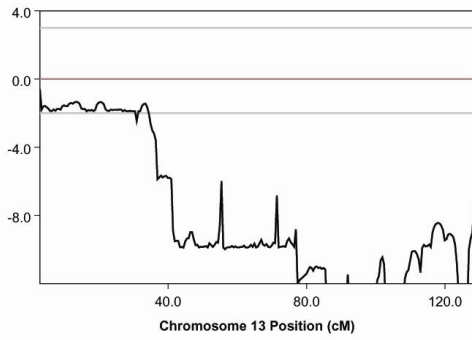


Parametric Analysis for Dominant_Model

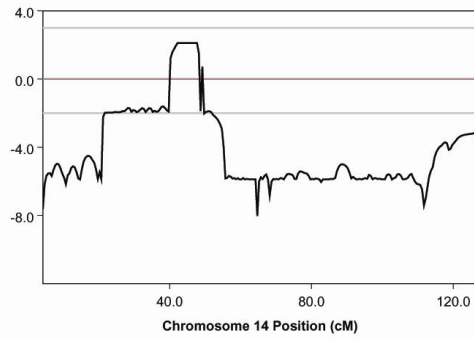


Continuação da Figura 7.2

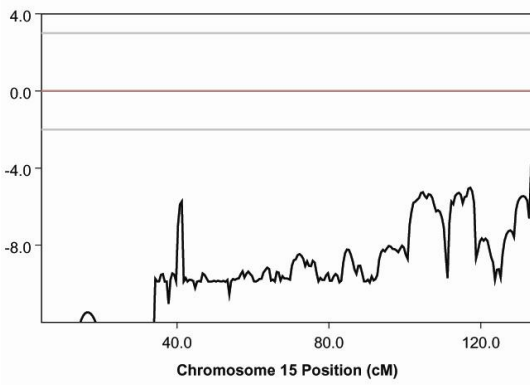
Parametric Analysis for Dominant_Model



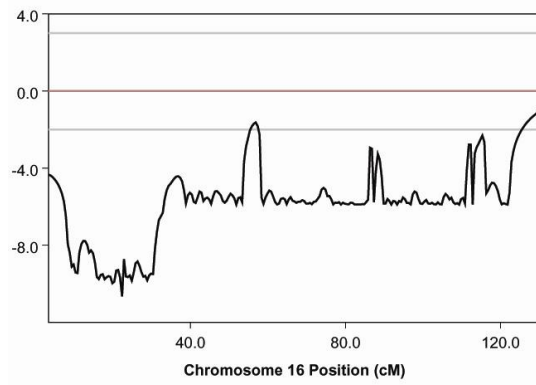
Parametric Analysis for Dominant_Model



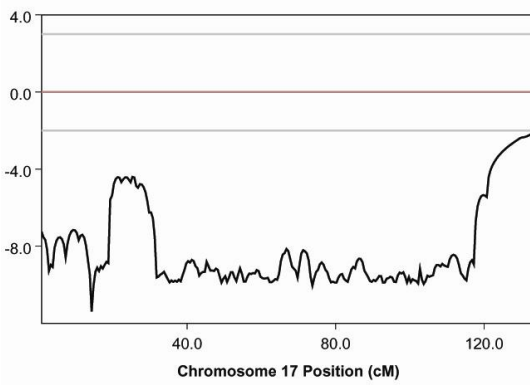
Parametric Analysis for Dominant_Model



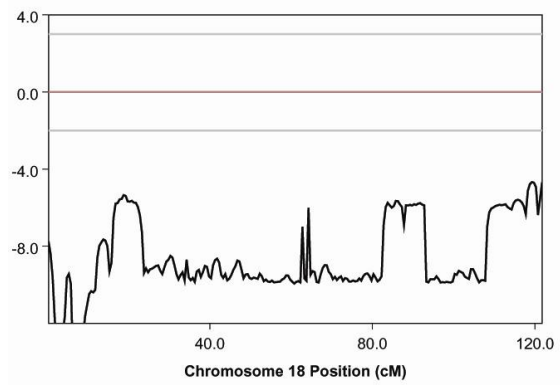
Parametric Analysis for Dominant_Model



Parametric Analysis for Dominant_Model

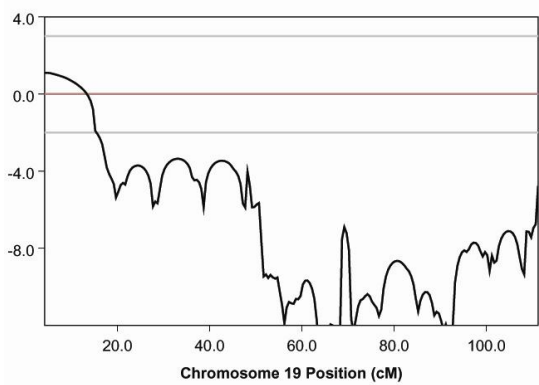


Parametric Analysis for Dominant_Model

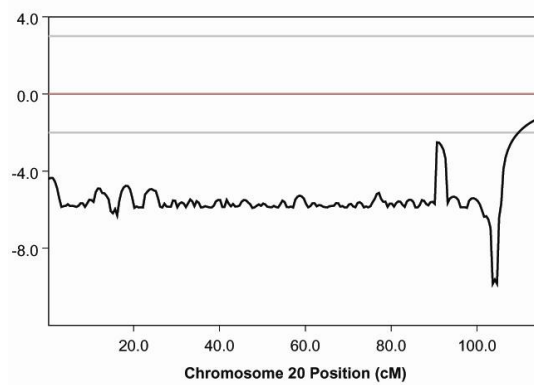


Continuação da Figura 7.2

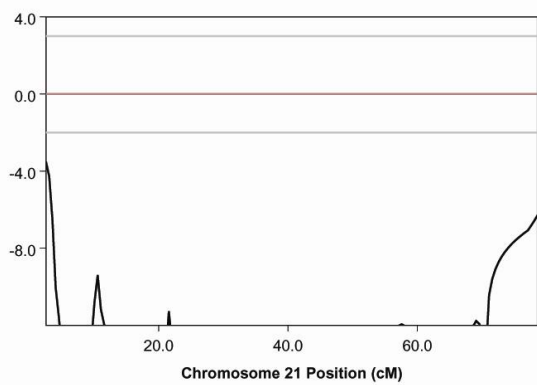
Parametric Analysis for Dominant_Model



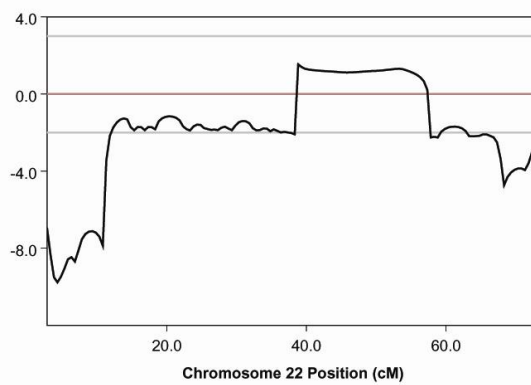
Parametric Analysis for Dominant_Model



Parametric Analysis for Dominant_Model



Parametric Analysis for Dominant_Model



Continuação da Figura 7.2

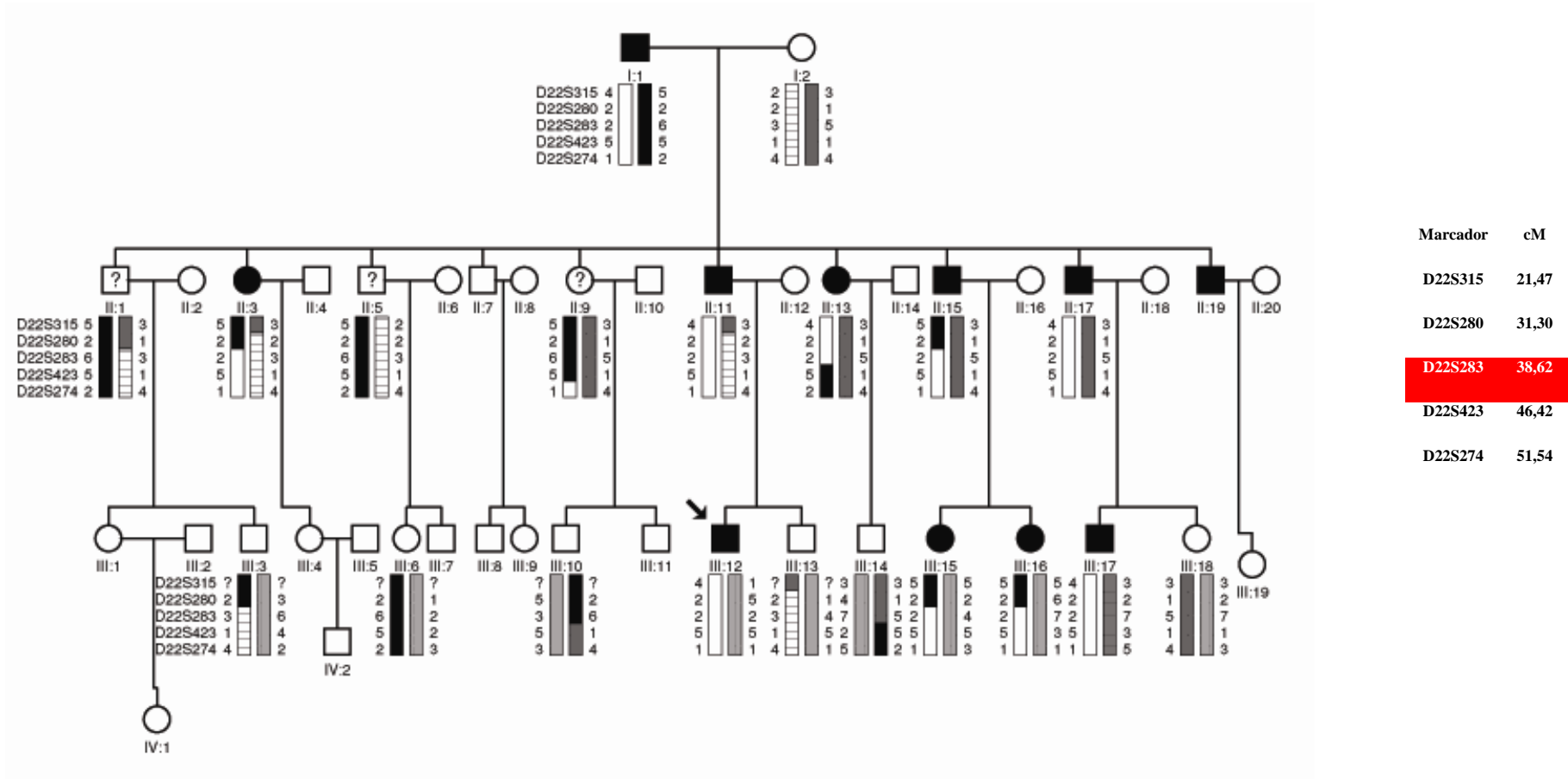
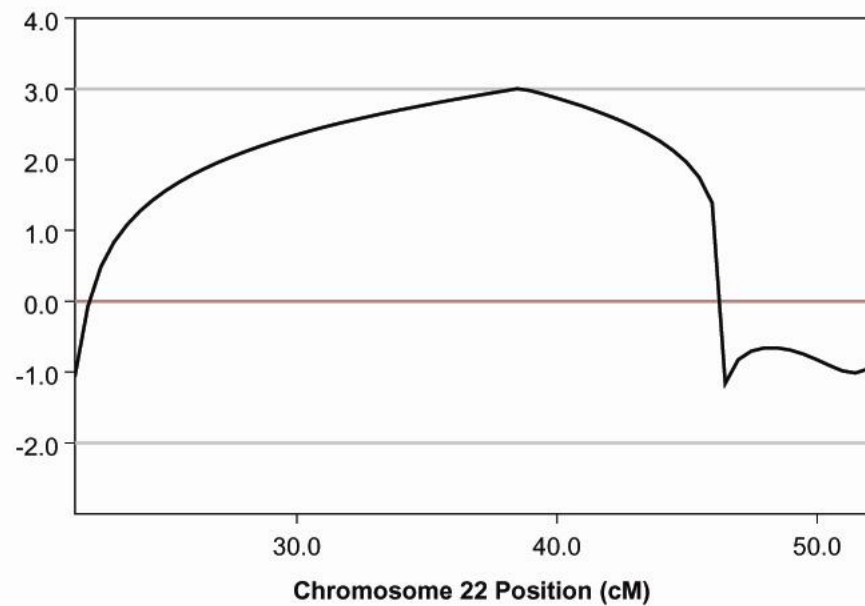


Figura 7.3: Genealogia da Família 4 mostrando a segregação dos haplótipos dos marcadores moleculares do tipo microssatélites do cromossomo 22 nos indivíduos afetados e normais. Os indivíduos assinalados com sinal de “?” são afetados por perda auditiva leve em altas frequências, após 40 anos de idade. Em vermelho está a região mapeada com base na segregação dos haplótipos.

A)



B)

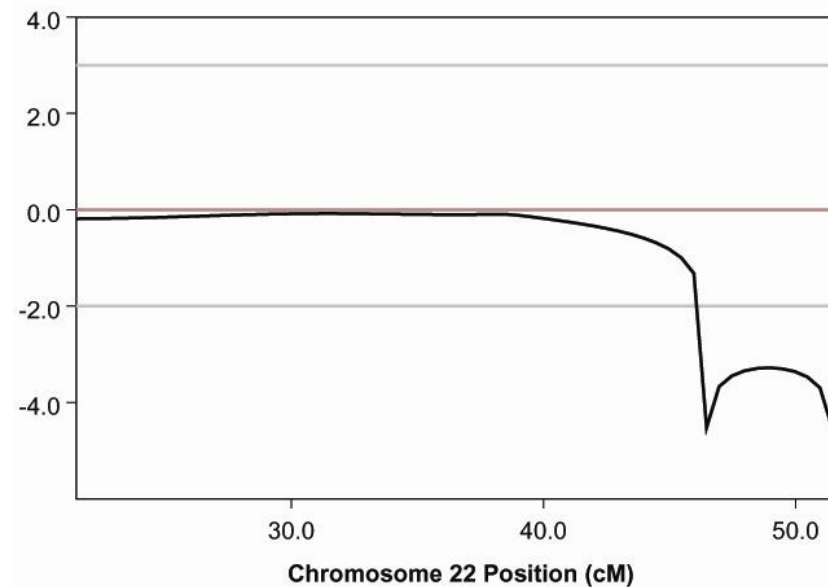


Figura 7.4. Resultados de *Lod Scores* de múltiplos pontos obtidos com resultados de microssatélites do cromossomo 22, calculados pelo programa Merlin. As linhas horizontais de colocação cinza claro em cada gráfico indicam os valores convencionais para exclusão de ligação (-2.00) e de ligação significativa (+3.00). A) Indivíduos assinalados com o sinal de (?) foram considerados normais; B) Indivíduos assinalados com o sinal de (?) foram considerados afetados.

Foi realizada também análise de ligação com marcadores moleculares do tipo microssatélites mapeados no cromossomo 14 e verificamos que a região candidata mais provável se localiza entre os marcadores D14S288 e D14S276 (14: 44,101,843 - 55,683,120) compreendendo uma região de cerca de 8,85cM (Figura 7.5). O cálculo de *Lod Score* para o cromossomo 14 foi realizado, através dos resultados dos marcadores microssatélites e foi obtido um valor máximo igual a +1,5. Um segundo cálculo foi realizado considerando os indivíduos de status duvidoso como sendo afetados e foi obtido um valor igual a 1,8 (Figura 7.6).

5.3.2.2.5. Busca por genes candidatos

Existem, ao todo, 63 genes conhecidos na região candidata delimitada pelos marcadores D14S288 e D14S276. Desses 63 genes, 6 se expressam na cóclea de humanos (***FKBP3***, ***MGAT2***, *SOS2*, *NID2*, *GPR137C*, *SOCS4*) e 15 se expressam na cóclea de *Mus musculus* (***FKBP3***, *KLHL28*, ***MGAT2***, *DNAAF2*, *POLE2*, *KLHDC2*, *L2HGDH*, *PYGL*, *TRIM9*, *GNG2*, *GNPNAT1*, *DDHD1*, *BMP4*, *CNIH*, *GCH1*). Em negrito estão representados os genes que se expressam tanto nas cócleas de humanos, quanto nas cócleas de camundongos (www.genatlas.org; <http://www.informatics.jax.org/>).

Para facilitar nossa procura pelo gene responsável da perda auditiva localizado nessa região, além da pesquisa em banco de dados, utilizamos o *software* de busca por genes candidatos *PosMed* (<http://omicspace.riken.jp/PosMed/>). O *software* forneceu uma lista com 15 genes candidatos. Em ordem de prioridade, os genes apontados pelo *software PosMed* foram: *GCH1*, *ARF6*, *ATL1*, *BMP4*, *PTGER2*, *PTGDR*, *NIN*, *PYGL*, *SOS2*, *DLGAP5*, *FANCM*, *NID2*, *MGAT2*, *L2HGDH* e *MAP4K5*.

Em relação ao cromossomo 22, existem ao todo, 122 genes conhecidos na região candidata delimitada pelos marcadores D22S280 e D22S423. Desses 122 genes, 8 se expressam na cóclea de humanos (*TIMP3*, *LARGE*, *HMG2L1*, *MYH9*, *TRIOBP*, ***SOX10***, *KDEL3* e *APOBEC3*) e 7 se expressam na cóclea de *Mus musculus* (*HMOX1*, *MCM5*, *PVALB*, *KCTD17*, *GCAT*, ***SOX10*** e *CSNK1E*). Em negrito estão representados os genes que se expressam tanto nas cócleas de humanos quanto nas

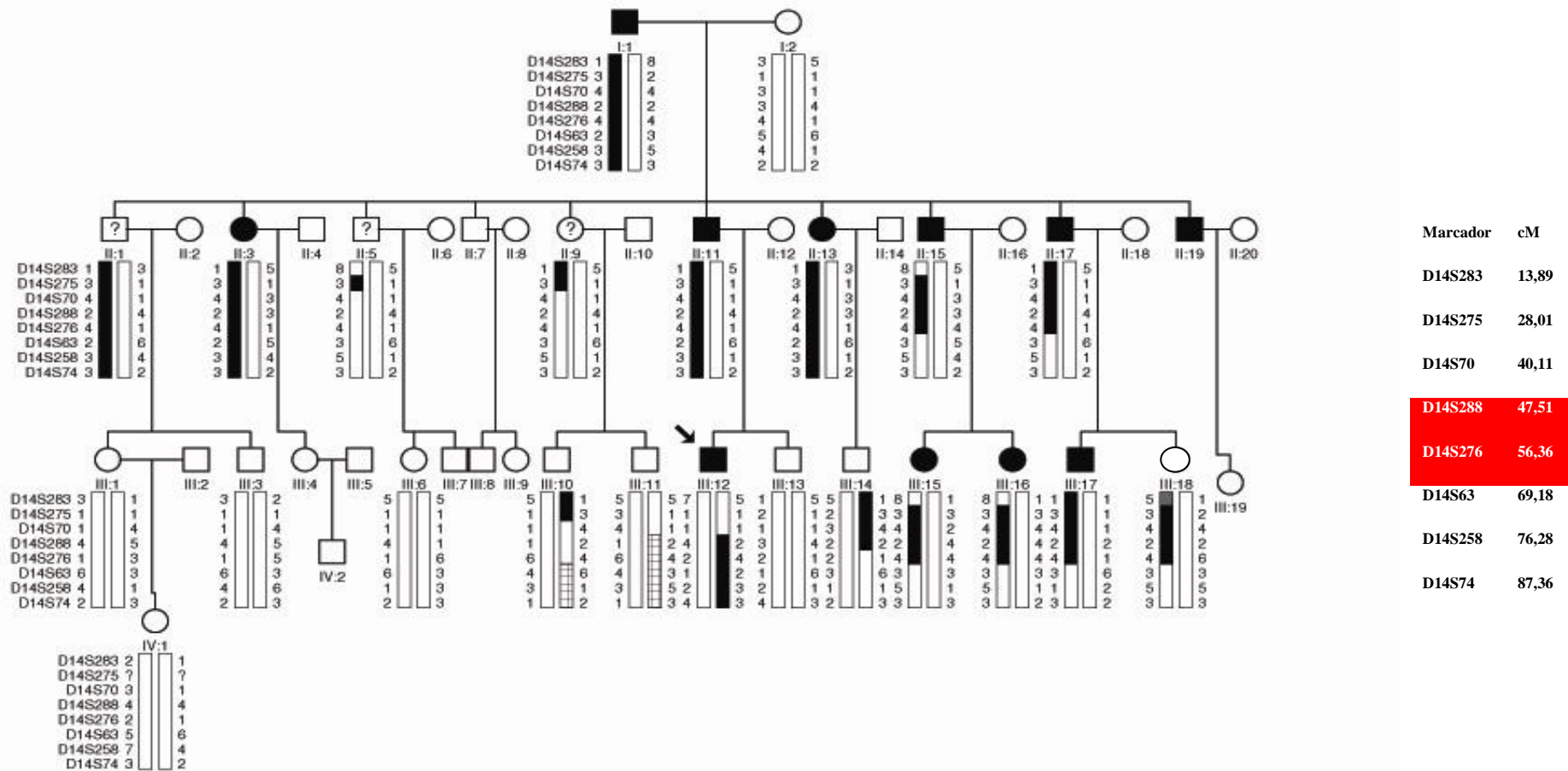
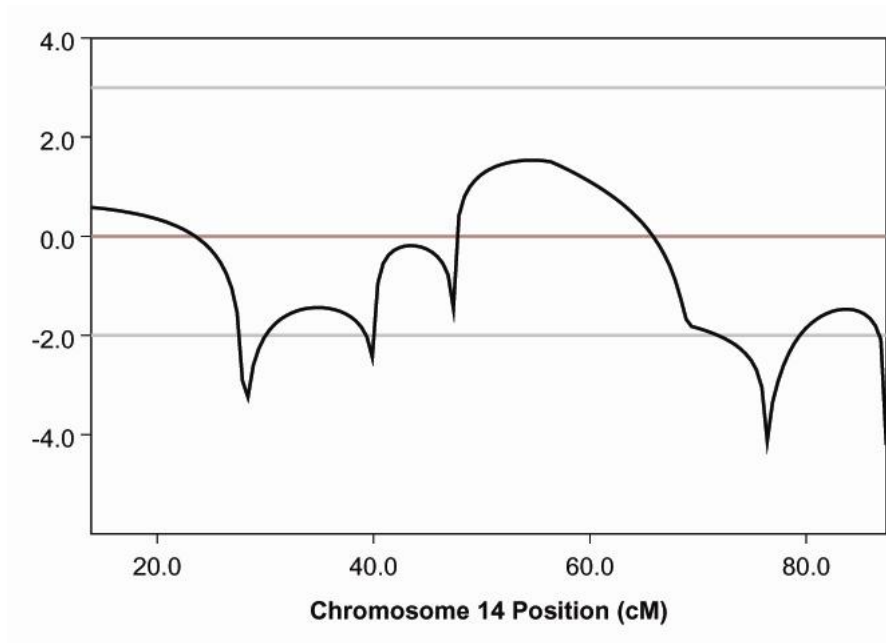


Figura 7.5: Genealogia da Família 4 mostrando a segregação dos haplótipos dos marcadores moleculares do tipo microssatélites do cromossomo 14 nos indivíduos afetados e normais. Os indivíduos assinalados com sinal de “?” são afetados por perda auditiva leve em altas frequências, após 40 anos de idade. Em vermelho está a região mapeada com base na segregação dos haplótipos.

