Ana Lúcia Pereira Monteiro Catelani

**Variação no Número de Cópias de Segmentos
de DNA (CNV) em Pacientes
com Surdez Sindrômica**

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

São Paulo
2010

Orientadora: Dra. Carla Rosenberg

Ficha Catalográfica

Catelani, Ana Lúcia P. Monteiro

**Variação no Número de Cópias de Segmentos
de DNA (CNV) em Pacientes
com Surdez Sindrômica**

155p.

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

1. Deficiência Auditiva
2. Surdez sindrômica
3. Hibridação comparativa do genoma em *arrays* (*aCGH*)
4. Variação no número de cópias de segmentos genômicos (CNVs)

Comissão Julgadora:

Prof(a). Dr(a).

Prof(a). Dr(a).

Prof(a). Dr(a).

Prof(a). Dr(a).

Prof^a. Dra. Carla Rosenberg
Orientadora

*Para meu marido Eduardo
e as nossas meninas, Ananda e Luisa,
com quem compartilho essa e outras conquistas na vida.*

“Bom mesmo é ir à luta com determinação, abraçar a vida e viver com paixão, perder com classe e viver com ousadia, pois o triunfo pertence a quem se atreve, e a vida é muita bela para ser insignificante.”

Charles Chaplin

Agradecemos ao auxílio financeiro da FAPESP (CEPID – 981454-2 e Temático 2009/00898-1) à pesquisa, ao CNPq pelo suporte à orientadora (Pesquisador Visitante 308328/2004-3) e ao Fleury S/A pelo apoio para o desenvolvimento de minhas atividades didático-científicas.

Agradecimentos

À minha orientadora, Dra. Carla Rosenberg, de forma muito carinhosa e especial, pela oportunidade, compreensão e orientação.

À Dra. Regina Célia Mingroni-Netto, do Departamento de Genética e Biologia Evolutiva – IBUSP, com muita estima e admiração, pelas suas valiosas sugestões, apoio e dedicação.

À contribuição de todos os familiares e pacientes que tornaram possível a concretização deste projeto.

À Dra. Ana Cristina Krepischi pelos ensinamentos, contribuição e por suas valiosas ideias.

À Dra. Angela Morgante, do Departamento de Genética e Biologia Evolutiva – IBUSP, por ter cedido gentilmente o seu laboratório, oferecendo todas as condições necessárias para a realização deste trabalho, além da realização de cariótipos.

Ao Dr. Paulo Alberto Otto, do Departamento de Genética e Biologia Evolutiva – IBUSP, com grande respeito e consideração, pelas suas preciosas avaliações clínicas dos pacientes e sugestões.

À Dra. Maria de Lourdes Chauffaille, ao Dr. Omar M. Hauache e à Carmen Paz Oplustil que semearam essa ideia, ao apoio intelectual e científico essencial para viabilizar este projeto.

Ao Dr. Alfredo Tabith Jr. e a toda DERDIC (Divisão de Educação e Reabilitação dos Distúrbios da Comunicação, PUC/São Paulo), pelos esclarecimentos e atenção proporcionada ao estudo clínico dos pacientes.

À Dra. Chong A Kim e à Dra. Débora R. Bertola (Instituto da Criança, do Hospital das Clínicas – USP) e à Dra. Nancy Izue Kokitsu (Hospital de Reabilitação de Anomalias Craniofaciais, Bauru, USP), pelo encaminhamento dos pacientes que participaram deste projeto.

Ao Dr. Fernando Kok, do Departamento de Neurologia, do Hospital das Clínicas (USP), pelo encaminhamento e estudo clínico dos pacientes.

À equipe que hoje compõe a Citogenética do Fleury S/A: Aline Ágatha, Aline Schiavoni, Ana Caroline, Ana Paula, André, Juliana, Kátia Akemi, Kátia Oliveira, Neuza, Maria Emília, Paula e Roberta pelo apoio e compreensão. E também a Samantha, Nadyr, Daniela e Isida.

À mais nova equipe do *aCGH*: Erika, Jacaré, Lígia e Mônica pelo convívio e amizade.

À Maria Teresa B. de M. Auricchio, Sílvia S. Costa, Rafaela M. Nascimento e Juliana F. Mazzeu pelo apoio, sugestões e amizade.

À equipe de “Surdez Hereditária” do laboratório: Karina, Ronaldo, Ana Carla, Lilian, Daniela e Daniel.

Ao Departamento de Genética e Biologia Evolutiva do IBUSP pela oportunidade e uso das dependências.

Aos funcionários do Departamento de Genética e Biologia Evolutiva do IBUSP, Maraisa, Fátima, Mara e Paulo pela atenção dispensada durante a realização deste projeto.

Índice Geral

I – INTRODUÇÃO	01
I. 1 - A complexidade genética da surdez	01
I. 2 - Sistema Auditivo	01
I. 2.1 - Conceito	02
I. 2.2 - Anatomia e Fisiologia do Sistema Auditivo	02
I. 3 - Deficiência Auditiva	08
I. 3.1 - Perda Auditiva	08
I. 3.2 - Etiologia	09
I. 3.3 - Classificação clínica da surdez	10
I. 4 - Genética da Surdez	11
I. 4.1 - Surdez Não-Sindrômica	13
I. 4.1.1 - Herança Autossômica Dominante	13
I. 4.1.2 - Herança Autossômica Recessiva	17
I. 4.1.3 - Herança Ligada ao Cromossomo X	20
I. 4.1.4 - Herança Ligada ao Cromossomo Y	21
I. 4.1.5 - Herança Mitocondrial	23
I. 4.2 - Surdez sindrômica	27
I. 4.2.1 - Herança Autossômica Dominante	27
I. 4.2.2 - Herança Autossômica Recessiva	32
I. 4.2.3 - Herança Ligada ao Cromossomo X	33
I. 4.2.4 - Herança Mitocondrial	34
I. 5 - As ferramentas de investigação cromossômica	35
I. 5.1 - Citogenética Clássica	35
I. 5.2 - Hibridação “ <i>in situ</i> ” fluorescente – FISH	37
1.5.3 - Hibridação comparativa de genomas em <i>array (aCGH)</i>	40
I. 5.3.1 - As plataformas de <i>aCGH</i>	42
I. 5.3.2 - <i>aCGH</i> – aplicações, impacto na clínica e na variabilidade humana	44