A)



B)

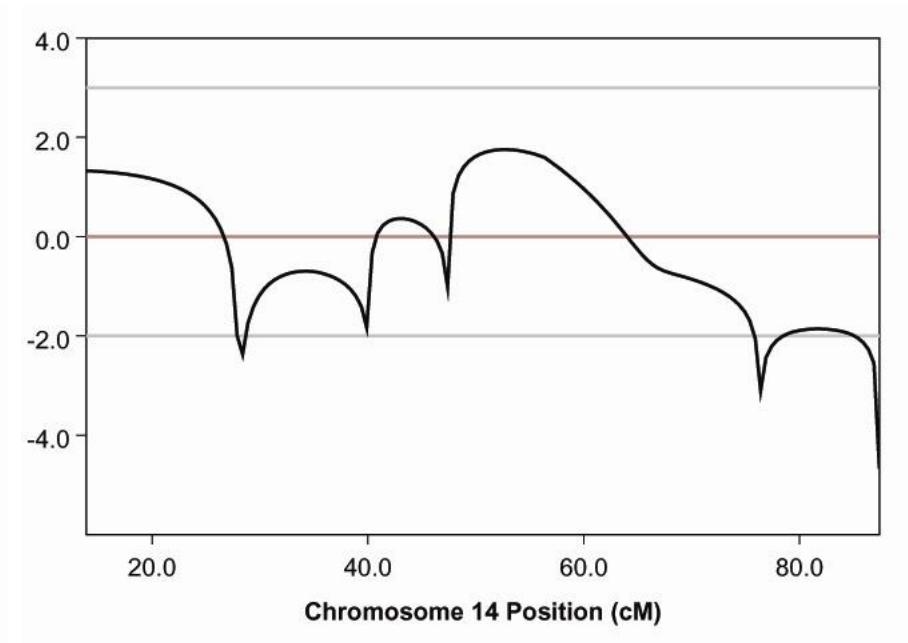


Figura 7.6. Resultados de *Lod Scores* de múltiplos pontos obtidos com resultados de microssatélites do cromossomo 14, calculados pelo programa Merlin. As linhas horizontais de colocação cinza claro em cada gráfico indicam os valores convencionais para exclusão de ligação (-2.00) e de ligação significativa (+3.00). A) Indivíduos assinalados com o sinal de (?) foram considerados normais; B) Indivíduos assinalados com o sinal de (?) foram considerados afetados.

cócleas de camundongos (www.genatlas.org; <http://www.informatics.jax.org/>). O gene *MYH9* já foi identificado como sendo responsável por perda auditiva de herança autossômica dominante. Foi realizada uma pesquisa utilizando o programa *PosMed* para a verificação do melhor candidato a explicar o fenótipo na família. Foi feita a análise considerando a região delimitada por nós no marcador D22S283 e foi indicado somente o gene *MYH9*.

5.3.2.2.6. Sequenciamento Massivo em Paralelo

O sequenciamento massivo em paralelo foi realizado utilizando a plataforma Illumina HiSeq 2000 (Illumina INC., San Diego, CA, USA) que permitiu a geração de 80.200.676 *reads* de 99 bp cada, gerando uma cobertura aproximada de 124X para um exoma que cobre cerca de 64 Mbp. A versão atual do genoma de referência (hg19) foi utilizada no alinhamento dos *reads*.

Para selecionar as variantes candidatas foi levada em conta a ocorrência das variantes em uma amostra de 19 indivíduos brasileiros, do CEGH com o exoma sequenciado. Foram observadas 85.065 variantes ao todo (mutações *missense*, mutações de códon de parada prematuro, mutações de perda de códon de parada e mutações de matriz de leitura) nesse conjunto de amostras. Era esperado que a variante candidata ocorresse somente nos membros da família sequenciados, ou seja, somente três vezes. Excluímos como candidatas todas as variantes que ocorreram quatro ou mais vezes nessa amostra. Dessa exclusão, restaram 37 variantes do tipo *missense*, selecionadas por estarem em heterozigose. Além disso, a frequência dessas 37 variantes selecionadas foi observada no banco de dados *1000 genomes* (<http://www.1000genomes.org/>) e foram mantidas como candidatas as variantes cujas frequências eram inferiores a 1%, reduzindo o número de variantes a um total de 33 do tipo *missense* (mutação de sentido trocado). Levando-se em conta a região cromossômica mapeada do cromossomo 14 (44,101,843 - 55,683,120) reduziu-se a quantidade de variantes candidatas a duas:

- c.G894A: p.R298R 52,741,496 no gene *PTGDR* (NM_000953).
- c.T247G: p.C83G 52,781,513 no gene : *PTGER2* (NM_000956).

Foi realizado o sequenciamento de Sanger da variante no gene *PTGDR* com a finalidade de observar a segregação da variante na família. Foi observado que essa variante não segrega com o fenótipo na família (Tabela 7.2).

Foi realizado o sequenciamento de Sanger da variante no gene *PTGER2* nos membros da família e foi verificado que a variante do gene não segrega com o fenótipo (Tabela 7.2).

Levando-se em conta a região candidata do cromossomo 22, nessa região havia uma variante candidata:

1. c.G2114A:p.R705H 36,702,021 no gene *MYH9* (NM_002473).

O sequenciamento de Sanger da variante do gene *MYH9* verificou que a variante segrega com o fenótipo em todos os membros da família.

Nessa família, três indivíduos apresentaram perda auditiva somente em altas frequências com percepção inicial dos sintomas somente após os 40 anos de idade e esses indivíduos não herdaram a mutação no gene *MYH9*.

5.3.3. Discussão

Existem 54 loci mapeados e 28 genes identificados relacionados a perda auditiva de herança autossômica dominante (Van Camp e col., 2013). Desses 54 loci, três foram mapeados previamente no cromossomo 14.

O DFNA9, localizado na região cromossômica 14:31,343,740-31,359,821, foi previamente mapeado por Manolis e col. (1996), que estudaram uma família com 21 indivíduos afetados por perda auditiva de herança autossômica dominante (16 indivíduos vivos e 5 falecidos). Manolis e col., (1996) realizaram uma varredura genômica com marcadores moleculares microssatélites em 23 amostras de DNA de indivíduos dessa família (16 afetados e 7 fenotipicamente normais). Para um dos marcadores utilizados (D14S121) foi verificado um resultado de *Lod Score* de dois pontos de +6,19 ($\theta = 0$), o que evidenciou a região mapeada como a região onde se localiza o gene da perda auditiva nessa família. Robertson e col. (1998) estudaram 3 famílias não aparentadas cuja perda auditiva havia sido mapeada no locus DFNA9. Robertson e col. (1998) criaram uma biblioteca de genes cocleares e identificaram o

gene *COCH* como expresso nessa biblioteca. Foram identificadas 3 mutações diferentes em heterozigose no gene *COCH*, c.253T>G, c.319G>A e c.405T>C, uma em cada família. O produto do gene *COCH* tem função na formação da matriz extracelular, resultando em uma malformação do vestíbulo quando alterado (Robertson e col., 1998).

O DFNA23, localizado na região cromossômica 14: 61,110,132-61,124,977, foi mapeado por Salam e col. (2000), que estudaram 22 indivíduos de uma família suíça (10 afetados, 8 fenotipicamente normais e 4 cônjuges de afetados). Salam e col. (2000) realizaram uma varredura genômica com marcadores moleculares microssatélites em todos os 22 indivíduos da família. Para um dos marcadores utilizados (D14S592) foi verificado um resultado de *Lod Score* de dois pontos de +3,9 ($\theta = 0$), o que evidenciou a região mapeada como a região onde se localiza o gene da perda auditiva nessa família. No entanto, nenhum gene foi identificado nessa região como sendo a causa da perda auditiva nessa família.

O DFNA53, localizado na região cromossômica 14:19,100,000-33,300,000, foi mapeado por Yan e col. (2006), que estudaram uma grande família chinesa com 16 afetados. Yan e col. (2006) realizaram uma varredura genômica com marcadores moleculares microssatélites em 48 amostras de DNA de indivíduos dessa família (16 afetados e 32 fenotipicamente normais). Para um dos marcadores utilizados (D14S608) foi verificado um resultado de *Lod Score* de dois pontos de +3,8 ($\theta = 0$) e um resultado de *Lod Score* de múltiplos pontos de +5,4 foi encontrado para o marcador D14S1280. O locus DFNA53 inclui a região do locus DFNA9. Por isso, Yan e col. (2006) estudaram o gene *COCH* nessa família, mas não observaram nenhuma variante que pudesse ser a causa da perda auditiva na família chinesa. Ao contrário das famílias estudadas por Robertson e col. (1998), a família chinesa estudada por Yan e col. (2006) não apresentava malformações vestibulares, o que levou a suposição de que as mutações no gene *COCH* levam a um quadro de perda auditiva associado a malformações vestibulares e que a família descrita por Yan e col. deveria ter mutação em outro gene. Não há sobreposição entre nenhuma dessas três regiões (DFNA9,

DFNA23 e DFNA53) e a região por nós mapeada no cromossomo 14 (Figura 7.7), onde estão os candidatos *PTGDR* e *PTGER2*.

Tabela 7.2: Segregação das variantes dos genes *PTGDR*, *PTGER2* e *MYH9* na família 4.

| | <i>PTGDR</i> (c.G894A) | <i>PTGER2</i> (c.T247G) | <i>MYH9</i> (c.G2114A) | |
|--------|---------------------------|----------------------------|---------------------------|----------|
| I:1 | S | S | S | |
| II:3 | N | N | S | |
| II:11 | N | n. amp. | S | |
| II:13 | S | S | S | |
| II:15 | S | S | S | AFETADOS |
| II:17 | S | S | S | |
| III:12 | S | N | S | |
| III:15 | S | S | S | |
| III:16 | S | S | S | |
| III:17 | n. amp. | S | S | |
| I:2 | N | N | N | |
| III:1 | N | N | N | |
| III:2 | N | N | N | |
| III:6 | N | N | N | |
| III:10 | S | S | N | NORMAIS |
| III:11 | S | S | N | |
| III:13 | N | N | N | |
| III:14 | N | N | N | |
| III:18 | S | S | N | |
| IV:1 | N | N | N | |
| II:1 | S | S | N | |
| II:5 | S | S | N | ? |
| II:9 | S | S | N | |

S- presente; N – ausente; n. amp. – não amplificado.

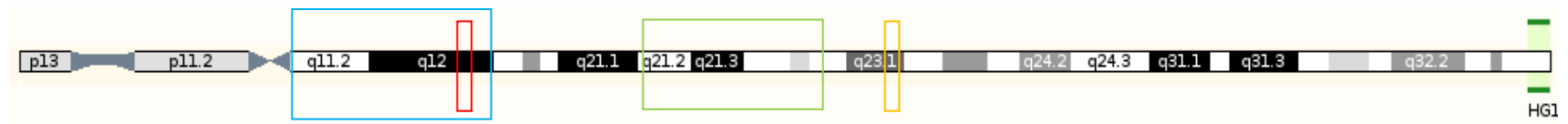


Figura 7.7: Regiões previamente mapeadas para loci de perda auditiva no cromossomo 14. Em vermelho está indicada a região do DFNA9, em laranja a região do DFNA 23, em azul a região do DFNA53 e em verde a região mapeada em nosso estudo.

O produto do gene *PTGDR* é composto por 359 aminoácidos e sua expressão é detectada apenas na retina e no intestino de humanos, apesar de possuir uma ampla distribuição de sua expressão pelos tecidos, em pequenas quantidades (Boie e col., 1995). Quando ativado, os níveis intracelulares de cAMP se elevam e aumenta a mobilidade de íons Ca^{2+} (Boie e col., 1995). O gene *PTGER2* é expresso no útero, íleo, coração, estômago e timo de camundongos (Sugimoto e Narumiya, 2007). O produto do gene possui várias funções (a maioria relacionada à homeostase corpórea), sendo uma das principais funções a atuação em processos inflamatórios, ativando e regulando o processo de edema (Sugimoto e Narumiya, 2007). No entanto, os estudos de segregação não indicaram essas variantes como as prováveis responsáveis pelo quadro.

No cromossomo 22, a variante rs80338828 no gene *MYH9*, que corresponde ao DFNA17, foi encontrada em 10 indivíduos afetados e em nenhum indivíduo normal. A variante não foi encontrada nos 3 indivíduos de status duvidoso.

O locus DFNA17 foi mapeado previamente por Lalwani e col., 1999. O estudo foi realizado em 18 indivíduos afetados por perda auditiva de herança autossômica dominante, com o início da perda auditiva ocorrendo em média aos 10 anos de idade em altas frequências e evoluindo para um grau que varia de moderado a profundo a partir dos 30 anos de idade. Os resultados de *Lod Score* de dois pontos obtidos mostrou um valor igual a +3,98 para o marcador D22S283. Lalwani e col., 2000 estudaram os genes localizados na região mapeada por eles e identificaram o novo gene de perda auditiva denominado *MYH9*. O gene *MYH9* codifica uma miosina de cadeia pesada que tem função relacionada à mobilidade das fibras de actina (Wilson e col., 2010). Em um outro estudo, Hildebrand e col. (2006) identificaram a mesma mutação no gene *MYH9*, identificada previamente por Lalwani e col. (2000), em uma família australiana afetada por perda auditiva de herança autossômica dominante, cujo locus mapeado havia sido o DFNA17. Nessa família, a idade média do início da perda foi de 6 anos de idade, progredindo para uma perda grave a profunda a partir da

segunda e/ou terceira década de vida. Outras mutações nesse gene não foram descritas posteriormente na literatura.

A variante rs80338828 no gene *MYH9* é a mesma já descrita por Lalwani e col. (2000) e Hildebrand e col. (2006) e foi encontrada segregando com o fenótipo na família por nós estudada. O fenótipo nas famílias previamente estudadas é semelhante ao quadro de deficiência auditiva na família 4. No entanto, a média da idade de manifestação na família é superior à observada nas famílias descritas por Lalwani e col. (2000) e Hildebrand e col. (2006). A busca dessa variante no banco de dados *1000 genomes* indicou que ela não ocorre em nenhuma das amostras. Através da análise do possível dano que essa variação possa causar na proteína, utilizando o programa PolyPhen2 (<http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2>), verificou-se que a probabilidade dessa variante ser patogênica é de 100%, o que sugere fortemente que ela seja, de fato, patogênica e que seja a causa do fenótipo da família por nós estudada.

Curiosamente, o gene considerado como o mais provável a explicar o fenótipo não está localizado na região cromossômica cujo resultado de *Lod Score* foi o mais alto obtido com a varredura genômica por meio de *arrays* de SNPs. A varredura genômica inicial não incluiu os três indivíduos de status duvidoso. Em vista desses achados, novas hipóteses foram consideradas. Pode existir algum gene modificador que esteja localizado no cromossomo 14 e que seja responsável, pelo menos em parte, pelo fenótipo nos 3 indivíduos de status duvidoso. De fato, um determinado alelo para o marcador D14S275 é herdado por esses três indivíduos e por nove indivíduos afetados pela surdez dominante, o que pode ter contribuído para o alto valor de *Lod Score* obtido para o cromossomo 14 nessa família. Estudos mais detalhados acerca desses três indivíduos de status duvidoso são necessários para a compreensão da perda auditiva na família, no sentido de explicar se, por ventura, alguma variante no cromossomo 14 poderia contribuir como um modificador do efeito do gene principal, que é provavelmente o *MYH9*.

5.4. FAMÍLIA 5

Mutação no gene *MYO3A* (DFNB30) explica a perda auditiva de herança autossômica dominante em família do Sudeste do Brasil.

Resumo

Uma família proveniente do estado de São Paulo com muitos indivíduos afetados por perda auditiva de herança autossômica dominante foi averiguada em nosso centro de pesquisa. Foram coletadas amostras de DNA de 45 indivíduos (14 afetados e 31 aparentemente normais). A varredura genômica foi realizada com o auxílio da tecnologia Affymetrix, utilizando *arrays* de SNPs de 50K (GeneChip[®] Human Mapping K Array Hind 240) em amostras de 11 afetados. O cálculo de *Lod Score* foi realizado utilizando o modelo de herança autossômica dominante com penetrância completa e a frequência do alelo da doença igual a 0,0001. Não foi obtido nenhum resultado de *Lod Score* superior a 1 após o uso do programa Merlin. O sequenciamento massivo em paralelo do exoma foi realizado com amostras de quatro indivíduos afetados e foram identificadas 13 variantes em heterozigose, presente nos quatro, candidatas a explicar o fenótipo. Duas das variantes foram selecionadas, inicialmente, para estudos de segregação [*MYO3A* (NM_017433), c.T2090G:p.L697W, região cromossômica 10:26,414,513 e *LONP2* (NM_031490), c.C1543T:p.Q515X, região cromossômica 16: 48,333,581]. O gene *MYO3A* já foi identificado como mutado em perda auditiva de herança autossômica recessiva e corresponde ao locus DFNB30. Já a variante no gene *LONP2* corresponde a uma mutação que acarreta códon de parada prematuro. Foi observado que a variante no gene *LONP2* não segrega com o fenótipo na família. O estudo da segregação da variante no gene *MYO3A* mostrou que essa variante parece segregar com o fenótipo na genealogia, com exceção de um indivíduo afetado que não a apresenta e de alguns indivíduos, que a apresentam, provavelmente não-penetrantes. O produto do gene *MYO3A* é uma miosina não convencional que tem função relacionada à motilidade das fibras de actina. A variante c.T2090G no *MYO3A*

nunca foi descrita em casos de surdez e não está presente nos bancos de dados *1000 genomes*. Mutações nesse gene foram relacionadas à perda auditiva recessiva e não dominante. Apesar dos indícios de que essa mutação é a causa da deficiência auditiva, mais estudos são necessários para excluir o papel das demais variantes encontradas após análise do exoma na origem da surdez.

Novel mutation on *MYO3A* (DFNB30) explains a non-syndromic autosomal dominant form of hearing loss in a Brazilian family.

Abstract

A family from the state of São Paulo presenting with autosomal dominant hearing impairment was ascertained for mapping studies and 45 DNA samples were collected (14 affected individuals and 31 unaffected individuals). Genomic scanning was performed using the 50k microarray technology from Affymetrix (GeneChip[®] Human Mapping K Array Hind 240) in 11 affected individuals. Multipoint *Lod Scores* were calculated under an autosomal dominant inheritance model with complete penetrance and a disease allele frequency of 0.0001. Marker allele frequencies were calculated based on our own genotype data. *Lod Scores* did not exceed the value of +1.00, in any of the autosomes. Exome sequencing was performed in samples from 4 affected individuals and 13 variants were selected because they were in heterozygosis. Two variants were initially selected for segregation studies [*MYO3A* (NM_017433), c.T2090G:p.L697W, chromosome region 10:26,414,513 and *LONP2* (NM_031490), c.C1543T:p.Q515X, chromosome region 16: 48,333,581]. *MYO3A* was previously identified as the cause of autosomal recessive hearing loss and corresponds to DFNB30. The variant in *LONP2* was selected because the mutation results in a premature stop codon. The *LONP2* variant does not segregate with the phenotype. Segregation studies of *MYO3A* variant show that it segregates with the phenotype, except for one affected individual who doesn't have it and some possible non penetrants that have it. *MYO3A* is an unconventional myosin that acts in actin motility. The variant c.T2090G in *MYO3A* has never been described in hearing loss cases and it is not found on the 1000 genomes database. Mutations in *MYO3A* were related to autosomal recessive hearing loss and not to autosomal dominant hearing loss. Additional studies are required to exclude the other variants as the cause of hearing loss.

5.4.1. Pacientes e Métodos

5.4.1.1. Pacientes

A família 5 (Figura 3.5, página 42) foi averiguada em nosso serviço de aconselhamento genético, no IBUSP. A família apresenta 30 afetados por perda auditiva. A perda auditiva nessa família é de herança autossômica dominante com penetrância aparentemente completa.

5.4.1.2. Avaliação audiológica

As audiometrias tonais dos indivíduos dessa família foram realizadas por diferentes profissionais e instituições da cidade de São Paulo-SP e foram fornecidas pelos próprios pacientes.

5.4.1.3. Estudos moleculares

Foram coletadas amostras de DNA de 45 indivíduos, dos quais 14 afetados (propósito, IV:5, V:1, V:7, V:13, V:14, V:15, V:16, V:20, V:22, V:24, V:26, V:30 e V:31) e 31 fenotipicamente normais. O DNA das amostras dessa família foi extraído como o auxílio do equipamento Autopure LS (Gentra Systems, Minneapolis, Minnesota, USA). Os *kits* utilizados para a extração do DNA pela estação de extração Autopure estão descritos no capítulo 3.

5.4.1.3.1. Estudos de Ligação

A varredura genômica foi realizada por meio da tecnologia *Affymetrix* com o uso de “chips” de 50k, ou seja 50,000 SNPs (*GeneChip[®] Human Mapping K Array Hind*) em amostras de 11 indivíduos afetados (propósito, IV:5, V:1, V:7, V:14, V:16, V:20, V:22, V:24, V:26 e V:30), conforme instruções do fabricante.

5.4.1.3.2. Cálculos de *Lod Score*

Os dados dos genótipos obtidos nos estudos de ligação foram organizados em arquivos de análise de ligação pelo programa Alohomora (<http://gmc.mdc-berlin.de/alohomora/>). Para os cálculos de *Lod Score* de múltiplos pontos foram utilizados os programas MERLIN (Abecassis e col., 2002), com as frequências alélicas calculadas pelo próprio *software* baseado nos genótipos observados na família, e Allegro (<http://www.decode.com/software/>), com as frequências alélicas obtidas

através de arquivos fornecidos pelo programa Alohomora. O programa MLINK do pacote de programas FASTLINK (Lahtrop e col., 1985; Cottingham e col., 1993) foi utilizado para a obtenção do resultado de simulação do *Lod Score* máximo observável nessa família. Foi considerada a penetrância completa (100%) nos cálculos de *Lod Score*.

5.4.1.3.3. Array-CGH

A investigação das alterações cromossômicas submicroscópicas foi realizada por meio da técnica de *Array-CGH*. O experimento foi realizado utilizando amostra de um indivíduo afetado (propósito). Foi utilizada a plataforma *Agilent (Agilent Technologies)* contendo 180.000 oligonucleotídeos.

5.4.1.3.4. Sequenciamento de Sanger

As sequências dos *primers* para sequenciamento dos exons contendo as variantes dos genes *MYO3A* e *LONP2* estão listadas na tabela 8.1. Os *primers* foram desenhados com o auxílio do programa Primer3 (Rozen and Skaletsky, 2000).