II – OBJETIVOS	47
II .1 - Objetivo Geral	48
II .2 - Objetivos Específicos	48
III – CASUÍSTICA E MÉTODOS	50
III. 1 - Casuística	51
III. 2 - Métodos	52
III. 2.1 - Anamnese genético-clínica	52
III. 2.2 - Extração de DNA genômico	53
III. 2.3 - Análises de mutações específicas	53
III. 2.4 - Estudo Cromossômico	55
III. 2.5 - Hibridação comparativa do genoma baseada em <i>arrays</i> (<i>Array Comparative Genomic Hybridization - aCGH</i>)	56
III. 2.6 - Hibridação <i>in situ</i> Fluorescente (FISH)	57
III. 2.7 - Rearranjos mapeados por <i>oligoarrays</i>	57
IV – RESULTADOS	59
IV. 1 - Achados genético-clínicos dos pacientes Investigados	60
IV. 2 - Resultados de <i>aCGH</i>	71
IV. 2.1 - Rearranjos <i>de novo</i>	74
IV. 2.2 - Rearranjos Herdados	79
V- DISCUSSÃO	83
V. 1 - Caracterização clínica da amostra de pacientes com deficiência auditiva	84
V. 2 - Plataformas de <i>aCGH</i>	84
V. 3 - Alterações genômicas e seu possível impacto na deficiência auditiva	86
V.3.1 - Rearranjos <i>de novo</i>	88

V.3.2 - Rearranjos Herdados	92
V. 4 - <i>aCGH</i> – BAC, <i>oligoarrays</i> e perspectivas	97
VI. 1 - RESUMO	99
VI. 2 - ABSTRACT	101
VII - REFERÊNCIAS	102
VII.1 - Referências Eletrônicas	103
VII.2 – Referências Bibliográficas	104
VIII - ANEXOS	136
IX - PUBLICAÇÃO	148

Índice de Figuras

I – Introdução

Figura 1 – Ilustração esquemática das diferentes partes do sistema auditivo humano, baseada na página de internet da Enciclopédia Britânica. **04**

Figura 2 – (A) Cóclea. Ilustração em corte longitudinal dos três compartimentos da cóclea: escala timpânica, escala coclear e escala vestibular. (B) Órgão de Corti. (C) Detalhe em corte transversal do órgão de Corti, no interior do duto coclear. Retirado do vídeo “Homem Virtual – Audição”, Telemedicina USP (05-2006). **06**

Figura 3 - Causas da surdez (baseado em van Camp e Smith, 2009, em *Gene Reviews*). **09**

Figura 4 – Ilustração da técnica de hibridação comparativa do genoma em arrays (*aCGH*): DNA teste marcado com um dinucleotídeo acoplado a fluorocromo Cy3 (verde) e DNA referência a fluorocromo Cy5 (vermelho) são misturados e precipitados na presença de Cot1 e hibridados em uma lâmina de vidro contendo um conjunto de sondas (*array*). Após aquisição e análise computacional das imagens, as intensidades de fluorescências são quantificadas para cada clone da lâmina: as intensidades equivalentes resultam em cor amarela (mistura de vermelho e verde); DNA teste com menor intensidade do que o DNA referência resulta em vermelho (área deletada); DNA teste com maior intensidade do que o DNA de referência resulta em verde (área duplicada). No gráfico, X=sondas de acordo com posição genômica. Y= $\log_2$ do teste/referência e eixo. **43**

IV – Resultados

Figura 5 – Fotos de pacientes que apresentaram alterações no número de cópias. (5A) Paciente 23 - hipertelorismo, tórax *pectus excavatum*, dedos curtos e grossos e 5º artelho. (5B) Paciente 20 - fronte ampla, hipertelorismo, inclinação antimongoloides das fendas palpebrais, orelhas displásicas e pescoço curto. (5C) Paciente 31 - heterocromia de íris, prega epicântica, nariz grosso, orelha com implantação baixa e defeito no lóbulo. (5D) Paciente 6 – ADNPM. (5E) Paciente 26 micrognatia, atrofia do nervo óptico, orelhas displásicas e pescoço alado. **73**

Figura 6 – Deleção em 1q23.2q23.5 no **Paciente 26**. (A) Perfil do cromossomo 1 por *aCGH*. Em vermelho (seta), as sondas que apresentaram redução no número de cópias. (B) FISH, apresentando metáfase parcial com os dois cromossomos 1 com sinais vermelhos (sonda controle) mas apenas um com sinal verde (sonda com alteração no número de cópias) (setas) (C) Ideograma do cromossomo 1 indicando a área deletada (retângulo vermelho) com a ilustração dos genes deletados dessa região, retirada do *Ensembl Genome Browser* em 09/2009. **75**

Figura 7 – Duplicação em 2q22.2q22.3 no **Paciente 31**. (A) Perfil do cromossomo 2 por *aCGH*. Em vermelho (seta), as sondas que apresentaram ganho no número de cópias. (B) Ideograma do cromossomo 2 indicando a área duplicada (retângulo vermelho) com a ilustração dos genes presentes nessa região, retirada do *Ensembl Genome Browser* em 11/2009. **76**

Figura 8 – Duplicação na região 6p25.2p25.3 no **Paciente 8** (A) Perfil do cromossomo 6 por *aCGH*. Em vermelho a região com aumento no número de cópias de DNA. (B) Perfil da duplicação por *aCGH* usando *oligoarray*. A imagem em forma de “bolha” resulta da sobreposição de duas hibridações com marcações reversas. Os genes presentes nesse segmento genômico estão representados na figura (imagem retirada de Catelani e col., 2009). **77**

Figura 9 – Deleção em 11q13.2q13.4 no **Paciente 6**. (A) Perfil do cromossomo 11 por *aCGH*. Em vermelho (seta), as sondas que apresentaram redução no número de cópias. (B) FISH, apresentando metáfase com apenas um dos cromossomos 11 com sinal verde (seta) (C) Ideograma do cromossomo 11 indicando a área deletada (retângulo vermelho) com a representação dos genes presentes nessa região, retirada do *Ensembl Genome Browser* em 02/2009. **78**

Figura 10 – Duplicação em 2q12.3q12.3 no **Paciente 19**. (A) Perfil do cromossomo 2 por *aCGH*. Em vermelho (seta), a sonda que apresentou ganho no número de cópias. (B) Ideograma do cromossomo 2 indicando a área duplicada (retângulo vermelho) com a representação dos genes dessa região, retirada do *Ensembl Genome Browser* em 09/2009. **79**

Figura 11 – Deleção em 4q23q24 no **Paciente 10**. (A) Perfil do cromossomo 4 por *aCGH*. Em vermelho (seta), a sonda que apresentou redução no número de cópias. (B) FISH, apresentando metáfase parcial com os cromossomos 4 com sinais verdes de intensidades claramente diferentes (setas) (C) Ideograma do cromossomo 4 indicando a área deletada (retângulo vermelho) com a apresentação dos genes presentes nessa região, retirada do *Ensembl Genome Browser* em 09/2009.

80

Figura 12 – Deleção em 7q31.1q31.1 no **Paciente 23**. (A) Perfil do cromossomo 7 por *aCGH* de 1 Mb. Em vermelho (seta), a sonda que apresentou redução no número de cópias. (B) Resultados de *aCGH* com *oligoarrays* 44K: acima, ideograma do cromossomo 7 e representação da área deletada. Abaixo, perfil da região próxima à alteração mostrando deleção de 25-46 kb, que compreende os exons 4 e 5 do gene *IMMP2L*.

81

Figura 13 – Deleção em 15q15.3q15.33 no **Paciente 20**. (A) Perfil do cromossomo 15 por *aCGH*. Em vermelho (seta), a sonda que apresentou redução no número de cópias. (B) Ideograma do cromossomo 15 e representação da área deletada e dos genes presentes nessa região, retirada do *Ensembl Genome Browser* em 02/2009.

82

Índice de Tabelas

I - Introdução

Tabela 1 - Relação de locos e genes identificados como responsáveis pela surdez não-sindrômica de herança autossômica dominante. **15-16**

Tabela 2 - Relação de locos e genes identificados como responsáveis pela surdez não-sindrômica de herança autossômica recessiva. **18-20**

Tabela 3 - Locos mapeados ligados aos cromossomos X e Y relacionados à surdez hereditária não- sindrômica (modificado de Petersen e col., 2008 e da *Hereditary Hearing Loss Home Page*). **22**

Tabela 4 - Mutações em genes mitocondriais associadas à surdez hereditária sindrômica e não-sindrômica (modificado de Lévêque e col., 2007 e da *Hereditary Hearing Loss Home Page*). **24-26**

Tabela 5 - Algumas síndromes hereditárias que incluem surdez como sinal clínico. **29-31**

IV – Resultados

Tabela 6 - Dados e sinais clínicos dos pacientes com deficiência auditiva. **62-70**

Tabela 7 - Descrição das variações no número de cópias de oito pacientes com surdez sindrômica. As posições genômicas estão descritas de acordo com *Human Genome Building NCBI36,1,HG18*. **72**

V - Discussão

Tabela 8 - Descrição sumarizada das funções de possíveis genes candidatos dos indivíduos que apresentaram alteração no número de cópias. **96**

Índice de Quadro

V – Discussão

Quadro I - Fatores que influenciam o efeito fenotípico de CNV.	90
---	-----------

INTRODUÇÃO

I – INTRODUÇÃO

I. 1 - A complexidade genética da surdez

Os notáveis avanços da genética nos últimos anos aceleraram a identificação de genes e a compreensão de processos biológicos relacionados a muitas doenças humanas. Nos anos 90, o desenvolvimento da citogenética molecular abriu um novo caminho para mapear locos gênicos que desencadeiam ou influenciam o surgimento de doenças que apresentam heterogeneidade genética, como a surdez.

Além do enorme número de genes relacionados à surdez, outros fatores aumentam a complexidade da genética da audição: tem sido observado que mutações em um mesmo gene podem estar associadas a diferentes padrões de herança. Para melhor compreensão do tema “surdez”, abordaremos brevemente no próximo tópico a morfologia e fisiologia do sistema auditivo. Em seguida, apresentaremos uma revisão da literatura sobre a deficiência auditiva e sobre a genética da surdez hereditária síndrômica e não-síndrômica. E por último, apresentaremos uma visão geral das ferramentas metodológicas aplicadas neste estudo.

I. 2 – Sistema Auditivo

As informações referentes ao conceito de audição, anatomia e fisiologia do sistema auditivo descritas nesse tópico foram baseadas nos artigos: (Vollrath e col., 2007; Cristobal e Oghalai, 2008), do Projeto Homem Virtual – Audição, Telemedicina USP 05-2006 (Prof. Dr. György Miklós Böhm, do Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina da USP e do Prof. Dr. Oswaldo Laércio Mendonça Cruz, do Departamento de Otorrinolaringologia e Cirurgia de Cabeça e Pescoço da UNIFESP) e nas páginas da internet da Fundação Otorrinolaringologia (FORL); da *Baylor College of Medicine* e da

Earlab da Universidade de Boston (*A Virtual Laboratory For Auditory Research*).

I. 2.1- Conceito

A audição (latim *auditione*) é a capacidade de captar e traduzir informações para o cérebro dos sons emitidos pelo ambiente. O som é decorrente de vibrações mecânicas que podem ocorrer em meio líquido, como a água, sólido, como a terra ou gasoso, como o ar. Essas vibrações se propagam por meio de ondas. Quando um corpo vibra, as ondas sonoras correspondem às ondas de variações de pressão, ou seja, de compressão (aumento de pressão quando as moléculas colidem umas com as outras) e de rarefação (diminuição de pressão quando as moléculas se afastam).

As variações na frequência das ondas permitem que diferentes sons sejam detectados. A frequência sonora define um som como grave, médio ou agudo. A frequência é expressa em ciclos por segundo ou Hertz (Hz) e é inversamente proporcional ao comprimento de onda. A amplitude das vibrações corresponde à intensidade sonora (som fraco e forte), expressa em decibéis (dB).

A orelha é o órgão responsável por captar as ondas sonoras e, assim, dar início ao processo de percepção e interpretação do som. Sabemos que a orelha humana não tem capacidade de perceber sons com frequências muito baixas (abaixo de 20 Hz = infra-sons) ou frequências muito altas (acima de 20 kHz = ultra-sons). Portanto, a faixa de frequências de sons detectáveis para os humanos está entre 20 Hz e 20.000 Hz, embora haja variações de pessoa para pessoa.

I. 2.2 - Anatomia e Fisiologia do Sistema Auditivo

O sistema auditivo humano é responsável por captar as diferentes ondas sonoras e dar início ao processo de percepção e interpretação do som. Para o sistema auditivo humano ser capaz de detectar o som é necessário direcionar as ondas sonoras para o interior da orelha, perceber flutuações na pressão do

ar e traduzir essas flutuações em sinais elétricos para que sejam compreendidas pelo sistema nervoso.

O sistema auditivo humano está dividido em três partes: orelha externa, média e interna (Figura 1). A orelha externa reflete o som para o canal auditivo, onde as ondas da pressão são alinhadas para atingir o tímpano. A posição da orelha externa e suas várias curvas auxiliam a direcionar o som. A reflexão do som altera o padrão da onda sonora.

Figura 1 – Ilustração esquemática das diferentes partes do sistema auditivo humano, baseada na página de internet da Enciclopédia Britânica.

A orelha média corresponde a uma cavidade preenchida por ar que se comunica com a nasofaringe por meio da tuba auditiva (trompa de Eustáquio). A orelha média possui uma cadeia de ossículos, composta por martelo (conectado diretamente com a membrana timpânica), bigorna e o estribo, o qual está em contato com a cóclea por meio da janela oval. O papel da orelha média é manter o equilíbrio entre as vibrações aéreas da membrana timpânica e as variações de pressão nos compartimentos líquidos da orelha interna, o que é feito por meio da cadeia de ossículos (Figura 1). Quando o tímpano vibra, movimenta o martelo como uma alavanca. O outro lado do martelo está

conectado à bigorna que é ligada ao estribo. Este por sua vez, está apoiado à cóclea, na janela oval.