Tabela 8.1 Sequência dos *primers* utilizados na amplificação dos exons que contêm as variantes dos genes *MYO3A* e *LONP2*.

| <i>Primers</i> | Sequência 5' – 3' |
|----------------|----------------------------|
| <i>MYO3A-F</i> | TTCATTTTTGGGGAGTGACC |
| <i>MYO3A-R</i> | GTAGACTTACATCACCTGACATTTGG |
| <i>LONP2-F</i> | TGAACCTGAGAGGTGGAGGT |
| <i>LONP2-R</i> | CTCAGTAAATACTCAAAAGTTGCCTG |

5.4.1.3.5. Sequenciamento massivo em paralelo (sequenciamento de nova geração)

O sequenciamento de todo o exoma foi realizado no Laboratório de Biotecnologia Animal (ESALQ-USP, Piracicaba, SP, BR) sob responsabilidade do Dr. Luiz Lehmann Coutinho. O preparo da biblioteca genômica foi realizado no CEGH utilizando os kits *TruSeq Library preparation kit*, *TruSeq exome enrichment kit* e *HiScan SBS kit* (Illumina INC., San Diefo, CA, USA) conforme instruções do

fabricante. O exoma foi sequenciado com a plataforma Illumina Hiseq2000 (Illumina INC., San Diego, CA, USA) no Laboratório de Biotecnologia Animal.

A partir dos arquivos com os resultados gerados pelo sequenciamento massivo em paralelo, a análise bioinformática foi realizada no CEGH, sob orientação do pesquisador Guilherme Yamamoto, e consistiu nos seguintes passos:

1. Verificação da consistência dos arquivos (cujo tamanho varia de dezenas a centenas de gigabytes) e cálculo de estatísticas básicas como número de sequências produzidas com o programa md5sum (<http://www.md5summer.org/>).
2. Alinhamento das sequências das amostras a uma sequência referência do genoma humano (Hg19). Nesta etapa, a localização de cada fragmento do DNA sequenciado (*reads*) em relação ao genoma de referência é determinada. Foi utilizado o programa BWA (<http://bio-bwa.sourceforge.net/>), que considera a qualidade da sequência produzida para realizar a escolha de qual a melhor posição para alinhá-la.
3. Recalibragem das sequências alinhadas: como o alinhamento é feito sequência a sequência, torna-se necessário recalibrar o alinhamento realizado na fase anterior, visto que, em algumas situações, diferentes sequências oriundas da mesma região cromossômica apresentam resultados ligeiramente diferentes de mapeamento (devido a pequenas inserções, deleções ou repetições no genoma alvo). A recalibragem pode ser considerada um realinhamento, mas agora de forma contextualizada. Para tanto, foi utilizada a ferramenta GATK (<http://www.broadinstitute.org/gatk/>).
4. A partir do melhor alinhamento possível foi realizada uma genotipagem da amostra, que consiste em determinar, com bases estatísticas, todos os alelos do genoma da amostra (as bases de cada par em uma dada posição no cromossomo). Esta etapa identifica SNPs e Indels (inserções e deleções) e foi realizada com a utilização do programa GATK. Em uma outra etapa desse processo, o programa Pindel (<https://trac.nbic.nl/pindel/>) foi utilizado para

identificação de CNVs (*Copy Number Variations* - duplicações e grandes deleções genômicas).

5. Recalibragem da genotipagem: os genótipos foram recalibrados com o uso de outros parâmetros (não somente os dados do alinhamento), como dados populacionais. Falsos positivos foram detectados e sinalizados para serem descartados. Novamente, módulos do programa GATK realizaram esta tarefa para SNPs e Indels. CNVs identificados não são recalibrados e passam diretamente para a próxima etapa da análise.

6. Anotação dos genótipos variantes detectados: esta etapa consiste em (a) anotar as variantes encontradas (com Annovar, <http://www.openbioinformatics.org/annovar/>); (b) filtrar de acordo com bancos públicos de variantes (por exemplo, os do projeto *1000 genomes*); e (c) estimar o efeito de cada variante na função da proteína em decorrência da mudança do aminoácido com os programas SIFT (<http://sift.jcvi.org/>), PolyPhen2 (<http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/>) e *MutationTaster* (<http://www.mutationtaster.org/>).

7. Priorização das variantes candidatas: com a base de dados gerada a partir das etapas anteriores, o pesquisador decide os critérios considerar para priorizar algumas variantes. Nesse caso, foram priorizadas variantes em heterozigose presentes nos 4 afetados, mas todos os genes já identificados correspondentes a DFNAs e DFNBs foram analisados.

5.4.2. Resultados

5.4.2.1. Avaliação Audiológica

A perda auditiva nessa família é neurosensorial, não sindrômica, variando de moderada a profunda. A penetrância da perda auditiva nessa família é aparentemente completa. O resumo dos resultados das audiometrias tonais de alguns indivíduos dessa família está mostrado na Figura 8.1.

A idade média de manifestação da perda auditiva nos indivíduos da família é de 36,5 anos, variando desde 28 anos de idade a 47 anos.

5.4.2.2. Estudos Moleculares

5.4.2.2.1. Mutações excluídas

Mutações frequentemente associadas com perda auditiva foram excluídas como sendo a causa da perda auditiva nessa família. As mutações c.35delG e c.167delT presentes no gene *GJB2*, del*GJB6* (D13S1830) e del*GJB6* (D13S1854), a mutação mitocondrial m.A1555G e outras mutações na região de código do gene *GJB2* foram excluídas no propósito. A mutação c.35delG foi excluída nos demais afetados.

5.4.2.2.2. Array-CGH

Foi realizada a investigação de alterações cromossômicas submicroscópicas por meio do *array-CGH* no propósito. No entanto, nenhuma alteração foi verificada.

5.4.2.2.3. Estudos de Ligação e Cálculos de *Lod Score*

A varredura genômica foi realizada com DNA de 11 indivíduos afetados por perda auditiva (propósito, IV:5, V:1, V:7, V:14, V:16, V:20, V:22, V:24, V:26 e V:30). O programa Merlin foi utilizado para cálculos de *Lod Score* de múltiplos pontos. No entanto, devido às limitações do programa, os cálculos não puderam ser realizados com a genealogia completa. Foi feita uma tentativa de cálculo dividindo-se a genealogia em três subpedigrees (subpedigree 1 foi composto pelos indivíduos V:1, V:14, V:20 e V:26; o subpedigree 2 foi composto pelo propósito e pelos indivíduos, IV:5, V:16 e V:30; o subpedigree 3 foi composto pelos indivíduos V:7, V:22 e V:24). Não foram encontrados valores iguais ou superiores a +2,00 (Figura 8.2) somando-se os *Lod Scores* dos três subpedigrees. Um segundo cálculo de *Lod Score* de múltiplos pontos foi realizado utilizando o programa Allegro. No entanto, nenhum resultado de *Lod Score* observado foi superior a +1,00 (Figura 8.3). O valor de *Lod Score* máximo para essa família poderia chegar a +4,43, valor calculado por meio de simulação.

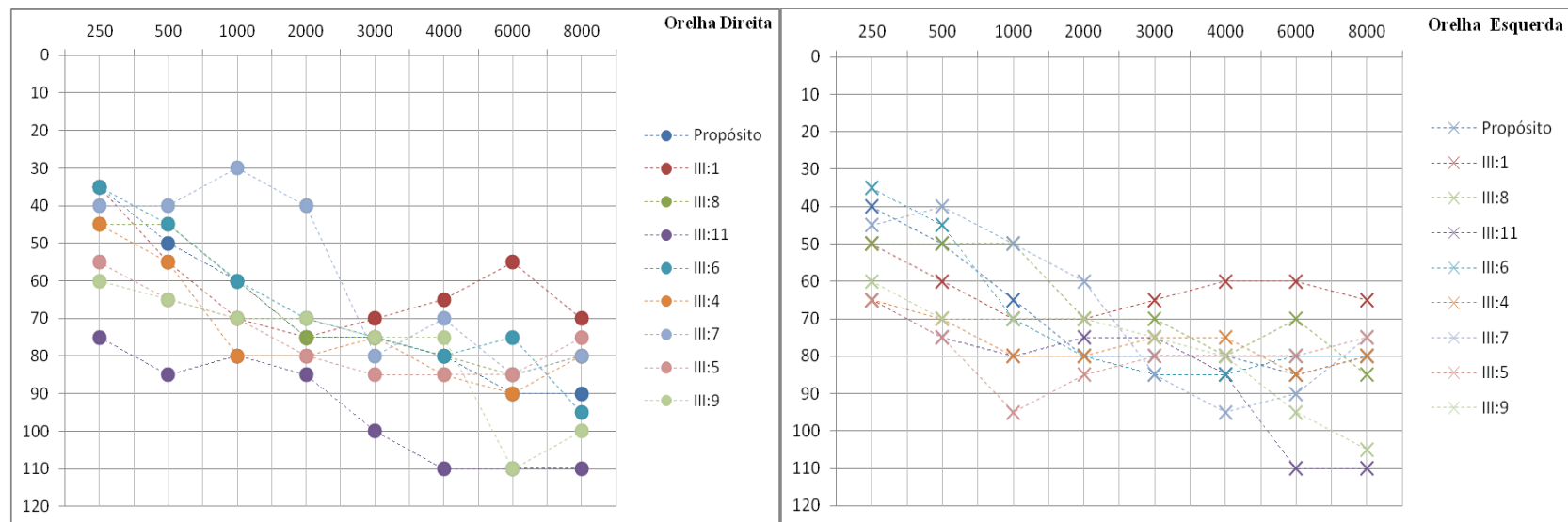


Figura 8.1: Audiogramas de 9 dos 30 indivíduos afetados por perda auditiva neurossensorial. Limiares auditivos até 20dB (decibéis – unidade de intensidade sonora, varia de 0 a 120) são considerados normais (Hz = Hertz – unidade de frequência da onda sonora, que varia de 250 a 8000). Os símbolos (●) e (X) representam os resultados obtidos através da via aérea de condução do som. A) Orelha direita; B) Orelha esquerda.

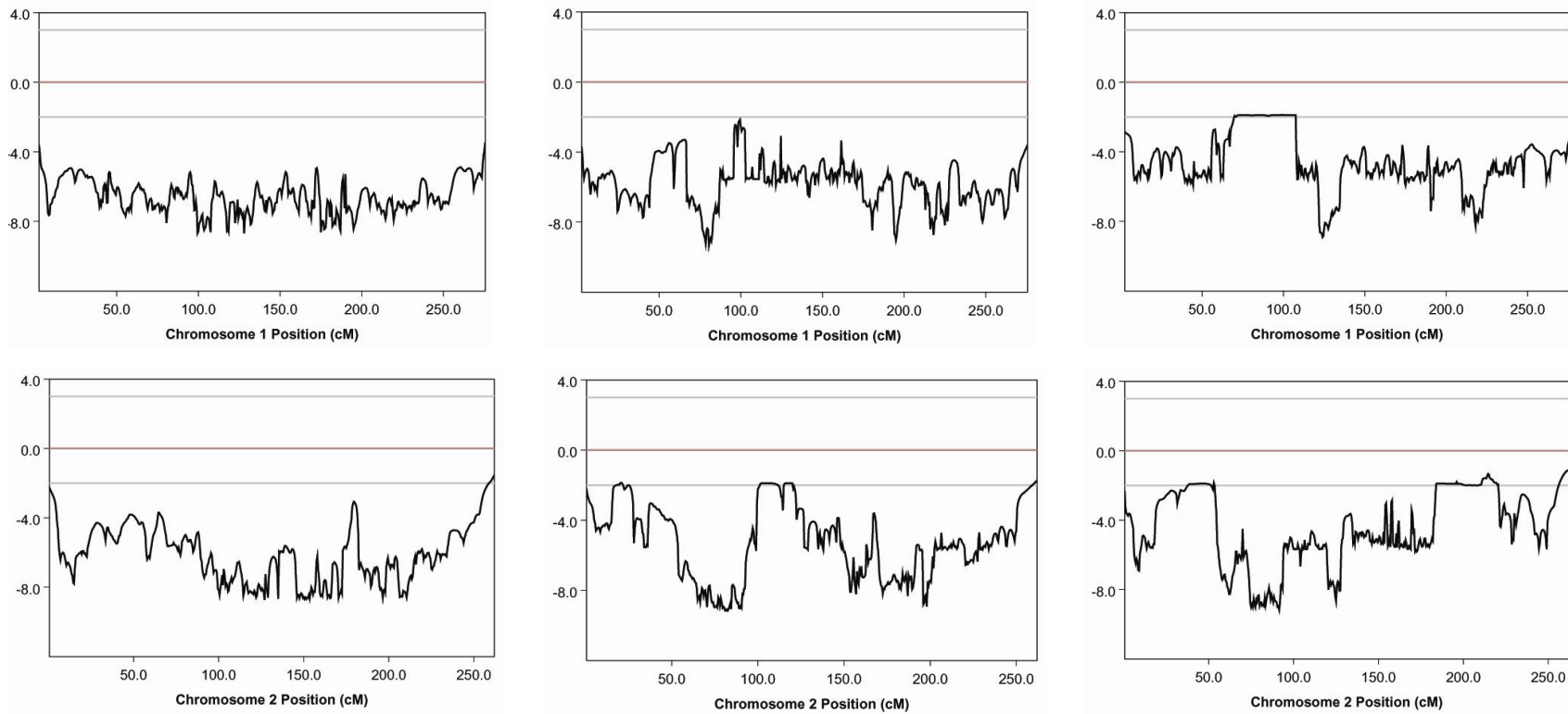
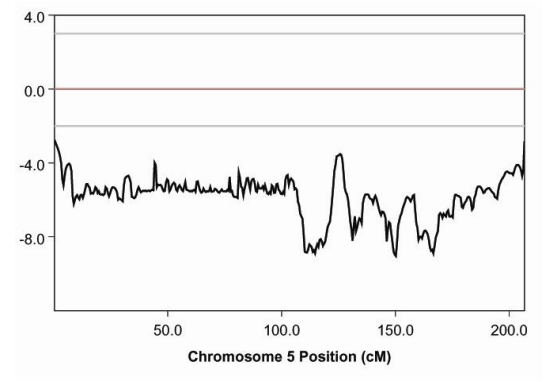
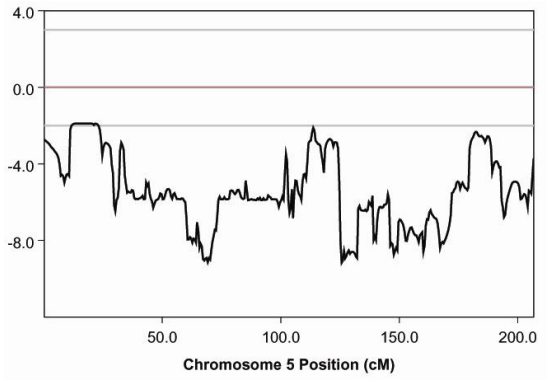
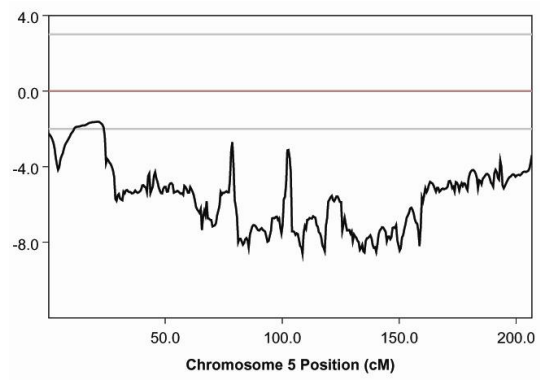
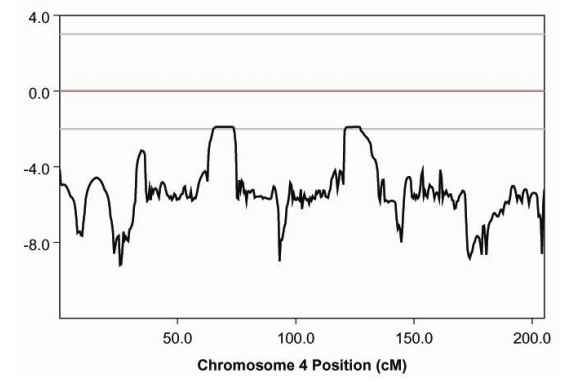
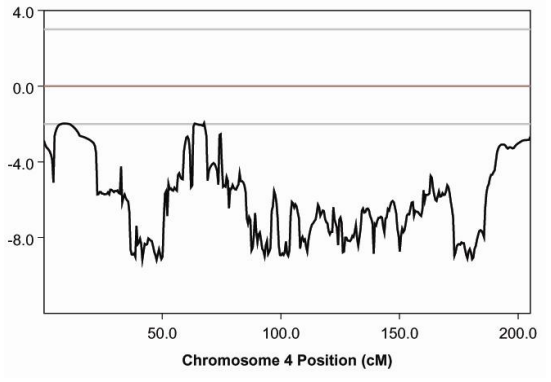
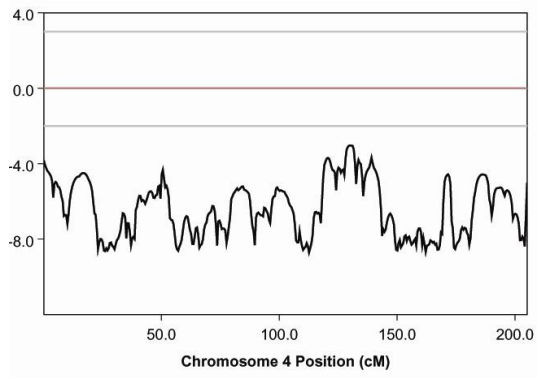
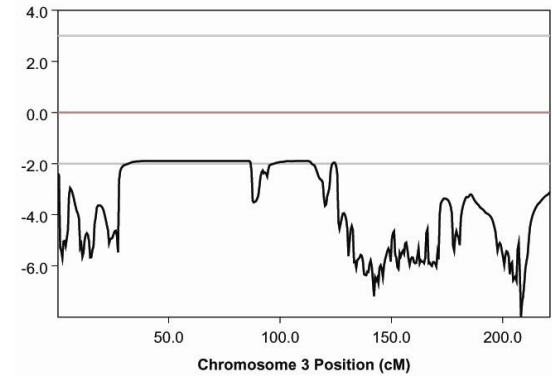
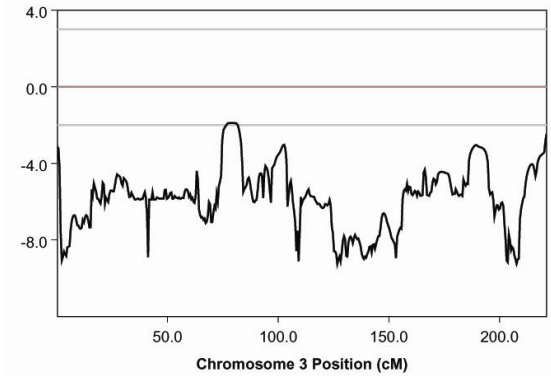
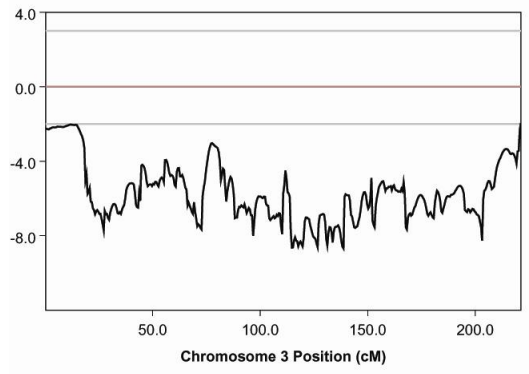
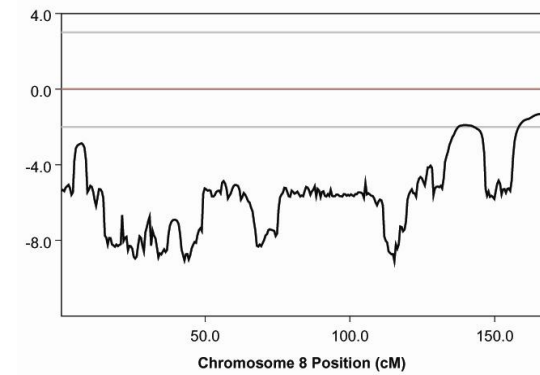
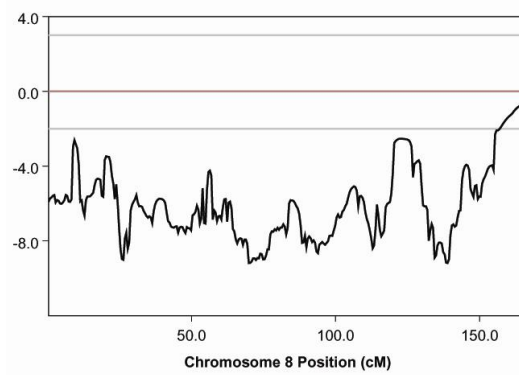
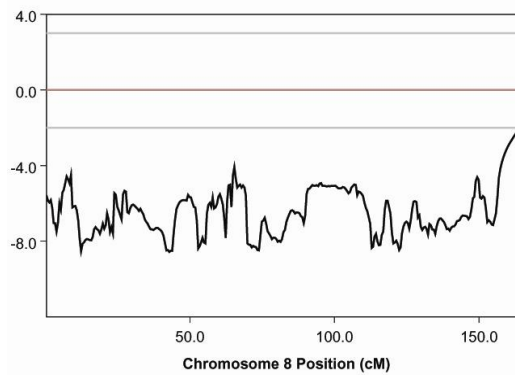
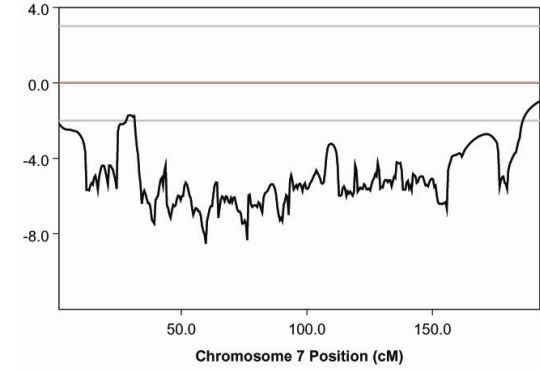
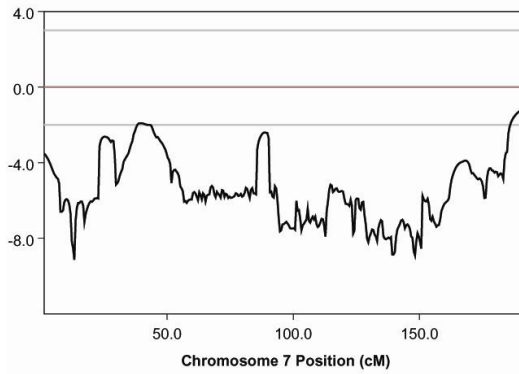
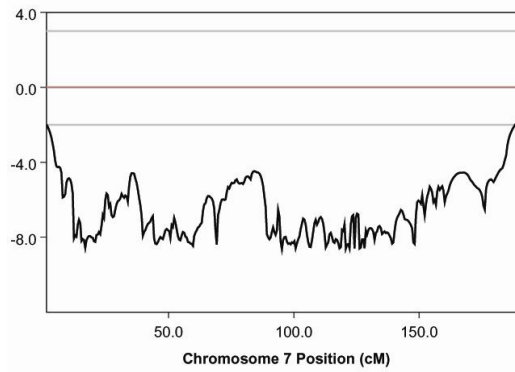
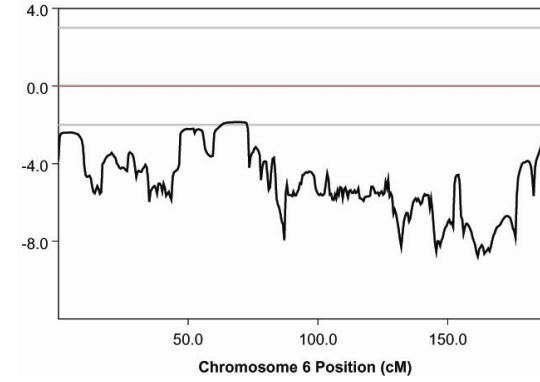
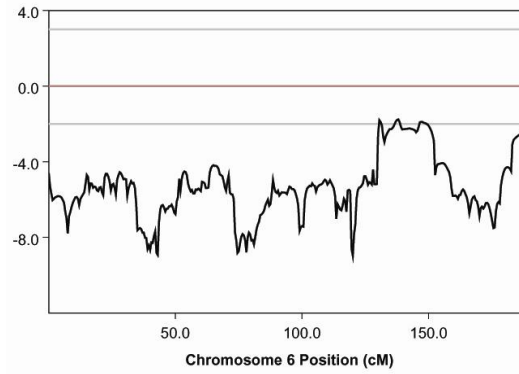
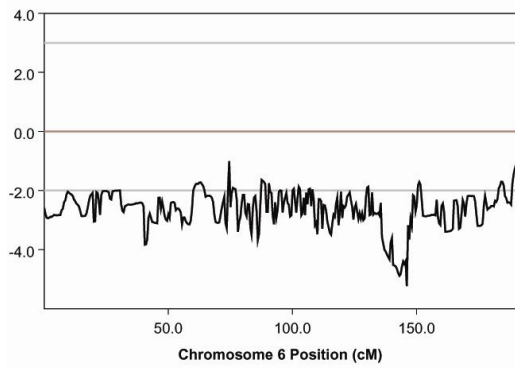


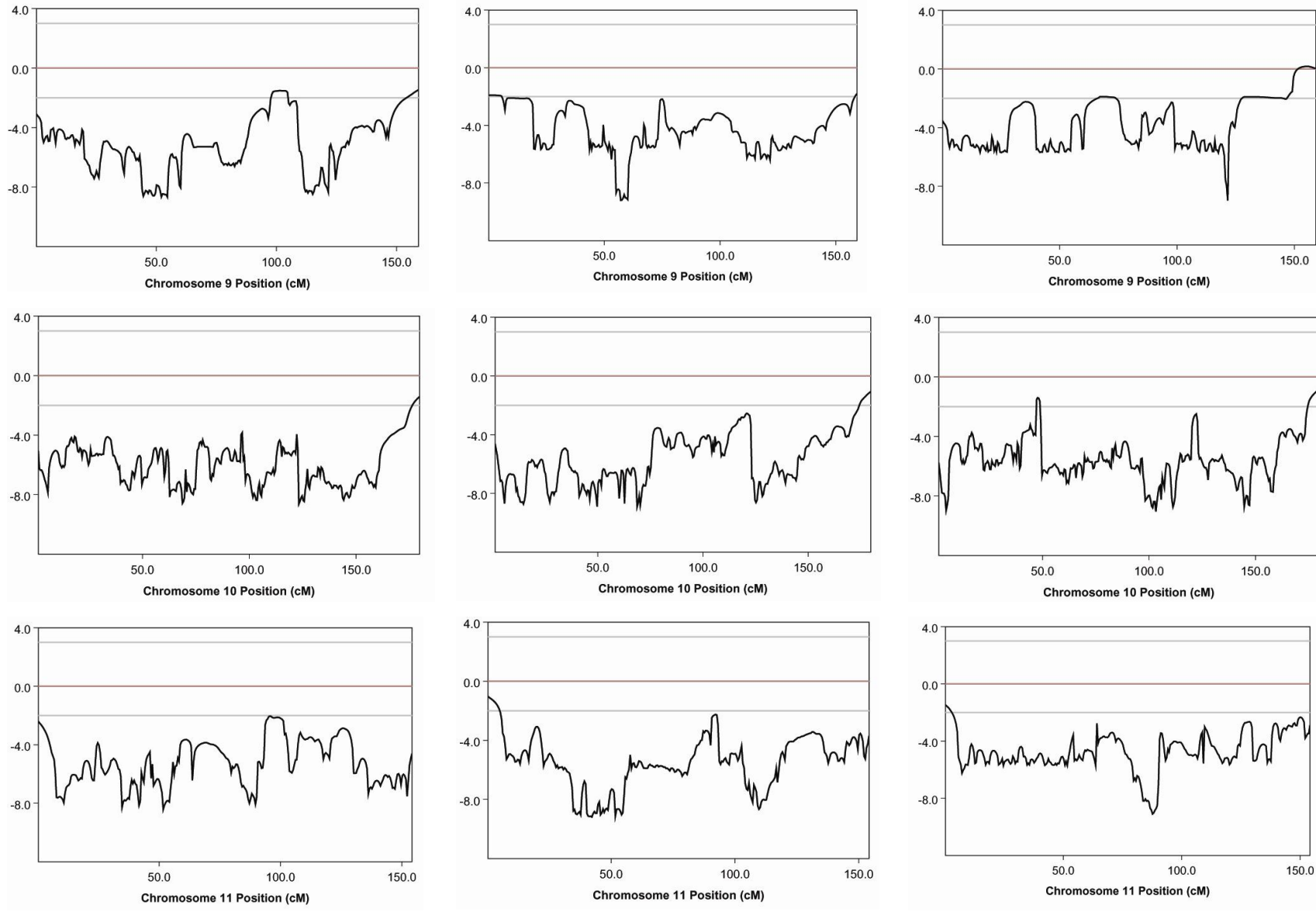
Figura 8.2: Resultados de *Lod Scores* de múltiplos pontos obtidos com resultados de *Arrays* de SNPs, para cada autossomo, calculados pelo programa Merlin. As linhas horizontais de coloração cinza claro em cada gráfico indicam os valores convencionais para exclusão de ligação (-2.00) e de ligação significativa (+3.00). Coluna da esquerda: Subpedigree1; Coluna central: Subpedigree 2; Coluna da direita: Subpedigree 3.



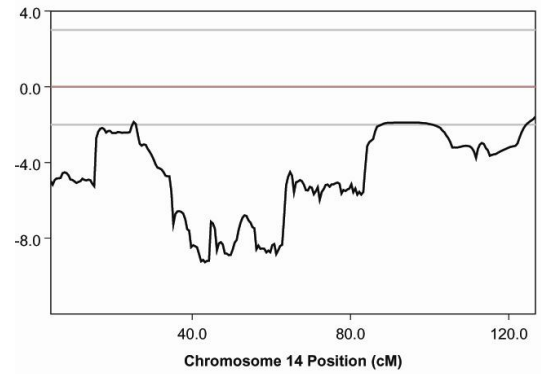
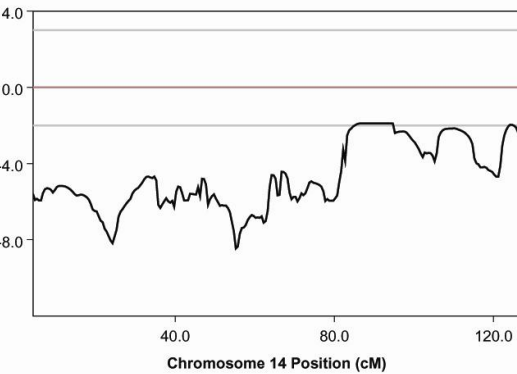
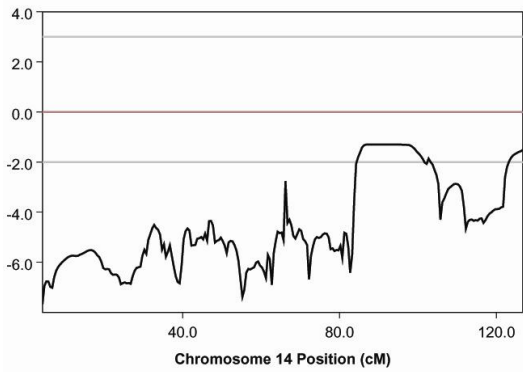
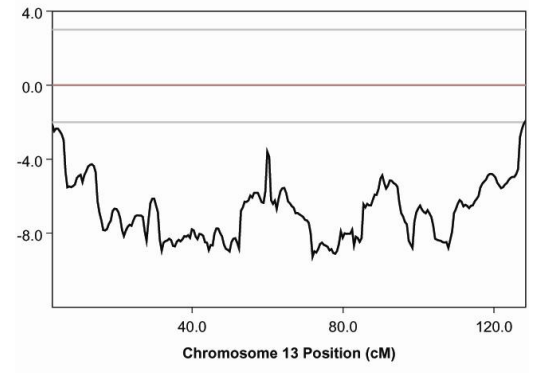
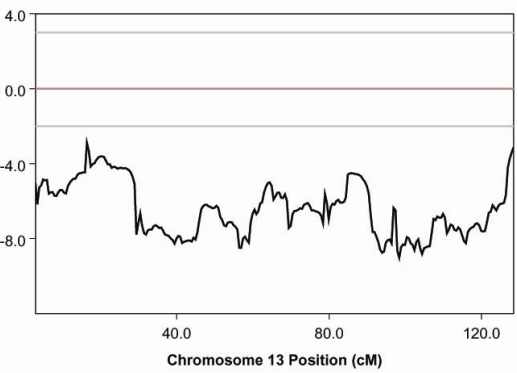
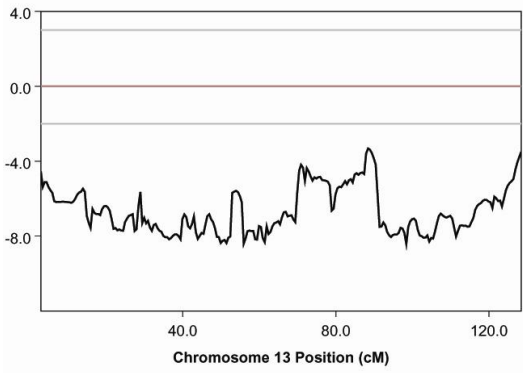
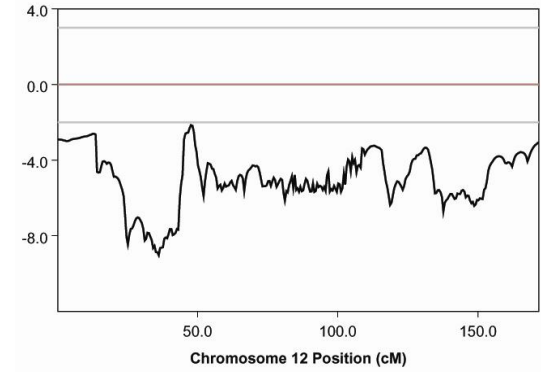
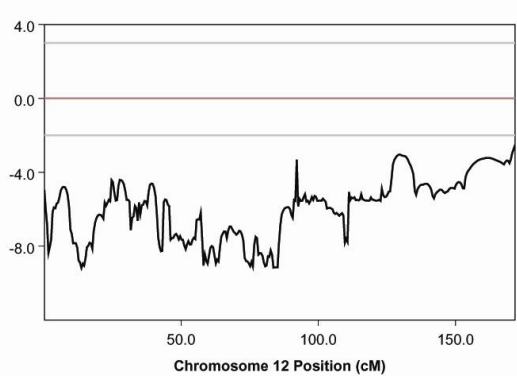
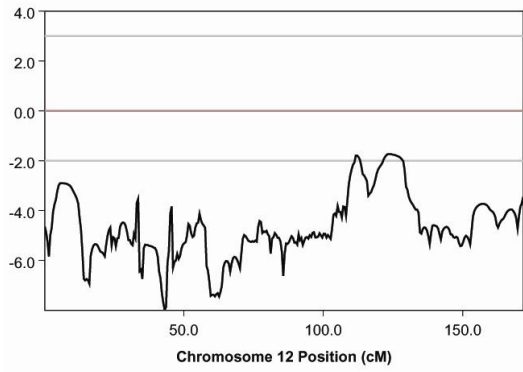
Continuação da Figura 8.2



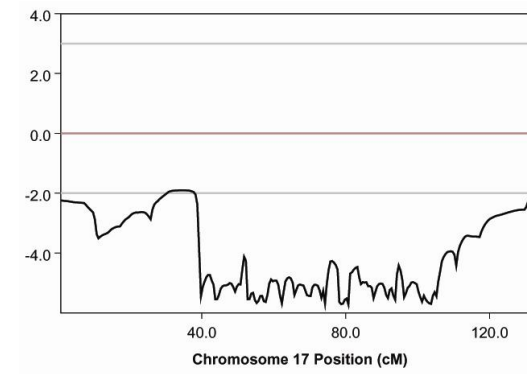
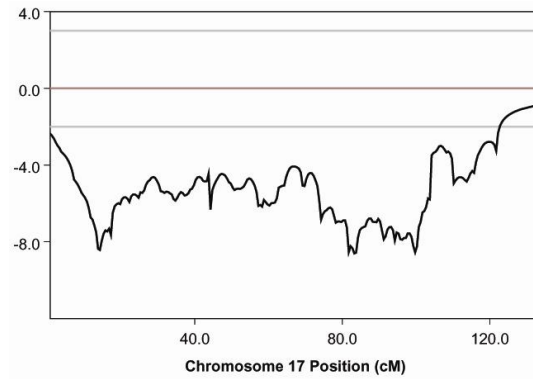
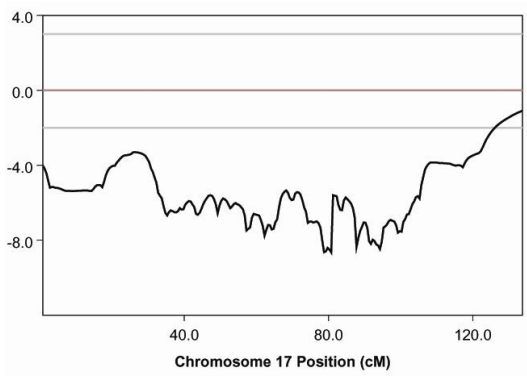
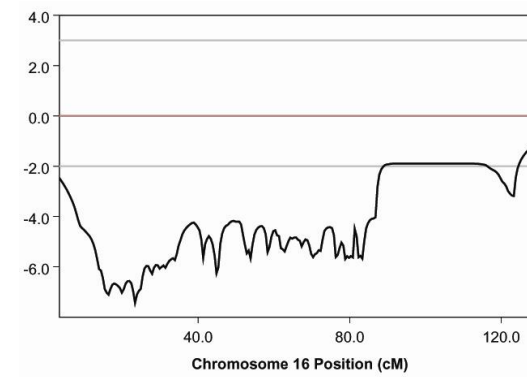
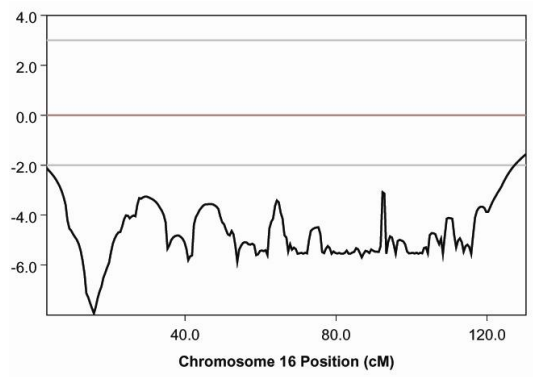
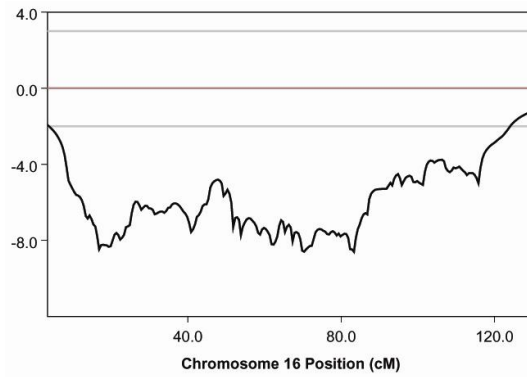
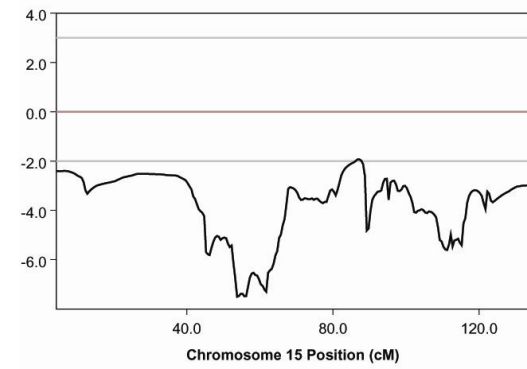
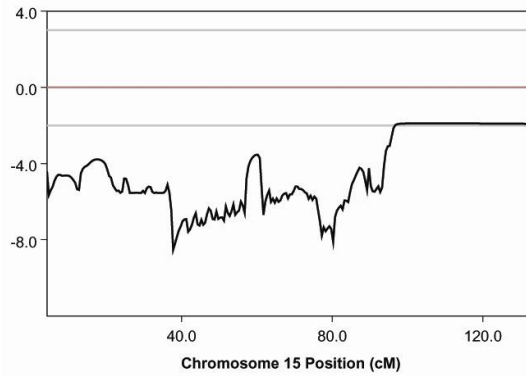
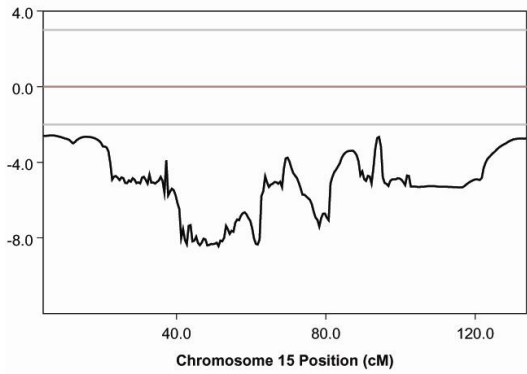
Continuação da figura 8.2



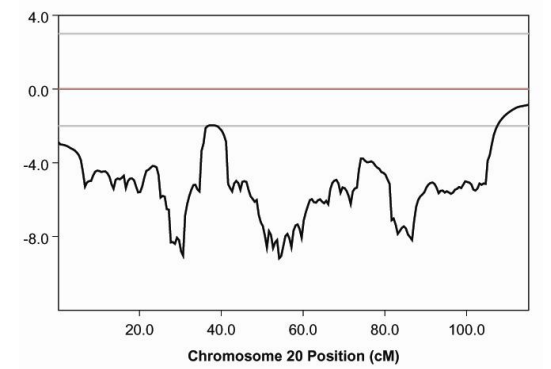
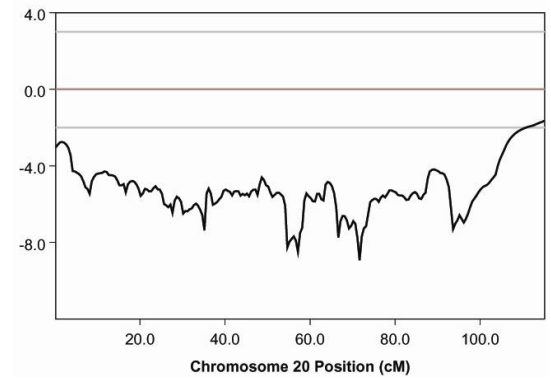
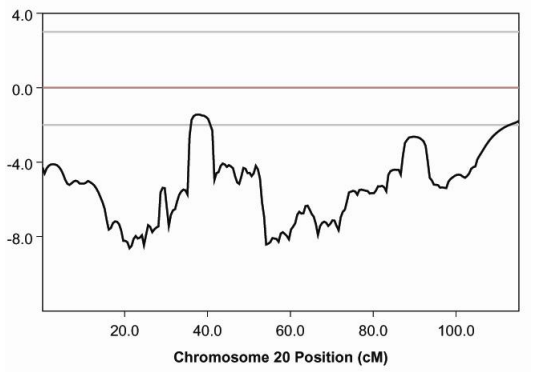
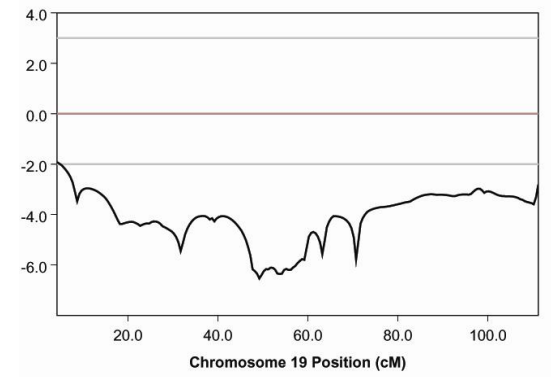
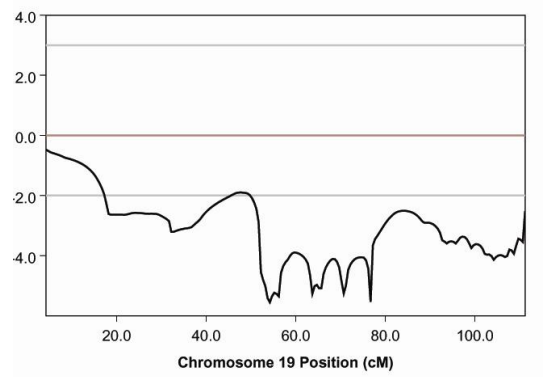
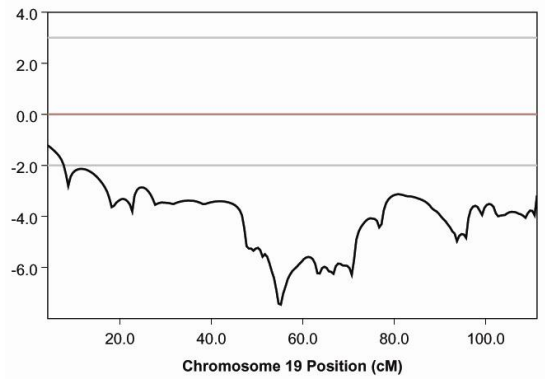
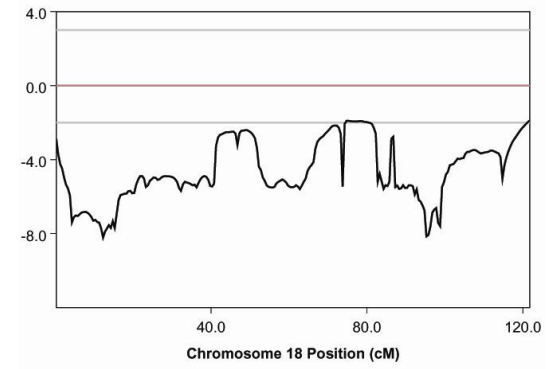
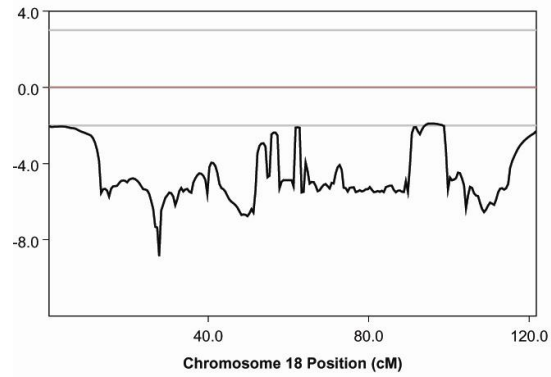
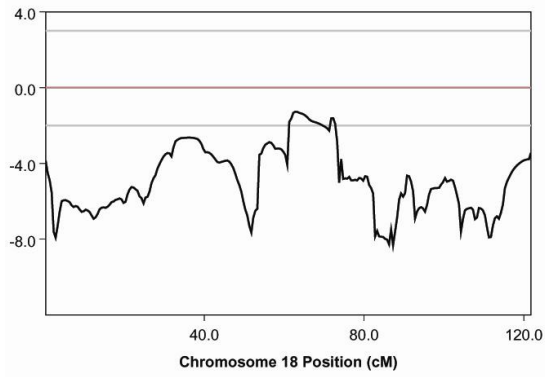
Continuação da Figura 8.2