Os ossículos amplificam a força aplicada ao tímpano por meio de dois mecanismos: o mecanismo hidráulico, provocado pela diferença de tamanho do tímpano em relação ao estribo, por meio do qual as ondas sonoras exercem uma força no tímpano e transfere toda essa energia para o estribo. Ao concentrar essa energia em uma área menor em relação à área do tímpano, tem-se uma pressão muito maior. O outro mecanismo, de alavanca martelo-bigorna, decorre de o martelo ser mais longo que a bigorna, formando uma alavanca entre o tímpano e o estribo. A pressão exercida sobre o fluido da cóclea está muitas vezes amplificada em relação à pressão exercida no sentido do tímpano. Essa amplificação da pressão é suficiente para passar as informações do som para o ouvido interno, onde serão traduzidas em impulsos elétricos para o cérebro.

A membrana timpânica vibra constantemente devido aos estímulos sucessivos de ondas sonoras. Como a entrada de ar ocorre tanto pela orelha externa como pela boca, a pressão do ar é a mesma dos dois lados da membrana timpânica, permitindo que o tímpano se movimente livremente para frente e para trás na orelha média. Quando ocorre algum tipo de impedimento ou obstrução resultando em um desequilíbrio nos mecanismos de captação e condução, ocorre perda auditiva. Neste caso, a perda auditiva é chamada de condutiva e pode ser corrigida através de medicação e/ou intervenção cirúrgica.

A complexa arquitetura da orelha interna corresponde a uma cavidade óssea, preenchida por líquido e ancorada na porção pétrea do osso temporal. Dentro dessa cavidade óssea estão: a cóclea, responsável pela transdução dos estímulos sonoros em impulsos nervosos e o sistema vestibular, responsável pela orientação espacial e pelo equilíbrio.

A cóclea é um canal em forma de caracol que está dividido longitudinalmente em três compartimentos ósseo-membranosos: escala timpânica, ducto coclear e escala vestibular (Figura 2). Os compartimentos externos, a escala timpânica e a escala vestibular, estão preenchidas por

Figura 2 – (A) Cóclea. Ilustração em corte longitudinal dos três compartimentos da cóclea: escala timpânica, escala coclear e escala vestibular. (B) Órgão de Corti. (C) Detalhe em corte transversal do órgão de Corti, no interior do ducto coclear. Retirado do vídeo “Homem Virtual – Audição”, Telemedicina USP (05-2006).

perilinf, um fluido rico em sódio e semelhante ao fluido extracelular. Já o interior do ducto coclear contém endolinf, líquido semelhante ao intracelular e rico em potássio. A escala timpânica encontra-se com a orelha média pela janela oval. No ducto coclear ou escala média tem-se o órgão de Corti, delimitado em sua base pela membrana basilar, com 16.000 células ciliadas, assim chamadas por apresentarem no ápice de cada célula feixes de

estereocílios. Os estereocílios maiores tocam a membrana tectória. As células ciliadas desempenham dois importantes papéis: transformar as vibrações mecânicas da endolinfa no ouvido interno em impulsos elétricos e enviar os impulsos aos neurônios auditivos no gânglio espiral. A escala vestibular encontra-se com a orelha média na janela oval.

A diferença de composição iônica entre a endolinfa e a perilinfa gera o potencial endococlear de aproximadamente +90 mV, de grande importância no mecanismo de transdução. No órgão de Corti, existem dois tipos de células ciliadas, que diferem em morfologia e função: as células ciliadas internas e as células ciliadas externas. As células ciliadas internas são as principais células receptoras, desempenhando importante papel na transdução do som em impulsos nervosos. As células ciliadas externas apresentam elementos sensoriais e motores envolvidos na seletividade da frequência.

Na cóclea, a escala vestibular e a escala timpânica comportam-se como um sistema hidrodinâmico. As diferenças de pressão resultantes provocam deslocamentos na membrana basilar, gerando ondulações de diferentes frequências. Essas vibrações mecânicas da membrana basilar e do órgão de Corti causam a deflexão mecânica do feixe de estereocílios. Os canais iônicos de transdução mecânicos-sensitivos estão localizados na parte distal das extremidades dos estereocílios. A deflexão ocorre em todos os estereocílios devido às conexões laterais existentes entre os estereocílios, permitindo que a pressão aplicada a um estereocílio seja transmitida para outro vizinho. Além das conexões laterais há também uma conexão denominada *tip links* que faz a conexão da extremidade de um estereocílio ao vizinho mais alto. A descoberta dos *tip links* é sugestiva de um modelo estrutural de transdução, no qual a deflexão dos estereocílios aumenta a tensão dos *tip links*, esticando-os e abrindo os canais de transdução, permitindo o influxo de cálcio e, principalmente potássio, despolarizando as células ciliares internas (Figura 2).

Portanto, com a inclinação e estimulação dos cílios, ocorre a despolarização das células ciliadas internas, com formação de potenciais receptores pela entrada de potássio. Em seguida, há a liberação de neurotransmissores e a formação de uma mensagem sonora codificada em impulsos elétricos, que é transmitida ao sistema nervoso central (SNC) pelo nervo acústico.

I. 3 – Deficiência Auditiva

I. 3.1- Perda Auditiva

A perda auditiva é o defeito mais comum ao nascimento e o distúrbio sensorioneural de maior prevalência nos países desenvolvidos. Uma estimativa americana indica que um em cada 500 recém-nascidos apresenta perda auditiva sensorioneural bilateral ≥ 40 dB, isto é, moderada (Hilgert e col., 2009). A prevalência aumenta para 2.5 por 1.000 antes dos cinco anos de idade e de 3.5 por 1.000, em adolescentes (Morton e Nance, 2006). No Brasil, foi estimado que 4 em cada 1.000 indivíduos apresentam alguma perda auditiva ao nascimento (Braga e col., 1999). de Nóbrega e colaboradores (2005) demonstraram, comparando entre dois períodos (1990-1994 e 1994-2000) a contribuição dos principais fatores etiológicos, em que a rubéola congênita representa um importante fator e, ainda de que fatores genéticos apresentaram uma queda na frequência passando de 14% (1990-1994) para 6.9% (1994-2000) das 442 crianças e adolescentes brasileiros investigados (de Nóbrega e col., 2005).

Cerca de 70 milhões de pessoas no mundo apresentam algum grau de perda auditiva (Eisen e Ryugo, 2007). Além da alta incidência, as implicações da perda auditiva na linguagem, na cognição e no desenvolvimento emocional e social reforçam sua importância. A frequência e a gravidade da perda auditiva aumentam com a idade. Na população mundial, aproximadamente 10% dos indivíduos com 60 anos e 50% dos indivíduos com 80 de idade são afetados por perda auditiva (Siemering e col., 2006).

Os termos SURDEZ, DEFICIÊNCIA AUDITIVA e PERDA AUDITIVA nesse trabalho serão adotados para nos referirmos a qualquer comprometimento auditivo significativo, não considerando o tipo, a etiologia, o grau de gravidade e a frequência. Para profissionais, como otorrinolaringologistas e fonoaudiólogos, por exemplo, essa mesma terminologia pode não se aplicar. Entretanto, em publicações científicas sobre genética, os termos surdez, deficiência auditiva e perda auditiva são os mais empregados.

I. 3.2 – Etiologia

A surdez é clínica e geneticamente uma doença extremamente heterogênea (Figura 3) e pode ser causada por fatores ambientais (20-25% dos casos em países desenvolvidos), tais como prematuridade, otite média, drogas ototóxicas (antibióticos aminoglicosilados), infecções virais pré ou pós-natais (por exemplo, citomegalovírus). Pode ser causada também por fatores genéticos (aproximadamente 50% dos casos nos países desenvolvidos), especificamente por mutações em genes nucleares ou mitocondriais. O efeito desses genes pode ou não depender de interação entre eles e com o ambiente. Os casos remanescentes (25 a 30%) são atribuídos a causas desconhecidas (Morton, 1991; Bitner-Glindzicz, 2002), van Camp e Smith, 2009 em *Gene Reviews*. A Figura 3 apresenta um esquema das principais causas de surdez e sua contribuição em porcentagem.

Figura 3 – Causas da surdez (baseado em van Camp e Smith, 2009, em *Gene Reviews*).

Os valores apresentados acima referentes à contribuição de cada um desses fatores foram estimados na Europa e nos Estados Unidos e estão diretamente relacionados ao grau de desenvolvimento sócio-econômico da população. Nos países desenvolvidos, mais de 50% dos casos de surdez são devido a fatores genéticos, enquanto no Brasil a estimativa correspondente é

de apenas 16% (Braga, 1998; Braga e col., 1999). Longhitano e Brunoni (2000) realizaram um estudo com 228 pacientes brasileiros com perda auditiva suspeita ou confirmada de surdez hereditária, sendo que 146 (64%) dos pacientes apresentavam somente perda auditiva (não sindrômica) e 82 (36%) dos pacientes eram sindrômicos. A etiologia genética foi de 40,8% de herança autossômica recessiva (sindrômica e não sindrômica), 13,2% autossômica dominante, 1,3% ligada ao X e em 44,7% a cauda não pôde ser esclarecida. Com esses resultados, Longhitano e Brunoni (Longhitano e Brunoni, 2000) demonstraram que o diagnóstico genético da surdez no Brasil apresenta padrões similares aos dados da literatura.

I. 3.3 - Classificação clínica da surdez

A surdez pode também ser classificada com base em diferentes critérios clínicos, como os descritos em (Finsterer e Fellingner, 2005). Sendo assim, a surdez pode ser classificada quanto à manifestação clínica em sindrômica e não-sindrômica. A surdez associada com outras deficiências ou sinais clínicos é chamada de **sindrômica**. Na situação em que nenhum outro sinal clínico aparece associado, a surdez é dita **não-sindrômica**. Quanto à idade de manifestação, é dita **pré-lingual** quando se manifesta antes ou durante o aprendizado da linguagem, ou **pós-lingual**, quando ocorre depois do período de aprendizado da linguagem. Outro critério é a lateralidade, sendo chamada de **bilateral**, quando as duas orelhas são afetadas, e de **unilateral** quando apenas uma orelha apresenta surdez.

De acordo com a frequência em decibéis, a surdez pode ser classificada quanto à gravidade, como: **leve** (21dB a 40dB); **moderada** (41dB a 60 dB); **moderadamente grave (severa)** (61dB a 80 dB); **grave (severa)** (81-100dB) ou **profunda** (>100 dB). E em relação à evolução da surdez pode ser chamada de **estacionária** quando não se altera com o tempo, ou **progressiva** quando primeiramente surge como leve evoluindo para outras frequências (Finsterer e Fellingner, 2005).

E, finalmente, quanto à localização do defeito, sendo classificada como **condutiva** se o defeito estiver na captação e/ou condução do som, no canal auditivo externo, membrana timpânica ou nos ossículos (orelha média).

Quando o defeito ocorre a partir da orelha interna até o encéfalo é dita sensorineural. Pode resultar de defeitos de células ciliadas externas, células ciliadas internas, do nervo auditivo, do tronco encefálico e até mesmo do encéfalo.

I. 4 - Genética da Surdez

Como já discutido, a genética é a causa principal de deficiência auditiva em cerca de 50% dos casos. Embora mais de 400 síndromes já tenham sido descritas, incluindo surdez entre as manifestações clínicas, aproximadamente 70% dos casos não têm outros sinais associados (não-sindrômica), a maioria dos quais são sensorineurais. Os 30% remanescentes apresentam características clínicas adicionais que algumas vezes permite identificar o indivíduo como portador de uma síndrome bem estabelecida. Frequentemente, porém, os sinais adicionais apresentados por um indivíduo com surdez (surdez sindrômica) não se encaixam em síndromes já descritas (Keats e Berlin, 1999).

A localização e identificação de genes responsáveis por surdez foram intensificadas no início da década de 90. O primeiro defeito genético causador de surdez hereditária não-sindrômica foi descoberto em 1993, uma mutação mitocondrial (Prezant e col., 1993). Em 1994 foi mapeado na região cromossômica 13q12, o primeiro loco não mitocondrial relacionado à surdez de herança autossômica recessiva (DFNB1) (Guilford e col., 1994b). Em 1997, o gene correspondente a esse loco foi clonado, *GJB2*, que codifica a proteína conexina 26 (Cx26) (Guilford e col., 1994b; Kelsell e col., 1997). Também nesse mesmo ano, foi identificado e mapeado, em uma família da Costa Rica, o primeiro loco de surdez não-sindrômica com padrão de herança autossômica dominante, DFNA1, na região cromossômica 5q31, cujo gene correspondente *DIAPH1*(*HDIA1*) que se expressa em muitos tecidos, incluindo a cóclea e desempenha um importante papel na regulação da polimerização da actina (Lynch e col., 1997); revisão de (Finsterer e Fellingner 2005). Desde então, muitos estudos foram realizados para identificar os genes responsáveis pela surdez hereditária.

Devido à extrema heterogeneidade genética da surdez não-sindrômica, em que não há a possibilidade de se diferenciar os genótipos com base nos fenótipos, seu mapeamento genético representa uma difícil tarefa. Estudos em indivíduos afetados da mesma família são facilitados pelo pressuposto de que partilham a causa genética do fenótipo. Por meio de estudos de ligação, mais de 50 genes foram mapeados em famílias grandes com várias gerações, ou pequenas comunidades isoladas geograficamente com alto grau de consanguinidade (*Hereditary Hearing Loss Home Page*).