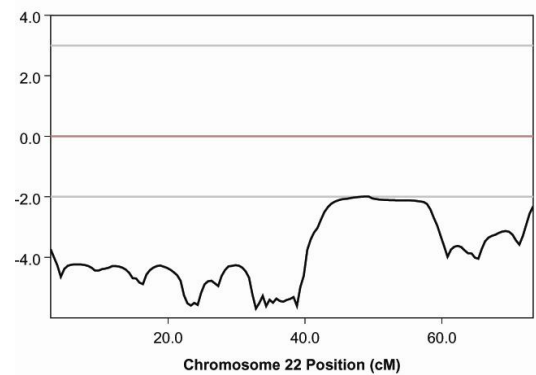
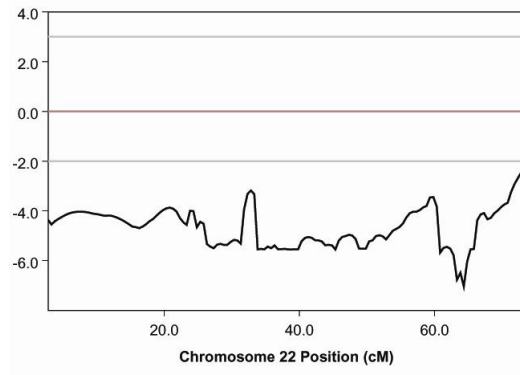
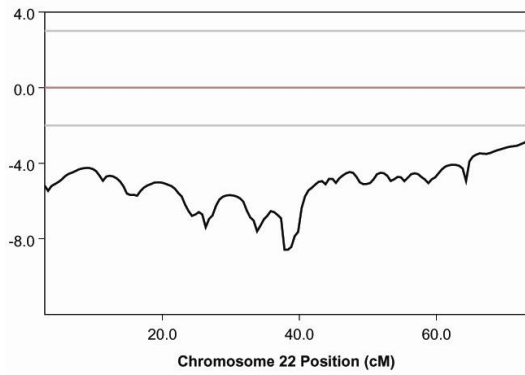
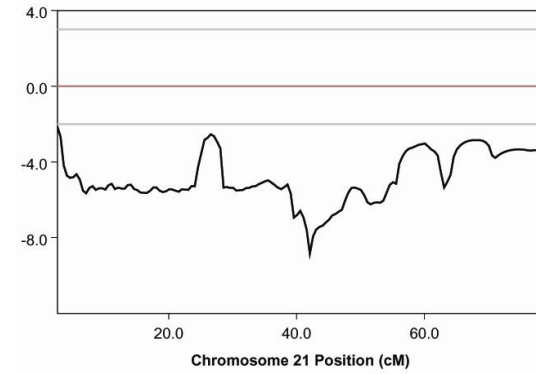
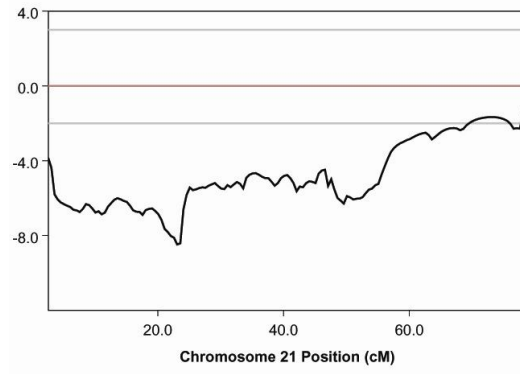
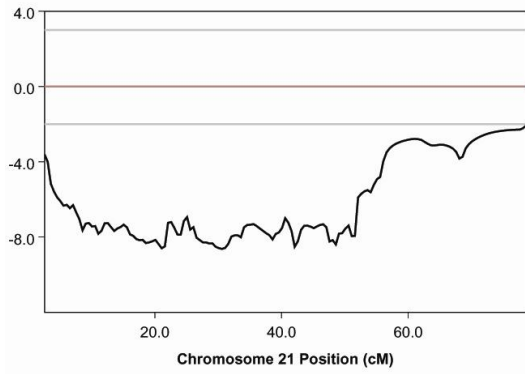
Continuação da Figura 8.2



Continuação da Figura 8.2

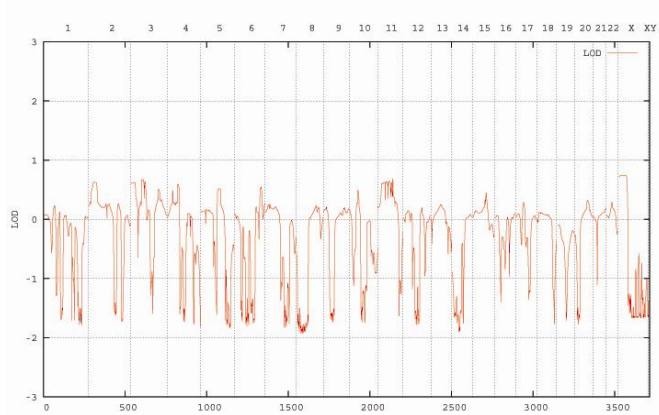


Continuação da Figura 8.2

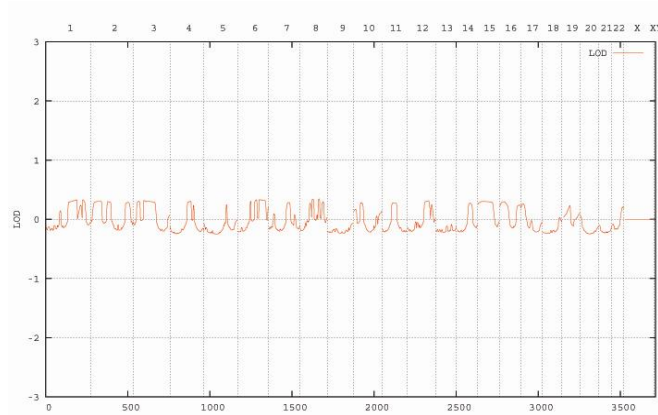


Continuação da Figura 8.2

A)



B)



C)

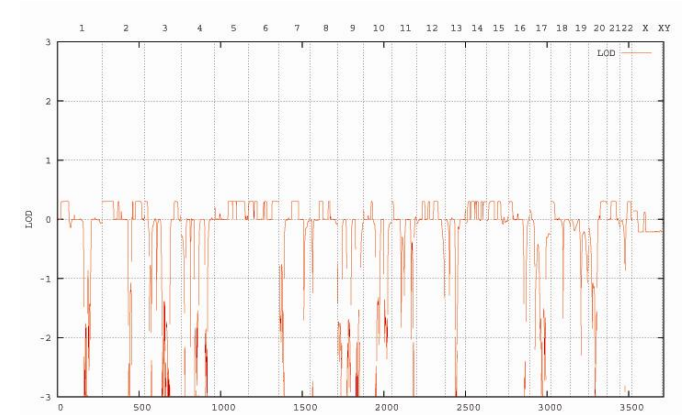


Figura 8.3: Resultados de *Lod Scores* de múltiplos pontos obtidos com resultados de *Arrays* de SNPs, para cada autossomo, calculados pelo programa Allegro.

A) Subpedigree 1; B) Subpedigree 2; C) Subpedigree 3.

5.4.2.2.4. Sequenciamento massivo em paralelo

O sequenciamento massivo em paralelo foi realizado utilizando a plataforma Illumina HiSeq 2000 (Illumina INC., San Diego, CA, USA) que permitiu a geração de 80.200.676 *reads* de 99 bp cada, gerando uma cobertura aproximada de 124X para um exoma que cobre cerca de 64 Mbp. A versão atual do genoma de referência (hg19) foi utilizada no alinhamento dos *reads*.

Para reduzir selecionar as variantes candidatas foi levada em conta a ocorrência das variantes presentes em uma amostra de 19 indivíduos brasileiros, do CEGH com o exoma sequenciado. Foram observadas 85.065 variantes ao todo (mutações de sentido trocado, mutações de códon de parada prematuro, mutações de perda de códon de parada, mutações de mudança na matriz de leitura e uma mutação cujo significado no transcrito ainda é incerto), nessa amostra. Era esperado que a variante candidata ocorresse somente nos membros da família sequenciados, ou seja, somente quatro vezes. Excluímos como candidatas todas as variantes que ocorreram cinco ou mais vezes nessa amostra. Dessa exclusão, restaram 13 variantes (11 de sentido trocado, uma de códon de parada prematuro e uma cujo significado no transcrito ainda é incerto). Além disso, a frequência das variantes selecionadas foi observada nos 1000 *genomes* e foram mantidas as variantes cujas frequências eram inferiores a 1%, mantendo o número de variantes a um total de 13 (Tabela 8.2). Dessas 13 variantes detectadas, duas foram selecionadas para estudos de segregação por sequenciamento de Sanger nas amostras de DNA dos indivíduos da família:

- c.T2090G: p.L697W 10: 26,414,513 no gene *MYO3A* (NM_017433).
- c.C1543T: p.Q515X 16: 48,333,581 no gene *LONP2* (NM_031490).

O gene *MYO3A* já foi relacionado à perda auditiva. A variante no gene *LONP2* foi selecionada por se tratar de uma mutação sem sentido.

Foi realizado o sequenciamento de Sanger da variante no gene *LONP2* e foi observado que essa variante não segrega com o fenótipo na família (Tabela 8.3). O produto desse gene é uma protease que media a degradação seletiva de polipeptídeos

mal posicionados e mal organizados na matriz do peroxisomo (<http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=LONP2&search=lonp2>).

Foi realizado o sequenciamento de Sanger da variante no gene *MYO3A* nos demais membros da família e foi verificado que ela aparentemente segrega com o fenótipo, com exceção de um indivíduo afetado que não a possui e de alguns indivíduos fenotipicamente normais que a apresentam (Tabela 8.3).

Tabela 8.2: Variantes cuja frequência no banco de dados *1000 genomes* são inferiores a 1%, presentes em heterozigose nos 4 indivíduos afetados testados da família.

| Genes | Variantes | Cromossomo |
|---------------|-----------------------------------|------------|
| <i>SEC22B</i> | Significado incerto no transcrito | 1 |
| <i>SELP</i> | NM_003005:c.G170A:p.R57H | 1 |
| <i>LHX4</i> | NM_033343:c.T81C:p.I27I | 1 |
| <i>LSM6</i> | NM_007080:c.A225T:p.T75T | 4 |
| <i>TBX18</i> | NM_001080508:c.G405A:p.S135S | 6 |
| <i>DNAH11</i> | NM_003777:c.A8044G:p.I2682V | 7 |
| <i>MYO3A</i> | NM_017433:c.T2090G:p.L697W | 10 |
| <i>OVCH1</i> | NM_183378:c.C1111T:p.R371C | 12 |
| <i>INO80E</i> | NM_173618:c.C299T:p.P100L | 16 |
| <i>SLC5A2</i> | NM_003041:c.A1961G:p.N654S | 16 |
| <i>LONP2</i> | NM_031490:c.C1543T:p.Q515X | 16 |
| <i>MC1R</i> | NM_002386:c.G425A:p.R142H | 16 |
| <i>HDAC10</i> | NM_001159286:c.T926C:p.L309P | 22 |

5.4.3. Discussão

O sequenciamento de todo o exoma identificou 13 genes e suas variantes como as candidatas a explicar o fenótipo na família e duas variantes foram selecionadas para estudos de segregação em uma primeira etapa.

Os estudos de segregação permitiram a exclusão da variante no gene *LONP2* como sendo a causa do fenótipo (Tabela 8.3).

A variante do gene *MYO3A* foi selecionada por se tratar de um gene já relacionado à perda auditiva. Observou-se que a variante parece segregar com o fenótipo na família, com exceção de um indivíduo afetado que não a possui e de sete indivíduos normais que a apresentam (Tabela 8.3). Entre os sete indivíduos supostamente normais, uma delas (com 28 anos) tem status duvidoso (VI:1) pois tem

queixa mas nunca realizou avaliação audiológica. Dentre os seis restantes, há indivíduos com idades entre 12-28 que poderiam não ter ainda manifestado o quadro. Mas há dois indivíduos com 39 e 58 anos, que herdaram a mutação e não tem sintomas, poderíamos supor que são indivíduos não penetrantes. A variante ainda não foi testada em nossa coleção de amostras de 47 probandos afetados por surdez de herança autossômica dominante, nem nas amostras de famílias com surdez recessiva.

Tabela 8.3: Segregação das variantes dos genes *MYO3A* e *LONP2* na família 5.

| | <i>MYO3A</i> (c.T2090G) | <i>LONP2</i> (C1543T) | |
|-----------|-------------------------|-----------------------|----------|
| IV:5 | S | N | |
| V:1 | S | S | |
| Propósito | S | S | |
| V:7 | S | S | |
| V:13 | S | S | |
| V:14 | S | N | AFETADOS |
| V:15 | S | N | |
| V:20 | S | N | |
| V:22 | S | S | |
| V:24 | S | N | |
| V:26 | S | N | |
| V:30 | S | S | |
| V:31 | N | S | |
| <hr/> | | | |
| IV:7 | N | N | |
| V:5 | N | N | |
| V:8 | N | N | |
| V:10 | N | S | |
| V:18 | S | N | |
| V:21 | N | N | |
| V:25 | N | N | |
| V:27 | N | N | |
| V:28 | N | N | |
| VI:1* | S | N | |
| VI:2 | S | S | |
| VI:3 | N | N | |
| VI:4 | N | N | NORMAIS |
| VI:5 | N | N | |
| VI:6 | N | N | |
| VI:7 | N | N | |
| VI:8 | S | N | |
| VI:9 | N | N | |
| VI:10 | N | N | |
| VI:11 | N | S | |
| VI:13 | S | N | |
| VI:14 | S | S | |
| VI:15 | S | N | |
| VI:16 | N | N | |
| VII:1 | N | S | |

S- presente; N - ausente.

* Indivíduo relatou problemas auditivos. No entanto não contamos com resultados de avaliação audiológica.

O produto do gene *MYO3A* é uma miosina não convencional que participa na formação das fibras motoras de actina (Dosé e Burnside, 2000) e foi mapeado previamente no locus DFNB30 por Walsh e col. (2002). Walsh e col. (2002) estudaram uma família de judeus que apresentava três gerações de indivíduos afetados por perda auditiva de herança autossômica recessiva, cuja idade de manifestação média foi a partir da segunda década de vida, afetando a audição somente em altas frequências e após a quinta década de vida, afetava a audição em frequências médias e baixas. Foram identificadas 3 mutações no gene *MYO3A* que segregavam com o fenótipo na família: uma mutação sem sentido originando uma proteína truncada, uma mutação no sítio acceptor de *splicing* do íntron 17 que acarreta na deleção do exon 18 (formação de uma proteína truncada) e uma mutação no sítio acceptor de *splicing* do íntron 8 que resultou em um RNA mensageiro instável (Walsh e col., 2002). Não foram encontrados dados sobre as frequências das mutações encontradas por Walsh e col. (2002) no banco de dados *1000 genomes*. Todos os afetados tinham pelo menos duas dessas mutações, alguns eram homozigotos e outros heterozigotos compostos. Em camundongos, o gene *MYO3A* é expresso na cóclea, sendo relacionado ao desenvolvimento das células ciliadas no início da vida do camundongo (Lelli e col., 2009).

O padrão de herança na família por nós estudada é dominante e o padrão da família estudada por Walsh e col. (2002) é o recessivo. Curiosamente, o início da perda auditiva somente se deu na segunda década de vida nos membros de ambas as famílias, apesar da diferença no mecanismo de herança.

Mutações no gene *MYO3A* nunca foram associadas à perda auditiva dominante e após o trabalho de Walsh e col. (2002), Choi e col. (2013) identificaram duas variantes no gene *MYO3A* em famílias de afetados por surdez recessiva. Choi e col. (2013) estudaram 145 probandos de famílias afetadas por perda auditiva por meio do painel de sequenciamento massivo de 80 genes de surdez já conhecidos. Foram identificadas, no gene *MYO3A*, uma variante *missense* e uma variante do tipo de inserção. Não foram encontradas essas duas variantes no banco de dados *1000 genomes*.

São necessários outros estudos para confirmar o papel dessa variante em heterozigose na perda auditiva de herança autossômica dominante. Em virtude desses achados, algumas hipóteses foram levantadas. Poderia ser aventado que a perda auditiva nessa família decorre de herança digênica e uma segunda variante em outro gene seria necessária para desencadear o fenótipo. Existem três variantes (uma de significado desconhecido e duas *missense*) localizadas no cromossomo 1 e quatro variantes (uma no *LONP2* e três *missense* em outros genes) localizadas no cromossomo 16 (Tabela 8.2) que poderiam ser herdadas em bloco e contribuir com o fenótipo.

Novos ensaios estão em planejamento para estudar a segregação das demais variantes na família. Estudos de expressão gênica são necessários para confirmar o papel da variante no gene *MYO3A* na perda auditiva de herança autossômica dominante. Estudos de segregação das demais variantes identificadas, principalmente as dos cromossomos 1 e 16, serão realizados em breve com a finalidade de testar a hipótese de herança digênica ou de outra variante ser, de fato, a responsável pelo quadro.

Capítulo 6

Considerações Finais

Nesse estudo, pudemos evidenciar o excelente potencial das famílias brasileiras em revelar novos genes ou novos mecanismos mutacionais que levam à surdez. No entanto, para estudos de mapeamento sejam efetivamente conduzidos, é necessário que alguns critérios sejam satisfeitos: As famílias devem ser grandes, com muitos indivíduos afetados e distribuídos em várias gerações; o diagnóstico clínico de cada indivíduo da família deve ser feito com muita precisão, a fim de evitar classificação errada no que diz respeito à presença ou tipo de afecção; deve-se levar em consideração a possibilidade de ocorrer heterogeneidade de alelo e/ou de locus; a penetrância deve ser corretamente calculada, o que pode ser difícil se houver dificuldade na avaliação clínica dos indivíduos.

Na primeira família, a falta de informações clínicas dificultou o diagnóstico molecular pois, em um primeiro momento, não tínhamos resultados de exames que indicassem que a perda era condutiva e sindrômica. Além disso, o sequenciamento de Sanger não mostrou a mutação, ainda que o gene candidato fosse o correto. A mutação somente foi identificada após a utilização da técnica de *array*-CGH.

Na família 4, duas regiões candidatas foram sugeridas pelos estudos de varredura genômica e de cálculo de *Lod Score*. Curiosamente, a mutação responsável não estava presente na região de *Lod Score* mais alto. Havia, também, aparente heterogeneidade na gravidade dos fenótipos e que se traduziu, na prática, na detecção de três fenocópias.

Na família 5, as análises de ligação para o mapeamento de regiões candidatas foram muito prejudicadas devido à estrutura da genealogia da família. Os programas de análise de ligação não conseguiram processar os dados do pedigree completo. O exoma foi, portanto, realizado em amostras de quatro indivíduos afetados e, por isso, conseguimos restringir a quantidade de variantes candidatas a explicar o fenótipo na família a 13, número muito maior do que nos casos das famílias onde houve sucesso na análise de ligação.

Em resumo, os estudos que incluíram sequenciamento massivo em paralelo de todos os exons permitiram identificar mutações em dois genes já conhecidos e em dois genes provavelmente novos, que são os mais prováveis a explicar a perda auditiva em quatro das famílias, em um período muito curto de tempo, em comparação com a busca clássica de genes candidatos adotada previamente. Podemos considerar que, a união das metodologias de análise de ligação com as tecnologias de sequenciamento massivo em paralelo foram de grande valia nesse estudo. Por fim, a associação de estudos de ligação com *array-CGH* permitiu identificar um novo mecanismo de mutação na síndrome BOS.

Capítulo 7.

Conclusões

O estudo molecular das cinco famílias com surdez de herança autossômica dominante permitiu as seguintes conclusões, resumidas nos parágrafos a seguir:

Na família 1 foi identificada uma grande duplicação não descrita no gene *EYAI*, associada à síndrome BOS1.

Na família 2, a varredura genômica com o uso de marcadores moleculares do tipo microssatélites e os resultados dos cálculos de *Lod Score* mapearam uma região no cromossomo 3 como a candidata a conter o gene responsável pela surdez na família. Os estudos de sequenciamento massivo em paralelo seguidos por sequenciamento de Sanger permitiram que fosse identificada uma variante (c.C28T) no gene *PLS1* como sendo a mais provável causa da perda auditiva na família. Por se tratar de um gene nunca antes associado à perda auditiva, são necessários estudos de mais famílias e ensaios funcionais, para confirmar o papel desse gene na perda auditiva.

Na família 3, a varredura genômica com o uso de *arrays* de SNP e os resultados dos cálculos de *Lod Score* mapearam uma região no cromossomo 20 como candidata a conter o gene responsável pela surdez na família. Os estudos de sequenciamento massivo em paralelo seguidos por sequenciamento de Sanger permitiram que fosse identificada uma variante (c.C2195G) no gene *NCOA3* como sendo a mais provável causa da perda auditiva na família. Por se tratar de gene nunca antes associado à perda auditiva, também são necessários estudos com outras famílias e ensaios funcionais, para confirmar o papel desse gene na perda auditiva.

Na família 4, a varredura genômica com o uso de *arrays* de SNP e os resultados dos cálculos de *Lod Score* mapearam duas regiões uma no cromossomo 14 e outra no cromossomo 22, como as candidatas mais prováveis a conter o gene responsável pela surdez na família. Os estudos de sequenciamento massivo em paralelo seguidos pelo sequenciamento de Sanger permitiram que fosse identificada uma variante no gene *MYH9* (DFNA17) como sendo a provável causa da perda auditiva na família. A

variante rs80338828 já foi associada à perda auditiva em dois outros estudos. Em vista desses achados, atribuímos a perda auditiva nessa família a essa variante.