Atualmente, estima-se que aproximadamente 1% dos genes humanos (220-250 genes) estejam envolvidos com audição. No endereço da *Hereditary Hearing Loss Home Page* estão listados mais de 100 locos relacionados à deficiência auditiva. As funções dos genes são diversificadas e a lista inclui genes que codificam para componentes de matriz extracelular, proteínas de “gap junction” e adesão, canais de íons e transportadores, proteínas de superfície das células e receptores, assim como proteínas de citoesqueleto, fatores de transcrição e outras proteínas. Além do grande número de genes descritos, outros fatores aumentam a complexidade genética da surdez, como por exemplo, mutações diferentes em um mesmo gene que resultam em diferentes padrões de herança (Finsterer e Fellingner 2005; Friedman e col., 2007).

Embora, para facilitar o entendimento, tenhamos classificado as formas de surdez em sindrômica ou não-sindrômica e de acordo com o tipo de herança, pode-se observar que em muitos casos há sobreposição entre os grupos, pois diferentes mutações em um mesmo gene podem levar tanto à surdez não-sindrômica como sindrômica, como: DFNB18 e síndrome de Usher tipo 1C; DFNB12 e síndrome de Usher tipo 1D; DFNB4 e síndrome de Pendred. Adicionalmente, pode ocorrer a colocalização de locos autossômicos recessivos e dominantes. Alguns exemplos dessa ocorrência são os locos DFNB1 e DFNA3, ambos estão mapeados no cromossomo 13q12, com mutações identificadas nos genes *GJB2* e *GJB6*. Mutações nesses genes estão relacionadas à surdez não-sindrômica ou associada a outros sinais clínicos, como a queratoderma palmoplantar (OMIM 148350), displasia ectodérmica (OMIM #129500), síndrome KID (*keratitis-ichthyosis-deafness*) (OMIM #148210) e a síndrome Vohwinkel's (OMIM *121011), como a

queratopauquidermia (OMIM #124500); DFNB2 e DFNA11, cujo gene *MYO7A* também causa a síndrome de Usher 1B; DFNB21 e DFNA8/12, com mutações no gene *TECTA*.

A seguir, discutiremos a surdez de acordo com diferentes padrões de herança. No entanto, não incluímos nas tabelas, aqueles locos sobre os quais não encontramos nenhuma informação na literatura, especificamente aqueles listados no *Hereditary Hearing Loss Home Page* como “reserved”.

I. 4.1 - Surdez Não-Sindrômica

Os diferentes locos ou regiões candidatas a conterem um ou mais genes responsáveis pela surdez não-sindrômica são chamados DFN (do inglês DeaFNess) e são numerados seguindo a ordem de descoberta. Os locos que contêm genes de surdez supostamente autossômica recessiva são denominados DFNB, os locos de surdez autossômica dominante de DFNA e os locos que estão no cromossomo X são designados de DFX. Além disso, dois locos foram identificados como modificadores, designados como DFXM1, localizado na região cromossômica 1q24 (Riazuddin e col., 2000) e o DFXM2, na região cromossômica 8p23 (Bykhovskaya e col., 2000). E, ainda foi mapeado um loco de neuropatia auditiva de herança autossômica dominante (AUNA1), no cromossomo 13q14q21 (Kim e col., 2004)

I. 4.1.1 - Herança Autossômica Dominante

A surdez não-sindrômica de herança autossômica dominante representa 15-24% dos casos de surdez hereditária. Foram mapeados 51 locos com 22 genes (*Hereditary Hearing Loss Home Page*) (Tabela 1). A maioria desses genes de surdez autossômica dominante está associada com perda auditiva pós-lingual, geralmente iniciada após os 20 anos de idade. Em algumas formas, entretanto, a surdez só tem início após a 3ª ou 4ª década, como é o caso das formas mapeadas nos locos DFNA4, DFNA9 e DFNA10. As mutações nos locos DFNA6/14/38 (mutações no gene *WFS1*) resultam em surdez moderada progressiva em baixa frequência. Os locos DFNA12,

DFNA13 e DFNA21 são caracterizados por estarem associados à surdez de médias frequências (Bitner-Glindzicz 2002; Kim e col., 2004).

O gene *COL11A2* está localizado na região cromossômica 6p21 e mutações nesse gene podem também causar a **síndrome de Stickler** (Vikkula e col., 1995), e surdez de médias frequências mapeada em DFNA13 (Brown e col., 1997; McGuirt e col., 1999). A surdez associada ao loco DFNA13 inicia-se em médias frequências progredindo para altas frequências entre os 20-40 anos. Experimentos com modelos animais demonstraram que as mutações no gene *COL11A2* levam à perda de organização da fibra de colágeno tipo 2, acarretando alterações da membrana tectorial (Bitner-Glindzicz 2002).

Tabela 1 - Relação de locos e genes identificados como responsáveis pela surdez não-sindrômica de herança autossômica dominante.

Loco	Localização Cromossômica	Gene	Referências
DFNA1	5q31	<i>DIAPH1</i>	(Leon e col., 1992; Lynch e col., 1997)
DFNA2	1p34	<i>GJB3/</i> <i>KCNQ4</i>	(Coucke e col., 1994; Xia e col., 1998; Kubisch e col., 1999)
DFNA3	13q12	<i>GJB2/GJB6</i>	(Chaib e col., 1994; Denoyelle e col., 1998; Grifa e col., 1999)
DFNA4	19q13	<i>MYH1</i>	(Chen e col., 1995; Donaudy e col., 2004)
DFNA5	7p15	<i>DFNA5</i>	(Van Camp e col., 1995; Van Laer e col., 1998)
DFNA6	4p16.3	<i>WFS1</i>	(Lesperance e col., 1995; Bessalova e col., 2001; Young e col., 2001)
DFNA7	1q21-q23	?	(Fagerheim e col., 1996)
DFNA8	11q22-24	<i>TECTA</i>	(Verhoeven e col., 1998; Kirschhofer e col., 1998)
DFNA9	14q12-q13	<i>COCH</i>	(Manolis e col., 1996; Robertson e col., 1998)
DFNA10	6q22-23	<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., 1997a; Liu e col., 1997b)
DFNA12	11q22-q24	<i>TECTA</i>	(Verhoeven e col., 1997; Verhoeven e col., 1998)
DFNA13	6p21	<i>COL11A2</i>	(Brown e col., 1997; McGuirt e col., 1999)
DFNA14	4p16	<i>WFS1</i>	(Van Camp G. e col., 1999; Bessalova e col., 2001; Young e col., 2001)
DFNA15	5q31	<i>POU4F3</i>	(Vahava e col., 1998)
DFNA16	2q23-24.3	?	(Fukushima e col., 1999)
DFNA17	22q	<i>MYH9</i>	(Lalwani e col., 1999; Lalwani e col., 2000)
DFNA18	3q22	?	(Bonsch e col., 2001)
DFNA19	10 (pericêntrico)	?	Não publicado – Entrez Gene ID: 1712
DFNA20	17q25	<i>ACTG1</i>	(Morell e col., 2000; Zhu e col., 2003; van Wijk e col., 2003)
DFNA21	6p21	?	(Kunst e col., 2000)
DFNA22	6q13	<i>MYO6</i>	(Melchionda e col., 2001)

Continuação da **Tabela 1** - Relação de locos e genes identificados como responsáveis pela surdez não-sindrômica de herança autossômica dominante.

Loco	Localização Cromossômica	Gene	Referências
DFNA23	14q21-q22	?	(Salam e col., 2000)
DFNA24	4q	?	(Hafner e col., 2000)
DFNA25	12q21-24	?	(Greene e col., 2001)
DFNA26	17q25	<i>ACTG1</i>	(Morell e col., 2000; Zhu e col., 2003; van Wijk e col., 2003)
DFNA27	4q12	?	(Peters e col., 2008)
DFNA28	8q22	<i>TFCP2L3</i>	(Peters e col., 2002)
DFNA30	15q25-26	?	(Mangino e col., 2001)
DFNA31	6p21.3	?	(Snoeckx e col., 2004)
DFNA32	11p15	?	Não publicado – Entrez GeneID: 94138
DFNA33	13q34-qter	?	(Bonsch e col., 2009)
DFNA34	1q44		Não publicado – Entrez GeneID: 94139
DFNA36	9q13-q21	<i>TMC1</i>	(Kurima e col., 2002)
DFNA37	1p21	?	Não publicado – Entrez GeneID: 317718
DFNA38	4p16.3	<i>WFS1</i>	(Young e col., 2001)
DFNA39	4q21.3	<i>DSPP</i>	(Xiao e col., 2001)
DFNA40	16p12	?	Não publicado – Entrez GeneID: 63945
DFNA41	12q24-qter	?	(Blanton e col., 2002)
DFNA42	5q31.1-q32	?	(Xia e col., 2002)
DFNA43	2p12	?	(Flex e col., 2003)
DFNA44	3q28-29	<i>CCDC50</i>	(Modamio-Hoybjor e col., 2003; Modamio-Hoybjor e col., 2007)
DFNA47	9p21-22	?	(D'Adamo e col., 2003a)
DFNA48	12q13-q14	<i>MYO1A</i>	(Donaudy e col., 2003; D'Adamo e col., 2003b)
DFNA49	1q21-q23	?	(Moreno-Pelayo e col., 2003)
DFNA50	7q32	?	(Modamio-Hoybjor e col., 2004)
DFNA51	9p21	?	(Shaikh e col., 2005)
DFNA52	5q31.1-q32	?	(Qiong e col., 2008; Bu e col., 2009)
DFNA53	14q11-q12	?	(Yan e col., 2006)
DFNA54	5q31	?	(Gurtler e col., 2004)
DFNA57	19p13.2	?	(Bonsch e col., 2008)

I. 4.1.2 - Herança Autossômica Recessiva

Estima-se que 75%-80% das formas de surdez não-sindrômica têm herança autossômica recessiva (Bitner-Glindzicz 2002; Finsterer e Fellingner 2005), comumente manifestadas como surdez pré-lingual, mais frequentemente de grave (severa) a profunda. Até o momento, foram mapeados 67 locos com 31 genes (Tabela 2), sendo que quatro desses genes contêm também mutações que se comportam como dominantes (*Hereditary Hearing Loss Home Page*) (Tabelas 1 e 2). No entanto, mais de 50% dos casos de surdez não-sindrômica autossômica recessiva estão relacionados a mutações no loco DFNB1, que contém os genes *GJB2* e *GJB6*, os quais codificam as proteínas conexina 26 e 30, respectivamente.

O gene *Gap Junction Beta 2* ou *GJB2* (GenBank M86849, OMIM: *121011) está localizado no cromossomo 13, na região 13q11. A proteína codificada, a conexina 26, é uma proteína “*gap junction*” da classe *beta* que se expressa na epiderme e na cóclea (Kelsell e col., 1997). A função dessa proteína é realizar junções entre os citoplasmas de células adjacentes, possibilitando a passagem de substâncias, principalmente íons. Portanto, está diretamente relacionada à homeostasia iônica do aparelho auditivo.

A frequência de alelos mutados no gene *GJB2* na população geral que causam surdez autossômica recessiva é de aproximadamente um em 33 em alguns países europeus (van Camp e Smith, 2009, em *Gene Reviews*). Diferentes populações apresentam predomínio de diferentes mutações: a *167delT* é predominante na população de judeus Ashkenazi (Lerer e col., 2000), descendentes de caucasianos do norte da Europa (Gasparini e col., 2000), a *235delC* na população asiática (Abe e col., 2000) e a *R143W* nos africanos (Brobby e col., 1998; Hamelmann e col., 2001). Na população brasileira, a frequência de heterozigotos para a mutação 35delG foi estimada em 1% (Sartorato e col., 2000).

Tabela 2 – Relação de locos e genes identificados como responsáveis pela surdez não-sindrômica de herança autossômica recessiva.

Loco	Localização Cromossômica	Gene	Referências
DFNB1	13q12	<i>GJB2</i>	(Guilford e col., 1994b)
	13q12	<i>GJB6</i>	(Kelsell e col., 1997)
DFNB2	11q13.5	<i>MYO7A</i>	(Guilford e col., 1994a; Weil e col., 1997; Liu e col., 1997b)
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., 1995a)
DFNB6	3p14-p21	<i>TMIE</i>	(Fukushima e col., 1995b; Naz e col., 2002)
DFNB7	9q13-q21	<i>TMC1</i>	(Jain e col., 1995; Kurima e col., 2002)
DFNB8	21q22	<i>TMPRSS3</i>	(Veske e col., 1996; Scott e col., 2001)
DFNB9	2p22-p23	<i>OTOF</i>	(Chaib e col., 1996a; Yasunaga e col., 1999)
DFNB10	21q22.3	<i>TMPRSS3</i>	(Bonne-Tamir e col., 1996; Scott e col., 2001)
DFNB11	9q13-q21	<i>TMC1</i>	(Scott e col., 1996; Kurima e col., 2002)
DFNB12	10q21-q22	<i>CDH3</i>	(Chaib e col., 1996b; Bork e col., 2001)
DFNB13	7q34-36	?	(Mustapha e col., 1998a)
DFNB14	7q31	?	(Mustapha e col., 1998b)
DFNB15	3q21-q25	?	(Chen e col., 1997; Chen e col., 2000)
	19p13	?	
DFNB16	15q21-q22	<i>STRC</i>	(Campbell e col., 1997; Verpy e col., 2001)
DFNB17	7q31	?	(Greinwald, Jr. e col., 1998)
DFNB18	11p14-15.1	<i>USH1C</i>	(Jain e col., 1998; Ouyang e col., 2002; Ahmed e col., 2002)
DFNB19	18p11	?	Não publicado - Entrez Gene
DFNB20	11q25-qter	?	(Moynihan e col., 1999)
DFNB21	11q	<i>TECTA</i>	(Mustapha e col., 1999; Naz e col., 2003)
DFNB22	16p12.2	<i>OTOA</i>	(Zwaenepoel e col., 2002)
DFNB23	10p11.2-q21	<i>PCDH15</i>	(Ahmed e col., 2003b)
DFNB24	11q23	<i>RDX</i>	(Khan e col., 2007a; Khan e col., 2007b)

Continuação da **Tabela 2** - Relação de locos e genes identificados como responsáveis pela surdez não-sindrômica de herança autossômica recessiva.