Na família 5, a varredura genômica com o uso de *arrays* de SNP e os resultados dos cálculos de *Lod Score* não permitiram mapear nenhuma região candidata a conter o gene responsável pelo fenótipo devido a dificuldades computacionais. No entanto, o sequenciamento massivo em paralelo seguido do de Sanger permitiu a identificação de uma variante no gene *MYO3A* como sendo a mais provável candidata a explicar o fenótipo na família. O gene *MYO3A* corresponde ao DFNB30 e mutações nesse gene somente foram associadas à perda auditiva de herança autossômica recessiva. Apesar do padrão de herança da família por nós estudada ser o dominante, esse gene permanece como sendo o melhor candidato a explicar a perda auditiva na família por sua prévia associação com quadros de surdez. No entanto, o papel de outras variantes candidatas não pode ser completamente descartado.

Capítulo 8.

Referências Bibliográficas

- Abdelhak S, Kalatzis V, Heilig R, e col. (1997a). Clustering of mutations responsible for branchio-oto-renal (BOR) syndrome in the eyes absent homologous region (eyaHR) of EYA1. *Hum. Molec. Genet.* 6: 2247-2255.
- Abdelhak S, Kalatzis V, Heilig R, e col (1997b). A human homologue of the *Drosophila eyes absent* gene underlies Branchio-Oto-Renal (BOR) syndrome and identifies a novel gene family. *Nature Genet* 15:157-164.
- Abreu-Silva RS, Lezirovitz K, Braga MC, Spinelli M, Pirana S, Della-Rosa VA, Otto PA, Mingroni-Netto RC (2006). Prevalence of the A1555G (12S rRNA) and tRNASer (UCN) mitochondrial mutations in hearing-impaired Brazilian patients. *Braz J Med Biol Res* 39: 219-26.
- Ahmad J, Khan SN, Khan SY e col. (2005). DFNB48, a new nonsyndromic recessive deafness locus, maps to chromosome 15q23-q25.1. *Hum Genet* 116: 407-12.
- Ahmed ZM, Smith TN, Riazuddin S, e col. (2002). Nonsyndromic recessive deafness DFNB18 and Usher syndrome tipe IC are allelic mutations of USH1C. *Hum Genet* 110: 527-31.
- Ahmed ZM, Morell RJ, Riazuddin S e col. (2003). Mutations of MYO6 Are Associated with Recessive Deafness, DFNB37. *Am J Hum Genet* 72: 1315-22.
- Ahmed ZM, Masmoudi S, Kalay E, e col. (2008). Mutations of LRTOMT, a fusion gene with a alternative Reading frames, cause nonsyndromic deafness in humans. *Nat Genet* 40(11):1335-40.
- Ahmed ZM, Yousaf R, Lee BC, e col. (2011). Functional null mutations of MSR3B3 encoding methionine sulfoxide reductase are associated with human deafness DFNB74. *Am J Hum Genet* 88(1):19-29.
- Ain Q, Nazli S, Riazuddin S, e col. (2007). The autosomal recessive nonsyndromic deafness locus DFNB72 is located on chromosome 19p13.3. *Hum Genet* 122(5):445-50.
- Ali G, Santos RI, John P e col. (2006). The mapping of DFNB62, a new locus for a autosomal recessive non-syndromic hearing impairment, to chromosome 12p13.2-p11.23. *Clin Genet* 69: 429-33.
- Ansar M, Din AA, Arshad M, e col. (2003). A novel autosomal recessive non-syndromic deafness locus (DFNB35) maps to 14q24.1-14q24.3 in large consanguineous kindred from Pakistan. *Eur J Hum Genet* 11: 77-80.
- Ansar M, Chahrour MH, Amin Ud Din M, e col. (2004). DFNB44, anovel autosomal recessive non-syndromic hearing impairment locus, maps to chromosome 7p14.1-q11.22. *Hum Hered* 57:195-9.
- Ansar M, Lee K, Naqvi SK, e col. (2011). A new autosomal recessive nonsyndromic hearing impairment locus DFNB96 on chromosome 1p36.31-p36.13. *J hum Genet* 56(12):866-8.

- Anderson DW, Griffith AJ, Rudy S, San Agustin T, Friedman TB, Morell RJ (1999). A new locus for autosomal dominant hearing loss DFNA28 mapped to chromosome 8q22. 49th Annual Meeting of the American Society of Human Genetics: Program Nr: 1336 (<http://www.faseb.org/genetics/ashg99/f1336.htm>).
- Anson BJ (1973). Embriology and anatomy of the ear. In: Paparella M, Shumrick D. Otolaryngology. Philadelphia: Saunders & De Wesse, 1973.
- Aslam M, Wajid M, Chahroud MH e col. (2005). A novel autosomal recessive nonsyndromic hearing impairment locus (DFNB42) maps to chromosome 3q13.31-q22.3. *Am J Med Genet A*. 133: 18-22.
- Bacino C, Prezant TR, Bu X, e col. (1995). Susceptibility mutations in the mitochondrial small ribosomal RNA gene in aminoglycoside induced deafness. *Pharmacogenetics* 5(3):165-72.
- Baldwin CT, Weiss S, Farrer RA, e col. (1995). Linkage of congenital, recessive deafness (DFNB4) to chromosome 7q31 and evidence for genetic heterogeneity in the middle eastern Druze population. *Hum Mol Genet* 4: 1637-1642.
- Ballinger SW, Shoffner JM, Hedaya EV, e col. (1992). Maternally transmitted diabetes and deafness associated with a 10.4 kb mitochondrial DNA deletion. *Nat Genet* 1(1):11-5.
- Bespalova IN, Van Camp G, Bom SJ, e col (2001). Mutations in the Wolfram syndrome 1 gene (WFS1) are a common cause of low frequency sensorineural hearing loss. *Hum Mol Genet* 10(22):2501-8.
- Bhatti A, Lee K, McDonald ML, e col. (2008). Mapping of a new autosomal recessive non-syndromic hearing impairment locus (DFNB45) to chromosome 1q43-q44. *Clin Genet* 73(4):395-8.
- Boie Y, Sawyer N, Slipetz DM, e col (1995). Molecular Cloning and Characterization of the Human Prostanoid DP Receptor. *The Journal of Biological Chemistry* 270(32):18910-18916.
- Bonapace G, Concolino D, Formicola S, Strisciuglio P (2003). A novel mutation in a patient with insulin-like growth factor 1 (IGF1) deficiency. *J Med Genet* 40: 913-917.
- Bonne-Tamir B, DeStefano AL, Briggs CE, e col. (1996). Linkage of congenital recessive deafness (gene DFNB10) to chromosome 21q22.3. *Am J Hum Genet* 58: 1254-9.
- Bonsch D, Scheer P, Neumann C, Lang-Roth R, Seifert E, Storch P, Weiller C, Lamprecht-Dinnesen A, Deufel T (2001). A novel locus for autosomal dominant, non-syndromic hearing impairment (DFNA18) maps to chromosome 3q22 immediately adjacent to the DM2 locus. *Eur J Hum Genet* 9:165-70.
- Borck G, Ur Rehman A, Lee K, e col. (2011). Loss-of-function mutations of ILDR1 cause autosomal-recessive hearing impairment DFNB42. *Am J Hum Genet* 88(2):127-37.
- Bork JM, Peters LM, Razuddin S, e col. (2001). Usher syndrome 1D and nonsyndromic autosomal recessive deafness DFNB12 are caused by allelic mutations of the novel cadherin-like gene CDH23. *Am J Hum Genet* 68: 26-37.
- Braga MCC, Otto PA, Spinelli M (1999). Recurrence Risks in cases of Nonsyndromic Deafness. *Braz J Dys and Speech-ear d Dis* 2:33-40.
- Brownstein Z, Bhonker Y e Avraham KB (2011). High-throughput sequencing to decipher the genetic heterogeneity of deafness. *Genoma Beiology* 13:245-54.

- Brownstein Z, Bhonker Y, Avraham KB (2012). High-throughput sequencing to decipher the genetic heterogeneity of deafness. *Genome Biol* 13(5):245.
- Bykhovskaya Y, Estivill X, Taylor K, et al. (2000). Candidate locus for a nuclear modifier gene for maternally inherited deafness. *Am J Hum Genet* 66(6):1905-10.
- Calzolari E, Sensi A, Gualandi F (2001). Protocol for syndromal disorders associated with hearing impairment. In: Martini A, Mazzoli M, Stephens D, Read A. *Definitions, Protocols and Guidelines in Genetic Hearing Impairment*: 50-71.
- Campbell D A, MacHale D P, Brown K A, Moynihan L M, Houseman M, Karbani G, Parry G, Janjua A H, Newton V, Al-Gazali L, Markhan A F, Lench N J, Mueller R F (1997). A new locus for non-syndromal recessive, sensorineural hearing loss (DFNB16) maps to human chromosome 15q21q22. *J Med Genet* 34: 1015-1017.
- Carlson NR (1998). **Physiology of behavior**. 6^a ed. Allyn and Bacon, Boston.
- Casano RA, Johnson DF, Bykhovskaya Y, et al. (1999). Inherited susceptibility to aminoglycoside ototoxicity: genetic heterogeneity and clinical implications. *Am J Otolaryngol* 20(3):151-6.
- Cediel R, Riquelme R, Contreras J, et al (2006). Sensorineural hearing loss in insulin-like growth factor I-null mice: a new model of human deafness. *European Journal of Neuroscience* 23:587-590.
- Chaib H, Lina-Granade G, Guilford P, Plauchu H, Levilliers J, Morgon A, Petit C (1994). A gene responsible for a dominant form of neurosensory non-syndromic deafness maps to the NSRD1 recessive deafness gene interval. *Hum Mol Genet* 3: 2219-22.
- Chaib H, Place C, Salem N et al. (1996a). A gene responsible for a sensorineural nonsyndromic recessive deafness maps to chromosome 2q22-23. *Hum Mol Genet* 5: 155-8.
- Chaib H, Place C, Salme N, et al. (1996b). Mapping of DFNB12, a gene for a non-syndromal autosomal recessive deafness, to chromosome 10q21-22. *Hum Mol Genet* 5:1061-4.
- Charizopoulou N, Lelli A, Schraders M, et al. (2011). Gipc3 mutations associated with audiogenic seizures and sensorineural hearing loss in mouse and human. *Nat Commun* 2:201.
- Chen, A, Francis, M., Ni, L, et al (1995). Phenotypic manifestations of branchiootorenal syndrome. *Am. J. Med. Genet* 58: 365-370.
- Chen A, Wayne S, Bell A, et al. (1997). New gene for autosomal recessive non-syndromic hearing loss maps to either chromosome 3q or 19p. *Am J Med Genet* 71: 467-71.
- Chen AH, Ni L, Fukushima K, Marietta J, O'Neill M, Coucke P, Willems P, Smith RJ (1997). Linkage of a gene for dominant non-syndromic deafness to chromosome 19. *Hum Mol Genet* 4:1073-6.
- Chen W, Kahrizi K, Meyer NC, et al. (2005). Mutation of COL11A2 causes autosomal recessive non-syndromic hearing loss at the DFNB53 locus. *J Med Genet* 42:e61.
- Cheng J, Zhu Y, He S, Lu Y, Chen J, Han B, Petrillo M, Wrzeszczynski KO, Yang S, Dai P, Zhai S, Han D, Zhang MQ, Li W, Liu X, Li H, Chen ZY, Yuan H. (2011). Functional Mutation of SMAC/DIABLO encoding a mitochondrial proapoptotic protein, causes human progressive hearing loss DFNA64. *The Am J of Human Genetics* 89, 56-66.

- Chishti MS, Lee K, McDonald ML, e col. (2009). Novel autosomal recessive non-syndromic hearing impairment locus (DFNB71) maps to chromosome 8p22-21.3. *J Hum Genet* 54(3):141-4.
- ChoiBY, Park G, Gim J, e col. (2013). Diagnostic Application of Targeted Resequencing for Familial Nonsyndromic Hearing Loss. *Plos One* 8(8): e68692. doi: 10.1371/journal.pone.0068692.
- Collin RW, Kalay E, Tariq M, e col. (2008). Mutations of ESRRB encoding estrogen-related receptor beta cause autosoma-recessive nonsyndromic hearing impairment DFNB35. *Am J Hum Genet* 82(1):125-38.
- Cottingham RW Jr, Idury RM e Schaffer AA (1993). Faster sequential genetic linkage computations. *Am J Hum Genet* 53:252-63.
- Coucke P, Van Camp G, Djoyodiharjo B, Smith SD, Frants RR, Padberg GW, Darby JK, Huizing EH, Cremers CW, Kimberling WJ, e col. (1994). Linkage of autosomal dominant hearing loss to the short arm of chromosome 1 in two families. *N Engl J Med* 331: 425-31.
- D'Adamo P, Donaudy F, D'Eustacchio A, Di Iorio E, Melchionda S, Gasparini P (2003a). A new locus (DFNA47) for autosomal dominant non-syndromic inherited hearing loss maps to 9p21-22 in a large Italian family. *Eur J Hum Genet* 11:121-4.
- D'Adamo P, Pinna M, Capobianco S, Cesarani A, D'Eustacchio A, Fogu P, Carella M, Seri M, Gasparini P (2003b). A novel autosomal dominant non-syndromic deafness locus (DFNA48) maps to 12q13-q14 in a large Italian family. *Hum Genet* 112:319-20.
- Davis H e Silverman RS. **Hearing and Deafness**. 3^a ed. New York: Holt, Rinehart e Wilson: 1970. P. 253-79.
- De Kok YJ, van der Maarel SM, Bitner-Glindzicz M, e col. (1995). Association between X-linked mixed deafness and mutations in the POU domain gene POU3F4. *Science* 267(5198):685-8.
- Del Castillo I, Villamar M, Sarduy M, e col. (1996). A novel locus for non-syndromic sensorineural deafness (DFN6) maps to chromosome Xp22. *Hum Mol Genet* 5(9):1383-7.
- Delmaghani S, Aghaie A, Compain-Nouaille S e col. (2003). DFNB40, a recessive form of sensorineural hearing loss, maps to chromosome 22q11.21-12.1. *Eur J Human Genet* 11: 816-8.
- Delmaghani S, del Castillo FJ, Michel V, e col. (2006). Mutations in the gene encoding pejvakin, a newly identified protein of the afferent auditory pathway, cause DFNB59 auditory neuropathy. *Nat Genet* 38:770-8.
- Delmaghani S, Aghaie A, Michalski N, e col (2012). Defect in the gene encoding the EAR/EPTP domain-containing protein TSPEAR causes DFNB98 profound deafness. *Hum Mol Genet* 21(17): 3835-44.
- Denoyelle F, Weil D, Maw MA, Wilcox SA, Lench NJ, Allen-Powell DR, Osborn AH, Dahl HH, Middleton A, Houseman MJ, Dode C, Marlin S, Boulila-ElGaid A, Grati M, Ayadi H, BenArab S, Bitoun P, Lina-Granade G, Godet J, Mustapha M, Loiselet J, El-Zir E, Audois A, Joannard A, Petit C, e col. (1997). Prelingual Deafness: High prevalence of a 30delG mutation ion the connexin 26 gene. *Hum Mol Genet* 6: 217302177.

- Dose AC, Burnside B (2000). Cloning and chromosomal localization of a human class III myosin. *Genomics* 67: 333-342.
- Du X, Schwander M, Moresco EM, e col. (2008). A catechol-O-methyltransferase essential for auditory function in mice and humans. *Proc Natl Acad USA* 105(38):14609-14.
- Durrant JD, Lovrinic JH (1995). Bases of Hearing science. 3 edição. Williams & Wilkins. Baltimore.
- Estivill X, Govea N, Barceló E, e col. (1998). Familial progressive sensorineural deafness is mainly due to the mtDNA A1555G mutation and is enhanced by treatment of aminoglycosides. *Am J Hum Genet* 62(1):27-35.
- Estivill X e Gasparini P (10/2008). The Connexin-deafness homepage. World Wide Web URL <http://www.iro.es/cx26deaf.html>
- Fagerheim T, Nilssen O, Raeymaekers P, Brox V, Moum T, Elverland HH, Teig E, Omland HH, Fostad GK, Tranebjaerg L (1996). Identification of a new locus for autosomal dominant non-syndromic hearing impairment (DFNA7) in a large Norwegian family. *Hum Mol Genet* 5: 1187-91.
- Fischel-Ghodsian N, Prezant TR, Fournier P, e col. (1995). Mitochondrial mutation associated with nonsyndromic deafness. *Am J Otolaryngol* 16(6):403-8.
- Flex E, Mangino M, Mazzoli M, Martini A, Migliosi V, Colosimo A, Mingarelli R, Pizzuti A, Dallapiccola B (2003). Mapping of a new autosomal dominant non-syndromic hearing loss locus (DFNA43) to chromosome 2p12. *J Med Genet* 40:278-81.
- Fraser FC, Sproule J R, Halal F (1980). Frequency of the branchio-oto-renal (BOR) syndrome in children with profound hearing loss. *Am. J. Med. Genet* 7: 341-349.
- Fridell RA, Boger EA, San Agustin T, Brownstein MJ, Friedman TB and Morell RJ (1999). DFNA27, a new locus for autosomal dominant hearing impairment on chromosome 4. 49th Annual Meeting of the American Society of Human Genetics: Program Nr: 1388 (<http://www.faseb.org/genetics/ashg99/f1388.htm>).
- Friedman TB, Liang Y, Weber JI, Hinnant JT, Barber TD, e col. (1995). A gene for congenital, recessive deafness DFNB3 maps to the pericentromeric region of chromosome 17. *Nat Genet* 9:86-91.
- Friedman RA, Bykhovskaya Y, Sue CM, e col. (1999). Maternally inherited nonsyndromic hearing loss. *Am J Med Genet* 84(4):369-72.
- Fukuhara N, Tokiguchi S, Shirakawa K, e col. (1980). Myoclonus epilepsy associated with ragged-red fibres (mitochondrial abnormalities): disease entity or a syndrome? Light-and electron-microscopic studies of two cases and review of literature. *J Neurol Sci* 47(1):117-33.
- Fukushima K, Ramesh A, Srisailapathy CR, e col. (1995). An autosomal recessive nonsyndromic form of sensorineural hearing loss map to 3p-DFNB6. *Genome Res* 5: 305-8.
- Fukushima K, Kasai N, Ueki Y, Nishizaki K, Sugata K, Hirakawa S, Masuda A, Gunduz M, Ninomiya Y, Masuda Y, Sato M, McGuirt WT, Coucke P, Van Camp G, Smith RJ (1999). A gene for fluctuating, progressive autosomal dominant nonsyndromic hearing loss, DFNA16, maps to chromosome. 2q23-24.3. *Am J Hum Genet* 65(1):141-50.

- Gasparini P, Rabionet R, Barbujani G, Melchionda S, Petersen M, Brondum-Nielsen K, Metspalu A, Oitmaa E, Pisano M, Fortina P, Zelante L, Estivill X (2000). High carrier frequency of the 35delG deafness mutation in European populations. Genetic Analysis Consortium of *GJB2* 35delG. *Eur J Hum Genet* 8:19-23.
- Gigante M, d'Altilia M, Montemurno E, e col. (2013). Branchio-Oto-Renal Syndrome (BOR) associated with focal glomerulosclerosis in a patient with a novel EYA1 splice site mutation. *Nephrology* 14:60.
- Gillisen C, Hoischen A, Brunner HG, e col. (2012). Disease gene identification strategies for exome sequencing. *Eur J Hum Genet* 20:490-497.
- Gorlin RJ, Reardon W, Toriello HV (2004). Hereditary hearing loss and its syndromes. Oxford, 2ª edição. 502.
- Goto Y, Nonaka I, Horai S (1990). A mutatio in the tRNA(Leu)(UUR) gene associated with the MELAS subgroup of mitochondrial encephalomyopathies. *Nature* 348(6302):651-3.
- Green e col., 1998. "The molecular Biology of Hearing and Deafness meeting Bethesda, October 8-11, 1998" (abstract 108) *apud* Van Camp & Smith, 05/2003 – **Hereditary Hearing Loss Home page** (<http://dnalab-www.uia.ac.be/dnalab/hhh/>).
- Greene CC, McMillan PM, Barker SE, Kurnool P, Lomax MI, Burmeister M, Lesperance MM (2001). DFNA25, a novel locus for dominant nonsyndromic hereditary hearing impairment, maps to 12q21-24. *Am J Hum Genet* 68:254-60.
- Greinwald JH Jr, Wayne S, Chen AH, e col. (1998). Localization of a novel gene for nonsyndromic hearing loss (DFNB17) to chromosome region 7q31. *Am J Med Genet* 78: 107-13.
- Grundfast KM, Atwood, JL, Choung D (1999). Genetics and molecular biology of deafness. *Otolaryngol Clin North Am* 32: 6: 1067-1088.
- Guan MX, Fischel-Ghodsian N, Attardi G. A (2000). biochemical basis for the inherited susceptibility to aminoglycoside ototoxicity. *Hum Mol Genet.* 9(12): 1787-93.
- Guilford P, Ben Arab S, Blanchard S, Levilliers J, Weissenbach J, Belkahia A, Petit C (1994). A non-syndrome form of neurosensory, recessive deafness maps to the pericentromeric region of chromosome 13q. *Hum Mol Genet* 6: 24-8.
- Guillaumeau PJ, Massin P, Dubois_LaForque D, e col. (2001). Maternally inherited diabetes and deafness: a multicenter study. *Ann Intern Med* 134(9 Pt 1):721-8.
- Haan EA, Hull YJ, White S, e col (1989). Tricho-rhino-phalangeal and branchio-oto-renal syndrome in a family with an inherited rearrangement of chromosome 8q. *Am J Med Genet* 32:490-494.
- Hafner FM, Salam AA, Linder TE, Balmer D, Baumer A, Schinzel AA, Spillmann T, Leal FM (2000). A novel locus (DFNA24) for prelingual nonprogressive autosomal dominant nonsyndromic hearing loss maps to 4q35-qter in a large Swiss German kindred. *Am J Hum Genet* 66:1437-42
- Hao H, Bonilla E, Manfredi G, e col. (1995). Segregation patterns or a novel mutation in the mitochondrial tRNA glutamic acid gene associated with myopathy and diabetes mellitus. *Am J Hum Genet* 56(5):1017-25.
- Hassan MJ, Santos RL, Rafiq MA, e col. (2005). A novel autosomal recessive non-syndromic hearing impairment locus (DFNB47) maps to chromosome 2p25.1-p24.3. *Hum genet* 118:605-10.

- Heimler A, Lieber E (1986). Branchio-oto-renal syndrome: reduced penetrance and variable expressivity in four generations of a large kindred. *Am. J. Med. Genet* 25: 15-27.
- Hildebrand MS, de Silva MG, Gardner RJM, e col (2006). Cochlear implants for DFNA17 deafness. *Laryngoscope* 116: 2211-2215.
- Hoskins BE, Cramer CH II, Silvius D, Zou D, Raymond RM Jr, Orten DJ, Kimberling WJ, Smith RJH, Weil D, Petit C, Otto EA, Xu P-X, Hildebrandt F, (2007). Transcription factor SIX5 is mutated in patients with branchio-oto-renal syndrome. *Am. J. Hum. Genet.* 80: 800-804.
- Huebner AK, Grandia M, Frommolt P, e col. (2011). Nonsense mutations in *SMPX*, encoding a protein responsive to physical force, result in X-chromosomal hearing loss. *Am J Hum Genet* 88:621-627.
- HUGO Gene Nomenclature Committee (HGNC – 08/2003)**, Department of Biology, University College London, Wolfson House, 4 Stephenson Way, London NW1 2HE, UK (URL: <http://www.gene.ucl.ac.uk/nomenclature/>).
- Hutchin TP, Parker MJ, Young ID, e col. (2000). A novel mutation in the mitochondrial tRNA(Ser(UCN)) gene in a family with non-syndromic sensorineural hearing impairment. *J Med Genet* 37(9):692-4.
- Irshad S, Santos RL, Muhammad D, e col. (2005). Localization of a novel autosomal recessive non-syndromic hearing impairment locus DFNB55 to chromosome 4q12-q13.2. *Clin Genet* 68:262-7.
- Jain PK, Fukushima K, Deshamukh D, e col. (1995). A human recessive neurosensory nonsyndromic hearing impairment locus is potential homology of murine deafness (dn locus). *Hum Mol Genet* 4: 2391-4.
- Jain PK, Lalwani AK, Li XC e col. (1998). A gene for recessive nonsyndromic sensorineural deafness (DFNB18) maps to the chromosomal region 11p14-p15.1 containing the Usher syndrome type 1C gene. *Genomics* 50:290-2.
- Jaksch M, Klopstock T, Kurlemann G, e col. (1998a). Progressive myoclonus epilepsy and mitochondrial myopathy associated with mutations in the tRNA(Ser(UCN)) gene. *Ann Neurol* 44(4):635-40.
- Jaksch M, Hofmann S, Kleinle S, e col. (1998b). 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. *J Med Genet* 35(11):895-900.
- Jones KL e Smith (2007). **Padrões reconhecíveis de malformações congênitas.** Tradução Carlos André Oighesntein e col. Editora Elsevier, Rio de Janeiro, pág. 267.
- Junqueira LC e Carneiro J (1999). **Histologia Básica.** 9^a ed. Editora Guanabara Koogan S.A., Rio de Janeiro.
- Kalay E, Li Y, Uzumcu A, e col. (2006). Mutations in the lipoma HMGIC fusion partner-like 5 (LHFPL5) gene cause autosomal recessive nonsyndromic hearing loss. *Hum Mutat* 27: 633-9.
- Kameoka K, Isotani H, Tanaka K, e col. (1998). Novel mitochondrial DNA mutation in tRNA(lys) (8296A>G) associated with diabetes. *Biochem Biophys Res Commun* 245(2):523-7.

- Keats BJB e Berlin CI (1999). Genomes and Hearing Impairment. *Genome Res* 9: 7-16.
- Kelsell DP, Dunlop J, Stevens HP, Lench NJ, Liang JN, Parry G, Mueller RF, Leigh IM (1997). Connexin 26 mutations in hereditary non-syndromic sensorineural deafness. *Nature* 387(6628):80-3.
- Khan SY, Riazuddin S, Tariq M, e col. (2007). Autosomal recessive nonsyndromic deafness locus DFNB 63 at chromosome 11q13.2-q13.3. *Hum Genet* 120: 789-93.
- Kokotas H, Petersen MB, Willens PJ. (2007). Mitochondrial Deafness. *Clin Genet* 71(5):379-91.
- Konig R, Fuchs S, Dukiet C (1994). Branchio-oto-renal (BOR) syndrome: Variable expressivity in a five-generation pedigree. *Eur J Pediatr* 153:446-450.
- Kumar S, Kimberling WJ, Kenyon JB, Smith RJH, Marres EHMA, Cremers CWRJ (1992). Autosomal dominant branchio-oto-renal syndrome--localization of a disease gene to chromosome 8q by linkage in a Dutch family. *Hum. Molec. Genet.* 1: 491-495.
- Kunst H, Huybrechts C, Marres H, Huygen P, Van Camp G, Cremers C (2000a). The phenotype of DFNA13/COL11A2: nonsyndromic autosomal dominant mid-frequency and high-frequency sensorineural hearing impairment. *Am J Otol* 21:181-7.
- Kunst H, Marres H, Huygen P, Van Duijnhoven G, Kresova A, Van Der Velde S, Reis A, Cremers F, Cremers C (2000b). Non-syndromic autosomal dominant progressive non-specific mid-frequency sensorineural hearing impairment with childhood to late adolescence onset (DFNA21). *Clin Otolaryngol.* 25: 45-54.
- Kurima K, Szymko Y, Rudy S, Morell RJ, Friedman TB, Griffith AJ (2000). Genetic map localization of DFNA34 and DFNA36, two autosomal dominant nonsyndromic deafness loci. 50th Annual Meeting of The American Society of Human Genetics: Program Nr: 1654 (<http://www.faseb.org/genetics/ashg00/f1654.htm>).
- Kurima K, Peters LM, Yang Y, Riazuddin S, Ahmed ZM, Naz S, Arnaud D, Drury S, Mo J, Makishima T, Ghosh M, Menon PS, Deshmukh D, Oddoux C, Ostrer H, Khan S, Riazuddin S, Deininger PL, Hampton LL, Sullivan SL, Battey JF Jr, Keats BJ, Wilcox ER, Friedman TB, Griffith AJ (2002). Dominant and recessive deafness caused by mutations of a novel gene, TMC1, required for cochlear hair-cell function. *Nat Genet* 30: 277-84.
- Lalwani AK, Brister JR, Fex J, e col. (1994). A new nonsyndromic X-linked sensorineural hearing impairment linked to Xp21.2. *Am J Hum Genet* 55(4):685-94.
- Lalwani AK, Luxford WM, Mhatre AN, Attaie A, Wilcox ER, Castelein CM (1999). A new locus for nonsyndromic hereditary hearing impairment, DFNA17, maps to chromosome 22 and represents a gene for cochleosaccular degeneration. *Am J Hum Genet* 64:318-23.
- Lalwani AK, Goldstein JA, Kelley MJ, e col (2000). Human nonsyndromic hereditary deafness DFNA17 is due to a mutation in nonmuscle myosin MYH9. *Am J Hum Genet* 67(5):1121-8.
- Lathrop GM, Lalouel JM, Julier C, e col. (1985). Multilocus linkage analysis in humans. Detection of linkage and estimation of recombination. *AM J Hum Genet* 37:482-498.

- Lelli A, Asai Y, Forge A, e col (2009). Tonotopic gradient in the developmental acquisition of sensory transduction in outer hair cells of the mouse cochlea. *J Neurophysiol* 101(6):2961-73.
- Leon PE, Raventos H, Lynch E, Morrow J, King MC (1992). The gene for an inherited form of deafness maps to chromosome 5q31. *PNSA* 89:5181-5184.
- Lesperance MM, Hall JW 3rd, Bess FH, Fukushima K, Jain PK, Ploplis B, San Agustin TB, Skarka H, Smith RJ, Wills M, e col (1995). A gene for autosomal dominant nonsyndromic hereditary hearing impairment maps to 4p16.3. *Hum Mol Genet* 4:1967-72.
- Lezirovitz K, Nicastro FS, Pardon E, Abreu-Silva R S, Batissoco AC, Neustein I, Spinelli M, Mingroni-Netto RC (2006). Is autosomal recessive deafness associated with oculocutaneous albinism a coincidence syndrome? *Journal of Human Genetics*, v.51, p.716 – 720.
- Lezirovitz K, Pardon E, Auricchio MTBM, Silva FLCE, Lopes JJ, Abreu-Silva RS, Romanos J, Batissoco AC, Mingroni-Netto RC (2008a). Unexpected genetic heterogeneity in a large consanguineous Brazilian pedigree presenting deafness. *European Journal of Human Genetics*, v.16, p.89 - 96.
- Lezirovitz K, Maestrelli S, Cotrim NH, Otto PA, Pearson PL, Mingroni-Netto RC (2008b). A novel locus for split-hand/foot malformation associated with tibial hemimelia (SHFLD syndrome) maps to chromosome region 17p13.1–17p13.3. *Hum Genet* v.123: 625-631.
- Lezirovitz K, Braga MC, Thiele-Aguiar RS, Auricchio MT, Pearson PL, Otto PA, Mingroni-Netto RC (2009). A novel autosomal dominant deafness locus (DFNA58) maps to 2p12-p21. *Clin Genet*. Jan 20. [Epub ahead of print]
- Li XC, Everett LA, Lawani AK, e col. (1998). A mutation in PDS causes nonsyndromic recessive deafness. *Nat Genet* 18(3): 251-7.
- Li XC, Saal HM, Friedman TB, Friedman R A (2000). A New Gene For Autosomal Dominant Nonsyndromic Sensorineural Hearing Loss (DFNA32) Maps to 11p15. 50th Annual Meeting of The American Society of Human Genetics: Program Nr: 1727 (<http://www.faseb.org/genetics/ashg00/f1727.htm>).
- Lin CS, Shen W, Cehn ZP, e col (1994). Identification of I-Plastin, a Human Fimbrin Isoform Expressed in Intestine and Kidney. *Molecular and cellular biology* Apr. 2457-2467.
- Liu X, Han D, Li J, e col. (2010). Loss-of-function mutations in the PRPS1 gene cause a type of nonsyndromic X-linked sensorineural deafness, DFN2. *Am J Hum Genet* 86(1):65-71.
- Liu XZ, Walsh J, Mburu P, e col. (1997). Mutations in the myosin VIIA gene cause non-syndromic recessive deafness. *Nat Genet* 16:188-90.
- Liu XZ, Ouyang XM, Xia XJ, e col. (2003). Prestin. A cochlear motor protein, is defective in non-syndromic hearing loss. *Hum Mol Genet* 12(10):1155-62.
- Liu Z, Liao L, Zhou S, Xu J (2008). Generation and Validation of a Mouse Line with a Floxed *SRC-3/AIB1* Allele for Conditional Knockout. *Int J Biol Sci* 4(4):202-207.
- Luckey JA, Drossman H, Kostichka AJ (1990). High speed DNA sequencing by capillary electrophoresis. *Nucleic Acids Res* 11;18(15):4417-21.

- Louet JF, Coste A, Amazit L, e col (2006). Oncogenic steroid receptor coactivator-3 is a key regulator of the white adipogenic program. *Pro Nat Acad Sci* 103: 17868-17873.
- Mangino M, Flex E, Capon F, Sangiuolo F, Carraro E, Gualandi F, Mazzoli M, Martini A, Novelli G, Dallapiccola B (2001). Mapping of a new autosomal dominant nonsyndromic hearing loss locus (DFNA30) to chromosome 15q25-26. *Eur J Hum Genet* 9:667-71.
- Manolis EN, Yandavi N, Nadol JB Jr, Eavey RD, McKenna M, Rosenbaum S, Khetarpal U, Halpin C, Merchant SN, Duyk GM, MacRae C, Seidman CE, Seidman JG (1996). A gene for non-syndromic autosomal dominant progressive postlingual sensorineural hearing loss maps to chromosome 14q12-13. *Hum Mol Genet* 5:1047-50.
- Marres HAM, Cremers CWRJ (1991). Congenital conductive or mixed deafness, preauricular sinus, external ear anomaly, and commissural lips pits: an autosomal dominant inherited syndrome. *Ann. Otol. Rhinol. Laryng*: 100: 928-932.
- Mausmoudi S, Tlili A, Majava M, e col. (2003). Mapping of a new autosomal recessive nonsyndromic hearing loss locus (DFNB32) to chromosome 1p13.3-22.1 *Eur J Hum Genet* 11: 185-8.
- Mburu P, Mustapha M, Varela A, e col. (2003). Defects in whirlin, a PDZ domain molecule involved in stereocilia elongation, cause deafness in the whirler mouse and families with DFNB31. *Nat Genet* 34:421-428.
- Medlej-Hashinm M, Mustapha M, Chouery E, e col. (2002). Non-syndromic recessive deafness in Jordan: mapping of a new locus to chromosome 9q34.3 and prevalence of DFNB1 mutations. *Eur J Hum genet* 10: 391-4.
- Melchionda S, Ahituv N, Bisceglia L, Sobe T, Glaser F, Rabionet R, Arbones ML, Notarangelo A, Di Iorio E, Carella M, Zelante L, Estivill X, Avraham KB, Gasparini P (2001). MYO6, the human homologue of the gene responsible for deafness in Snell's waltzer mice, is mutated in autosomal dominant nonsyndromic hearing loss. *Am J Hum Genet* 69(3):635-40.
- MGI, Mouse Genomic Informatics.** (<http://www.informatics.jax.org/>)
- Mir A, Ansar M, Chahour MH e col. (2005). Mapping of a novel autosomal recessive nonsyndromic deafness locus (DFNB46) to chromosome 18p11.32-p11.31. *Am J Med Genet* 133: 23-6.
- Modamio-Hoybjor S, Moreno-Pelayo MA, Mencia A, del Castillo I, Chardenoux S, Armenta D, Lathrop M, Petit C, Moreno F (2003). A novel locus for autosomal dominant nonsyndromic hearing loss (DFNA44) maps to chromosome 3q28-29. *Hum Genet*.112:24-8.
- Modamio-Hoybjor S, Moreno-Pelayo MA, Mencia A, del Castillo I, Chardenoux S, Morais D, Lathrop M, Petit C, Moreno F (2004). A novel locus for autosomal dominant nonsyndromic hearing loss, DFNA50, maps to chromosome 7q32 between the DFNB17 and DFNB13 deafness loci. *J Med Genet* 41:e14.

- Montagna P, Gallassi R, Medori R, e col. (1988). MELAS syndrome: characteristic migrainous and epileptic features and maternal transmission. *Neurology* 38(5):751-4.
- Moorthie S, Mattocks CJ, Wright CF (2011). Review of massively parallel DNA sequencing technologies. *Hugo* 5(1-4): 1-12.
- Moraes CT, DiMauro S, Zeviani M, e col. (1989). Mitochondrial DNA deletions in progressive external ophthalmoplegia and Kearns-Sayre syndrome. *N Engl J Med* 320(20):1293-9.
- Morell RJ, Friderici KH, Wei S, Elfenbein JL, Friedman TB, Fisher RA (2000). A new locus for late-onset, progressive, hereditary hearing loss DFNA20 maps to 17q25. *Genomics* 63:1-6.
- Moreno-Pelayo MA, Modamio-Høybjør S, Mencía A, del Castillo I, Chardenoux S, Fernández-Burriel M, Lathrop M, Petit C, Moreno F (2004). DFNA49, a novel locus for autosomal dominant non-syndromic hearing loss, maps proximal to DFNA7/DFNM1 region on chromosome 1q21-q23. *J Med Genet* 40:832-6.
- Moynihan L, Houseman M, Newton V, e col. (1999). DFNB20: a novel locus for autosomal recessive, non-syndromic sensorineural hearing loss maps to chromosome 11q25-qter. *Eur J Hum Genet* 7:243-6.
- Mustapha M, Chardenoux S, Neider A e col. (1998a). A sensorineural progressive autosomal recessive form of isolated deafness, DFNB13, maps to chromosome 7q34-q36. *Eur J Hum Genet* 6: 245-50.
- Mustapha M, Salem N, Weil D, e col. (1998b). Identification of a locus on chromosome 7q31, DFNB14, responsible for prelingual sensorineural non-syndromic deafness. *Eur J Hum Genet* 6:548-51.
- Mustapha M, Weil D, Chardenoux S e col. (1999). An alpha-tectorin gene defect causes a newly identified autosomal recessive form of sensorineural hearing loss, maps to chromosome 9q32-43. *Eur J Hum Genet* 10:210-2.
- Mustapha M, Chouery E, Chardenoux S, e col. (2002). DFNB31, a recessive form of sensorineural hearing loss, maps to chromosome 9q32-34. *Eur J Hum Genet* 10:210-2.
- Naz S, Giguere CM, Kohrman DC, e col. (2002). Mutations in a novel gene, TMIE, are associated with hearing loss linkage to DFNB6 locus. *Am J Hum Genet* 71: 632-6.
- Naz S, Griffith Aj, Riazuddin S e col. (2004). Mutations of ESPN cause autosomal recessive deafness and vestibular dysfunction. *J Med Genet* 41: 591-5.
- Ni L, Wagner MJ, Kimberling WJ, e col (1994). Refined localization of the branchiootorenal syndrome gene by linkage and haplotype analysis. *Am J Med Genet* 51: 176-184.
- O'Neill ME, Marietta J, Nishimura D, Wayne S, Van Camp G, Van Laer L, Negrini C, Wilcox ER, Chen A, Fukushima K, Ni L, Sheffield VC, Smith RJ (1996). A gene for autosomal dominant late-onset progressive non-syndromic hearing loss, DFNA10, maps to chromosome 6. *Hum Mol Genet* 5:853-6.
- Ouyang XM, Xia XJ, Verpy E, e col. (2002). Mutations in the alternatively spliced exons of USH1C cause non-syndromic recessive deafness. *Hum Genet* 111: 26-30.
- Parving (1996) A. Epidemiology of genetic hearing impairment. In: Martini A, Read A, Stephens D. *Genetics and Hearing Impairment: 73-81.*

- Pavlakakis SG, Phillips PC, DiMauro S, e col. (1984). Mitochondrial myopathy, encephalopathy, lactic acidosis, and strokelike episodes: a distinctive clinical syndrome. *Ann Neurol* 16(4):481-8.
- Peters LM, Anderson DW, Griffith AJ, Grundfast KM, San Agustin TB, Madeo AC, F4iedman TB, Morell RJ (2002). Mutation of a transcription factor, TFCP2L3, causes progressive autosomal dominant hearing loss, DFNA28. *Hum Mol Genet* 11:2877-2885.
- Pettersson E, Lundeberg J, Ahmadian A (2009). Generations of sequencing technologies. *Genomics* 93:105–111.
- Piatto VB e Maniglia JV (2001). Importância do gene Conexina 26 na etiologia da deficiência sensorineural não-sindrômica. *Acta Awho* 20: 106-112.
- PosMed, Positional Medline.** (<http://biolod.org/PosMed/>)
- Prezant TR, Agapian JV, Bohlman MC, e col. (1993). Mitochondrial ribosomal RNA mutation associated with both antibiotic-induced and non-syndromic deafness. *Nat genet* 4:289-294.
- Pujol R, Réclar-Enjalbert V e Pujol T (2002). **Promenade round the cochlea.** (<http://www.iurc.montp.inserm.fr/cric/audition/english/index.htm>).
- Pulley LJ, Jackson AP, Roberts E e col. (2000). A new locus for autosomal recessive non-syndromal sensorineural hearing impairment (DFNB27) on chromosome 2q23-q31. *Eur J Hum Genet* 8: 991-3.
- Ramzan K, Shaikh RS, Ahmad J, e col. (2004). A new locus for nonsyndromic deafness DFNB49 maps to chromosome 5q12.3-14.1. *Hum Genet* 116(1-2):17-22.
- Reardon W, Ross RJ, Sweeney MG, e col. (1992). Diabetes mellitus associated with a pathogenic point mutation in mitochondrial DNA. *Lancet* 340(8832)1376-9.
- Rehman AU, Morell RJ, Belyantseva IA, e col. (2010). Targeted capture and next-generation sequencing identifies C9orf75, encoding taperin, as the mutated gene in nonsyndromic deafness DFNB79. *Am J Hum Genet* 86(3):378-88.
- Rehman AU, Gui K, Morell RJ, e col. (2011). Mutations of GIPC3 cause nonsyndromic hearing loss DFNB72 but not DFNB81 that also maps to chromosome 19p. *Hum Genet* 130(6):759-65.
- Reid FM, Vernham GA, Jacobs HT (1994). A novel mitochondrial point mutation in a maternal pedigree with sensorineural deafness. *Hum Mutat* 3(3):243-7.
- Riazuddin A, Castelein CM, Ahmed ZM e col. (2000). Dominant modifier DFNM1 suppresses recessive deafness DFNB26. *Nat Genet* 26: 431-4.
- Riazuddin S, Khan SN, Ahmed ZM, e col. (2006a). Mutations in TRIOBP, xich encodes a putative cytoskeletal-organizing protein, are associated with nonsyndromic recessive deafness. *Am J Hum Genet* 78(1):137-43.
- Riazuddin S, Ahmed ZM, Fanning AS, e col. (2006b). Tricellulin is a tight-junction protein necessary for hearing. *Am J Hum Genet* 79:1040-51.
- Riazuddin S, Anwar S, Fischer M, e col. (2009). Molecular basis of DFNB73: mutations of BSND can cause nonsyndromic deafness os Bartter syndrome. *Am J Hum Genet* 85(2):273-80.
- Robertson NG, Lu L, Heller S, e col (1998). Mutations in a novel cochlear gene cause DFNA9, a human nonsyndromic deafness with vestibular dysfunction. *Nature Genet* 20:299-303.

- Rogatko A, Pereira CAB e Frota-Pessoa O (1986). A Baesian Method for Estimation of Penetrance: Application to Mandibulofacial and Frontonasal Dysostoses. *Am. J. Hum. Genet.* 24: 231-246.
- Ruf RG, Berkman J, Wolf MTF, Nurnberg P, Gattas M, Ruf E-M, Hyland V, Kromberg J, Glass I, Macmillan J, Otto E, Nurnberg G, Lucke B, Hennies HC, Hildebrandt F (2003). A gene locus for branchio-otic syndrome maps to chromosome 14q21.3-q24.3. *J. Med. Genet.* 40: 515-519.
- Salam AA, Hafner FM, Linder TE, Spillmann T, Schinzel AA, Leal SM (2000). A novel locus (DFNA23) for prelingual autosomal dominant nonsyndromic hearing loss maps to 14q21-q22 in a Swiss German kindred. *Am J Hum Genet* 66:1984-8.
- Sanger F, Nicklen S, Coulson AR (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74(12):5463-67.
- Santos RL, Hassan MJ, Sikandar S, e col. (2006). DFNB68, a novel autosomal recessive non-syndromic hearing impairment locus at chromosomal region 19p13.2. *Hum Genet* 120(1):85-92.
- Santos-Cortez RLP, Lee K, Azeem Z, e col (2013). Mutations in *KARS*, Encoding Lysyl-tRNA Synthetase, Cause Autosomal-Recessive Nonsyndromic Hearing Impairment DFNB89. *Am J Hum Genet* 1:132-140.
- Sartorato EL, Gottardi E, de Oliveira CA, Magna LA, Annichino-Bizzacchi JM, Seixas CA, Maciel-Guerra AT (2000). Determination of the frequency of the 35delG allele in Brazilian neonates. *Clin Genet* 58: 339-40.
- Schraders M, Lee K, Oostrik J, e col. (2010b). Homozygosity mapping reveals mutations of *GRXCR1* as a cause of autosomal-recessive nonsyndromic hearing impairment. *Am J Hum Genet* 86(2):138-47.
- Schraders M, Oostrik, Huygen PL, e col. (2010c). Mutations in *PTPRQ* are cause of autosomal-recessive nonsyndromic hearing impairment DFNB84 and associated with vestibular dysfunction. *Am J Hum Genet* 86(4):604-10.
- Schraders M, Haas SA, Weegerink NJ, e col. (2011). Next-generation sequencing identifies mutations of *SMPX*, which encodes the small muscle protein. X-linked, as a cause of progressive hearing impairment. *Am J Hum Genet* 88:628-634.
- Schuelke M, Bakker M, Stoltenburg G, e col (1998). Epilepsia partialis continua associated with a homoplasmic mitochondrial tRNA(Ser(UCN)) mutation. *Ann Neurol* 44(4):700-4.
- Schultz JM, Khan SN, Ahmed ZM, e col. (2009). Noncoding mutations of HGF are associated with nonsyndromic hearing loss, DFNB39. *Am J Hum Genet* 85(1):25-39.
- Scott DA, Carmi R, Elbedour K, e col. (1996). A novel autosomal recessive non-syndromic-hearing-loss locus identified by DNA pooling using two inbred Bedouin Kindreds. *Am J Hum Genet* 59: 385-91.
- Scott RN, Kudoh J, Watterhofer M e col. (2001). Insertion of beta-satellite repeats identifies a transmembrane protease causing both congenital and childhood onset autosomal recessive deafness. *Nat Genet* 27: 59-63.
- Seviour KB, Hatamochi A, Stewart IA, e col. (1998). Mitochondrial A7445G mutation in two pedigrees with palmoplantar keratoderma and deafness. *Am J Med Genet* 75(2):179-85.

- Shabbir MI, Ahmed ZM, Khan SY, et al. (2006). Mutations of human TMHS cause recessively inherited non-syndromic hearing loss. *J Med Genet* 43:634-40.
- Shahin H, Walsh T, Sobe T, et al. (2006). Mutations in a novel isoform of TRIOBP that encodes a filamentous-actin binding protein are responsible for DFNB28 recessive nonsyndromic hearing loss. *Am J Hum Genet* 78(1):144-52.
- Shahin MI, Walsh T, Rayyan AA, et al. (2010). Five novel loci for inherited hearing loss mapped by SNP-based homozygosity profiles in Palestinian families. *Eur J Hum Genet* 18(4):407-13.
- Shaikh RS, Ramzan K, Nazli S et al. (2005). A new locus for nonsyndromic deafness DFNB51 maps to chromosome 11p13-p12. *Am J Med Genet A* 138: 392-5.
- Shearer AE, Hildebrand MS, Sloan CM, et al (2011). Deafness in the genomics era. *Hear Res* 282(1-2):1-9.
- Shekhar CP, Smoczynski R, tretim A (2011). Sequencing technologies and genome sequencing. *J Appl Genet* 52(4): 413–435.
- Shimasaki N, Watanabe K, Hara M, et al (2004). EYA1 Mutation in a Newborn Female Presenting with Cardiofacial Syndrome. *Pediatr Cardiol* 25:411–413.
- Shoffner JM, Lott MT, Lezza AM, et al. (1990). Myoclonic epilepsy and ragged-red fiber disease (MERRF) is associated with a mitochondrial DNA tRNA(Lys) mutation. *Cell* 61(6):931-7.
- Silman S, Silverman CA. **Auditory diagnosis, principles and applications**. London: Singular Publishing Group: 1991. P.215-32.
- Smith LM, Sanders JZ, Kaise RJ (1986). Fluorescence detection in automated DNA sequence analysis. *Nature* 321(6071):674-9.
- Smith RJH, Coppage KB, Ankerstjerne JKB, et al (1992). Localization of the gene for branchiootorenal syndrome to chromosome 8q. *Genomics* 14: 841-844.
- Smith RJH, Shearer AE, Hildebrand MS e Van Camp G (2012). **Deafness and Hereditary Hearing Loss Overview**. Bookshelf ID: NBK1434 PMID: 20301607.
- Son EJ, Wu L, Yoon H, et al. (2012). Developmental Gene Expression Profiling along the Tonotopic Axis of the Mouse Cochlea. *PLoS ONE* 7(7): e40735. doi:10.1371/journal.pone.0040735.
- Spruijt L, Hoefsloot LH, van Schaijk GHWH, et al (2006). Identification of a Novel EYA1 Mutation Presenting in a Newborn With Laryngomalacia, Glossoptosis, Retrognathia, and Pectus Excavatum. *Am J Med Genet* 140A:1343–1345.
- Stockley TL, Mendonza-Londono R, Porpst EJ, et al. (2009). A Recurrent E YA1 Mutation Causing Alternative RNA Splicing in Branchio-Oto-Renal Syndrome: Implications for Molecular Diagnostics and Disease Mechanism. *Am J Med Genet* 149A:322–327.
- Stratakis CA, Lin J-P, Rennert OM (1998). Description of a large kindred with autosomal dominant inheritance of branchial arch anomalies, hearing loss and ear pits, and exclusion of the branchio-oto-renal (BOR) syndrome gene locus (chromosome 8q13.3). *Am J Med Genet* 79:209–214.
- Sue CM, Tanji K, Hadjigeorgiou G, et al. (1999). Maternally inherited hearing loss in a large kindred with a novel T7511C mutation in the mitochondrial DNA tRNA(Ser(UCN)) gene. *Neurology* 52(9):1905-8.

- Sugimoto Y, Narumiya S (2007). Prostaglandin E Receptors. *The Journal Of Biological Chemistry* 282(16):11613–11617.
- Sundstrom RA, Van Laer L, Van Camp G, Smith RJH (1999). Autosomal Recessive Nonsyndromic Hearing Loss. *Am J Med Genet (Semin. Med. Genet.)* 89: 123-129.
- Tabatabaiefar MA, Alasti F, Shariatu L, e col. (2011). DFNB93, a novel locus for autosomal recessive moderate-to-severe hearing impairment. *Cin Genet* 79(6): 594-8.
- Talebizadeh Z, Kenyon JB, Askew JW, Smith SD (2000). A new locus for dominant progressive hearing loss DFNA37 mapped to chromosome 1p21. 50th Annual Meeting of The American Society of Human Genetics: Program Nr: 1740 (<http://www.faseb.org/genetics/ashg00/f1740.htm>).
- Tamagawa Y, Kitamura K, Ishida T, Ishikawa K, Tanaka H, Tsuji S, Nishizawa M (1996). A gene for a dominant form of non-syndromic sensorineural deafness (DFNA11) maps within the region containing the DFNB2 recessive deafness gene. *Hum Mol Genet* 5:849-52.
- Tariq A, Santos RI, Khan MN e col. (2006). Localization of a novel autosomal recessive nonsyndromic hearing impairment locus DFNB65 to chromosome 20q13.2-13.32. *J Mol Med* 84: 484-90.
- Tiranti V, Chariot P, Carella F, e col (1995). Maternally inherited hearing loss, ataxia and myoclonus associated with a novel point mutation in mitochondrial tRNA^{Ser}(UCN) gene. *Hum Mol Genet* 4(8):1421-7.
- Tlili A, Mannikko M, Charfedine I e col. (2005). A novel autosomal recessive non-syndromic deafness locus, DFNB66, maps to chromosome 6p21.2-22.3 in a large Tunisian consanguineous family. *Hum Hered* 60: 123-8.
- Tomek MS, Brown MR, Mani SR, Ramesh A, Srisailapathy CRS, Coucke P, Zbar RIS, Bell AM, McGuirt WT, Fukushima, Willems PJ, Van Camp, Smith RJH (1998). Localization of a gene for otosclerosis to chromosome 15q25–q26. *Hum Mol Genet* 7: 285-90.
- Usami S, Abe S, Kasai M, e col. (1997). Genetic and clinical features of sensorineural hearing loss associated with the 1555 mitochondrial mutation. *Laryngoscope* 107(4):483-90.
- Vahava O, Morell R, Lynch ED, Weiss S, Kagan ME, Ahituv N, Morrow JE, Lee MK, Skvorak AB, Morton CC, Blumenfeld A, Frydman M, Friedman TB, King MC, Avraham KB (1998). Mutation in transcription factor POU4F3 associated with inherited progressive hearing loss in humans. *Science* 279(5358):1870-1.
- Van Den Bogaert K, De Leenheer E M R, Chen W, e col. (2004). A fifth locus for otosclerosis, OTSC5, maps to chromosome 3q22–24. *J Med genet* 41:450-53.
- Van den Ouweland JM, Lemkes HH, Ruitenbeek W, e col. (1992). Mutation in mitochondrial tRNA(Leu)(UUR) gene in a large pedigree with maternally transmitted type II diabetes mellitus and deafness. *Nat Geent* 1(5):368-71.
- Van Camp G, Coucke P, Balemans W, van Velzen D, van de Bilt C, van Laer L, Smith RJ, Fukushima K, Padberg GW, Frants RR, Van de Heyning P, Smith SD, Huizing EH, Willems PJ (1995). Localization of a gene for non-syndromic hearing loss (DFNA5) to chromosome 7p15. *Hum Mol Genet* 4:2159-63.

- Van Camp G, Coucke P, Willems PJ (1996). Autosomal dominant nonsyndromal hearing loss. In: Martini A, Read A, Stephens D. *Genetics and Hearing Impairment*. London: 213-220.
- Van Camp G, Willems P J, Smith R J H (1997). Nonsyndromic Hearing Loss-Unparalleled Heterogeneity. *Am J Hum Genet* 60:758-764.
- Van Camp G, Smith RJH (03/2012). **Hereditary Hearing Loss Homepage**. URL: <http://webhost.ua.ac.be/hhh/>
- Van Laer L, McGuirt WT, Yang T, e col. (1999). Autosomal nonsyndromic hearing impairment. *Am J Hum Genet* 89(3):167-74. Review.
- Verhoeven K, Van Camp G, Govaerts PJ, Balemans W, Schatteman I, Verstreken M, Van Laer L, Smith RJ, Brown MR, Van de Heyning PH, Somers T, Offeciers FE, Willems PJ (1997). A gene for autosomal dominant nonsyndromic hearing loss (DFNA12) maps to chromosome 11q22-24. *Am J Hum Genet* 60:1168-73.
- Verhoeven K, Ensink RJ, Tiranti V, e col (1999). Hearing impairment and neurological dysfunction associated with a mutation in the mitochondrial tRNASer(UCN) gene. *Eur J Hum Genet* 7(1):45-51.
- Verpy E, masmoudi S, Zwaenepoel I, e col. (2001). Mutations in a new gene encoding a protein of the hair bundle cause non-syndromic deafness at the DFNB16 locus. *Nat Genet* 29:345-9.
- Veske A, Oehlmann R, Younus F e col. (1996). Autosomal recessive non-syndromic deafness locus (DFNB8) maps on chromosome 21q22 in a large consanguineous kindred from Pakistan. *Hum Mol Genet* 5: 164-8.
- Vissers LE, de Vries BB, Osoegawa K, e col. (2003) Array-based comparative genomic hybridization for the genome-wide detection of submicroscopic chromosomal abnormalities. *Am J Hum Genet* 73:1261-1270.
- Walenkamp MJE, Karperien M, Pereira AM, e col (2005). Homozygous and Heterozygous Expression of a Novel Insulin-Like Growth Factor-I Mutation. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 90(5):2855–2864.
- Walsh TD, Shahin H, Morrow J, e col. (2000). DFNB28, a novel locus for prelingual nonsyndromic autosomal recessive hearing loss maps to 22q13 in a large consanguineous Palestinian Kindred. 50th Annual Meeting of The American Society of Human Genetics Program Nr: 2059. (<http://www.faseb.org/genetics/ashgoo/f2059.htm>).
- Walsh T, Walsh V, Vreugde S, e col. (2002). From flies' eyes to our ears: Mutations in a human class III myosin cause progressive nonsyndromic hearing loss DFNB30. *PNAS* 99:7518-7523.
- Walsh T, Shahin H, Elkan-Miller T, e col. (2010). Whole exome sequencing and homozygosity mapping identify mutation in the cell polarity protein GPM2 as the cause of nonsyndromic hearing loss DFNB82. *Am J Hum Genet* 87(1):90-4.
- Wang Y, Treat K, Schroer RJ, e col (1994). Localization of branchio-oto-renal (BOR) syndrome to a 3 Mb region of chromosome 8q. *Am. J. Med. Genet.* 51: 169-175.
- Wang QJ, A, Liang Y, Fridell RA, Probst FJ, Wilcox ER, e col. (1998). Association of unconventional myosin MYO15 mutations with human nonsyndromic deafness DFNB3. *Science* 280:1447-1451.

- Wang QJ, Lu CY, Li N, Rao SQ, Shi YB, Han DY, Li X, Cao JY, Yu LM, Li QZ, Guan MX, Yang WY and Shen Y (2004). Y-linked inheritance of non-syndromic hearing impairment in a large Chinese family. *J Med Genet* 41:e80.
- Wang QJ, Li QZ, Rao SQ, e col. (2006). AUNX1, a novel locus responsible for X linked recessive auditory and peripheral neuropathy, maps to Xq23-27.3. *J Med Genet* 43(7):e33.
- Wang Z, Rose DW, Hermanson O, e col (2000). Regulation of somatic growth by the p160 coactivator pyCIP. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 10.1073/pnas.260463097.
- Wang SH, Wu CC, Lu YC, e col (2012). Mutation Screening of the EYA1, SIX1, and SIX5 Genes in an East Asian Cohort With Branchio-Oto-Renal Syndrome. *Laryngoscope*, 122:1130–1136.
- Warchol ME, Speck JD (2007) Expression of GATA3 and tenascin in the avian vestibular maculae: normative patterns and changes during sensory regeneration. *J Comp Neurol* 500: 646–657.
- Waryah AM, Rehman A, Ahmed ZM, e col. (2009). DFNB74, a novel autosomal recessive nonsyndromic hearing impairment locus on chromosome 12q14.2-q15. *Clin Genet* 76(3):270-5.
- Weil D, Kussel P, Blanchard S e col. (1997). The autosomal recessive isolated deafness, DFNB2, and the Usher 1B syndrome are allelic defects of the myosin-VIIA gene. *Nat Genet* 16: 191-3.
- Welch HCE, Coadwell WJ, Ellson CD, e col (2002). P-Rex1, a PtdIns(3,4,5)P3- and G-beta-gamma-regulated guanine-nucleotide exchange factor for Rac. *Cell* 108: 809-821.
- Wilcox SA, Osborn AH, Allen-Powell DR, Maw MA, Dahl H-H M, Gadner RJM (1999). Connexin 26 deafness in several interconnected families. *J Med Genet* 36: 383-385.
- Wilcox ER, Burton QL, Naz S, e col. (2001). Mutations in the gene encoding tight junction claudin-14 cause autosomal recessive deafness DFNB29. *Cell* 104:165-72.
- Willems PJ (2000). Mechanism of Disease: Genetic Causes of Hearing Loss. *N Engl J Med* 342: 1101-1109.
- Wilson CA, Tsuchida MA, Allen GM, e col (2010). Myosin II contributes to cell-scale actin network treadmill through network disassembly. *Nature* 465:373-377.
- Woods KA, Camacho-Hubner C, Savage MO, Clark AJL (1996). Intrauterine growth retardation and postnatal growth failure associated with deletion of the insulin-like growth factor I gene. *New Eng J Med* 335: 1363-1367.

World Health Organization. URL
(<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs300/en/index.html>).

Xiao S, Yu C, Chou X, Yuan W, Wang Y, Bu L, Fu G, Qian M, Yang J, Shi Y, Hu L, Han B, Wang Z, Huang W, Liu J, Chen Z, Zhao G, Kong X (2001). Dentinogenesis imperfecta 1 with or without progressive hearing loss is associated with distinct mutations in DSPP. *Nat Genet* 27:201-4.

- Xu J, Liao L, Ning G, et al (2000). The steroid receptor coactivator SRC-3 (p/CIP/RAC3/AIB1/ACTR/TRAM-1) is required for normal growth, puberty, female reproductive function, and mammary gland development. *Proc Natl Acad Sci USA* (12):6379-84.
- Yan D, Ke X, Blanton SH, et al (2006). A novel locus for autosomal dominant non-syndromic deafness, DFNA53, maps to chromosome 14q11.2-q12. *J Med Genet* 43:170–174.
- Yang T e Smith R (2000). A novel locus DFNA26 maps to chromosome 17q25 in two unrelated families with progressive autosomal dominant hearing loss. 50th Annual Meeting of The American Society of Human Genetics: Program Nr: 1655 (<http://www.faseb.org/genetics/ashg00/f1655.htm>)
- Yariz KO, Duman D, Seco CZ, et al. (2012). Mutations in OTOGL, encoding the inner ear protein otogelin-like, cause moderate sensorineural hearing loss. *Am J Hum Genet* 91(5):872-82.
- Yasunaga S, Grati M, Cohen-Salmon M, et al. (1999). A mutation in OTOF, encoding OTOFerlin, a FER-1-like protein, causes DFNB9, a nonsyndromic form of deafness. *Nat Genet* 21: 363-9.
- Young TL, Ives E, Lynch E, et al (2001). Non-syndromic progressive hearing loss DFNA38 is caused by heterozygous missense mutation in the Wolfram syndrome gene WFS1. *Hum Mol Genet* 10(22):2509-14.
- Zeviani M, Muntoni F, Savarese N, et al. (1993). A MERRF/MELAS overlap syndrome associated with a new point mutation in the mitochondrial DNA tRNA(Lys) gene. *Eur J Hum Genet* 1(1):80-7.
- Zhao H, Li R, Wang Q, et al. (2004). 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. *Am J Hum Genet* 74(1):139-52.
- Zhao Y, Zhao F, Zong L, et al. (2013). Exome Sequencing and Linkage Analysis Identified Tenascin-C (TNC) as a Novel Causative Gene in Nonsyndromic Hearing Loss. *PLoS ONE* 8(7): e69549. doi:10.1371/journal.pone.0069549.
- Zheng J, Miller KK, Yang T, et al. (2011): Carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 16 interacts with α -tectorin and is mutated in autosomal dominant hearing loss (DFNA4). *Proc Natl Acad Sci USA* 108:4218-4223.
- Zwaenepoel I, Mustapha M, Leibovici M et al. (2002). 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. *PNAS* 99: 6240-5.

Apêndice

Apêndice 1. Termo de consentimento livre e esclarecido para maiores de 18 anos.

Universidade de São Paulo

Instituto de Biociências

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

(maiores de 18 anos)

ESTUDO: *Mapeamento de novos genes e identificação de mutações na surdez não-sindrômica.*

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

Eu, (inserir o nome, profissão, residente e domiciliado na), portador da Cédula de identidade, RG , e inscrito no CPF/MF..... nascido(a) em ____ / ____ / ____ , abaixo assinado(a), concordo de livre e espontânea vontade em participar do estudo "***Mapeamento de novos genes e identificação de mutações na surdez não-sindrômica.***" , e esclareço que obtive todas as informações.

Estou ciente que:

- I) O estudo se faz necessário para que se possam descobrir as possíveis causas de algumas doenças hereditárias como a “*surdez não-sindrômica*” que é um defeito do sistema auditivo.
- II) Será feita a coleta de 10 ml. de sangue.
- III) Essa coleta será feita apenas para este estudo e em nada influenciará o meu tratamento; não vai me curar; não vai me causar nenhum problema, exceto o pequeno incômodo de dor no momento da coleta (introdução da agulha para retirada do sangue).
- IV) Tenho a liberdade de desistir ou de interromper a colaboração neste estudo no momento em que desejar, sem necessidade de qualquer explicação;
- V) A desistência não causará nenhum prejuízo à minha saúde ou bem estar físico. Não virá interferir no atendimento ou tratamento médico;
- VI) Os resultados obtidos durante este ensaio serão mantidos em sigilo, mas concordo que sejam divulgados em publicações científicas, desde que meus dados pessoais não sejam mencionados;
- VII) Caso eu desejar, poderei tomar conhecimento dos resultados, ao final desta pesquisa
 - () Desejo conhecer os resultados desta pesquisa.
 - () Não desejo conhecer os resultados desta pesquisa.
- VIII) Caso tenham sido tiradas fotografias,
 - () concordo que sejam incluídas em publicações científicas, se necessário
 - () concordo que sejam apresentadas em aulas para profissionais da saúde
 - () não concordo que sejam incluídas em nenhum tipo de publicação ou apresentação.
- IX) O material colhido será armazenado por um tempo considerado necessário para a identificação e caracterização do gene e de sua mutação e/ou mecanismo genético responsável pela doença observada na sua família.

São Paulo, de de 2009

Participante:

Pesquisador Responsável pelo Projeto: _____

Vítor de Góes Lima Dantas

Biólogo

Telefone para contato: (11) 3091-7478

Pesquisador e instituição responsáveis pelas amostras de DNA:

Dra. Regina Célia Mingroni Netto

CRBio/SP 10.238-01

Depto de Genética e Biologia Evolutiva

Instituto de Biociências – USP

Apêndice 2. Termo de consentimento livre e esclarecido para menores de 18 anos.

Universidade de São Paulo

Instituto de Biociências

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

(menores de 18 anos)

ESTUDO: Mapeamento de novos genes e identificação de mutações na surdez não-sindrômica.

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

Eu , RG ,
abaixo assinado(a), concordo de livre e espontânea vontade que meu (minha) filho(a)
..... nascido(a) em ____ / ____ / ____ , participe
do estudo "***Mapeamento de novos genes e identificação de mutações na surdez não-sindrômica.***", e esclareço que obtive todas informações necessárias.

Estou ciente que:

- IX) O estudo se faz necessário para que se possam descobrir as possíveis causas de algumas doenças hereditárias como a “*surdez não-sindrômica*” que é um defeito do sistema auditivo.
- X) Será feita a coleta de 10 ml. de sangue.
- XI) Essa coleta será feita apenas para este estudo e em nada influenciará no tratamento de meu (minha) filho(a); não vai curá-lo (a); não causará nenhum problema, exceto a dor da picadinha da agulha no local da coleta;
- XII) Tenho a liberdade de desistir ou interromper a colaboração neste estudo no momento em que desejar, sem necessidade de qualquer explicação;
- XIII) A desistência não causará nenhum prejuízo a mim, nem ao(a) meu (minha) filho(a), e sem que venha interferir no atendimento ou tratamento médico;
- XIV) Os resultados obtidos durante este ensaio serão mantidos em sigilo, mas concordo que sejam divulgados em publicações científicas, desde que nem o meu nome nem o de meu filho sejam mencionados;
- XV) Caso eu desejar, poderei tomar conhecimento dos resultados ao final desta pesquisa
() Desejo conhecer os resultados desta pesquisa.
() Não desejo conhecer os resultados desta pesquisa.
- XVI) Caso tenham sido tiradas fotografias,
() concordo que sejam incluídas em publicações científicas, se necessário
() concordo que sejam apresentadas em aulas para profissionais da saúde
() não concordo que sejam incluídas em nenhum tipo de publicação ou apresentação.
- XVII) O material colhido será armazenado pelo tempo considerado necessário para a identificação e caracterização do gene e de sua mutação e/ou mecanismo genético responsável pela doença observada na sua família.

São Paulo, de de 2009.

Participante:

Pesquisador Responsável pelo Projeto: _____

Vítor de Góes Lima Dantas

Biólogo

Pesquisador e instituição responsáveis pelas amostras de DNA:

Dra. Regina Célia Mingroni Netto

CRBio/SP 10.238-01

Depto de Genética e Biologia Evolutiva

Instituto de Biociências - USP

Telefone para contato: (11)3091-7478