Loco	Localização Cromossômica	Gene	Referências
DFNB25	4p15.3-q12	?	(Odeh e col., 2004)
DFNB26	4q31	?	(Riazuddin e col., 2000)
DFNB27	2q23-q31	?	(Pulley e col., 2000)
DFNB28	22q13	<i>TRIOBP</i>	(Shahin e col., 2006; Riazuddin e col., 2006)
DFNB29	21q22	<i>CLDN14</i>	(Wilcox e col., 2001)
DFNB30	10p12.1	<i>MYO3A</i>	(Walsh e col., 2002)
DFNB31	9q32-q34	<i>WHRN</i>	(Mustapha e col., 2002a; Mburu e col., 2003)
DFNB32	1p13.3-22.1	?	(Masmoudi e col., 2003)
DFNB33	10p11.23-q21.1	?	(Medlej-Hashim e col., 2002; Belguith e col., 2009)
DFNB35	14q24.1-24.3	<i>ESRRB</i>	(Ansar e col., 2003b; Collin e col., 2008)
DFNB36	1p136.3	<i>ESPN</i>	(Naz e col., 2004)
DFNB37	6q13	<i>MYO6</i>	(Ahmed e col., 2003a)
DFNB38	6q26-q27	?	(Ansar e col., 2003a)
DFNB39	7q11.22-q21.12	?	(Wajid e col., 2003)
DFNB40	22q	?	(Delmaghani e col., 2003)
DFNB42	3q13.31-q22.3	?	(Aslam e col., 2005)
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	2p25.1-p24.3	?	(Hassan e col., 2006)
DFNB48	15q23-q25.1	?	(Ahmad e col., 2005)
DFNB49	5q12.3-q14.1	<i>MARVELD2</i>	(Ramzan e col., 2005; Riazuddin e col., 2006)
DFNB50	12q23-qter	?	Não publicado – Entrez ID:404542
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)
DFNB57	10q23.1-q26.11	?	Não publicado – Entrez ID:606523

Continuação da **Tabela 2** - Relação de locos e genes identificados como responsáveis pela surdez não-sindrômica de herança autossômica recessiva.

Loco	Localização Cromossômica	Gene	Referências
DFNB58	2q14.2-q14.3	?	Não publicado – Entrez ID:619211
DFNB59	2q31.1-q31.3	<i>PJVK</i>	(Delmaghani e col., 2006)
DFNB60	5q22-q31	?	Não publicado – Entrez ID:503842
DFNB61	7q22.1	<i>SLC26A5</i>	(Zheng e col., 2000; Liu e col., 2003; Li e col., 2008)
DFNB62	12p13.2-p11.23	?	(Ali e col., 2006)
DFNB63	11q13.2-q13.4	<i>LRTOMT</i>	(Kalay e col., 2007; Tlili e col., 2007; Khan e col., 2007b; Ahmed e col., 2008)
DFNB65	20q13.2-q13.32	?	(Tariq e col., 2006)
DFNB66	6p21.2-22.3	<i>LHFPL5</i>	(Tlili e col., 2005; Shabbir e col., 2006; Kalay e col., 2006)
DFNB67	6p21.1-p22.3	<i>LHFPL5</i>	(Shabbir e col., 2006; Kalay e col., 2006)
DFNB68	19p13.2	?	(Santos e col., 2006; Ain e col., 2007b)
DFNB71	8p22-21.3	?	(Chishti e col., 2009)
DFNB72	19p13.3	?	(Ain e col., 2007a)
DFNB73	1p31	<i>BSND</i>	(Riazuddin e col., 2009)
DFNB74	12q14.2-q15	?	(Waryah e col., 2009)
DFNB77	18q12.q21	<i>LOXHD1</i>	(Grillet e col., 2009)
DFNB79	9q34.3	?	(Khan e col., 2010)

I. 4.1.3 - Herança Ligada ao Cromossomo X

A contribuição da herança ligada ao X em casos de surdez não-sindrômica está estimada entre 1-5% (Petersen e col., 2008). As características dos diferentes locos mapeados no cromossomo X estão apresentadas na Tabela 3. Exceto pelo loco DFN3, caracterizado pela surdez condutiva-sensorineural, todas as formas ligadas ao X são sensorineurais. A maioria dos indivíduos apresenta surdez progressiva, grave (severa) e em todas as frequências. O primeiro loco mapeado no cromossomo X, DFN1, foi

posteriormente definido como responsável pela síndrome **Mohr-Tranebjaerg** (OMIM 304700). Os demais locos mapeados ligados ao X são: DFN2, DFN3, DFN4 e DFN6. Os locos DFN5 e DFN7 foram retirados (Petersen e col., 2008).

O loco DFN3 (OMIM 304400), mapeado em Xq21.1 é responsável por aproximadamente 50% do total de famílias com surdez ligada ao X. Nesse loco, está mapeado o gene *POU3F4* que codifica um fator de transcrição (Friedman e col., 1997; Vore e col., 2005). A surdez associada a esse loco está relacionada à fixação do estribo devido à perda de função do gene *POU3F4*.

O loco DFN2 (OMIM 304500) foi mapeado em Xq22 com base no estudo de três famílias com surdez sensorineural profunda (Tyson e col., 1996; Manolis e col., 1999; Cui e col., 2004). Entretanto, essas famílias apresentavam algumas diferenças clínicas como, por exemplo, a idade de manifestação da surdez.

O loco DFN4 (OMIM 300030) foi mapeado por meio do estudo de duas famílias que apresentavam surdez sensorineural de grave (severa) a profunda, na região Xp21.2, sobrepondo parcialmente à região do gene *DMD*.

Finalmente, o loco DFN6 (OMIM 300066) foi mapeado em Xp22 em uma única família espanhola com surdez sensorineural (Del Castillo e col., 1996). Supõe-se que mutações no gene *TBLIX*, distal ao intervalo de ligação do DFN6, causariam surdez no final da 3ª década de vida (Winship e col., 1993).

I. 4.1.4 – Herança Ligada ao Cromossomo Y

Uma família com vários afetados por surdez sensorineural, de leve a grave (severa), pós-lingual e progressiva foi descrita por Wang e col. (Wang e col., 2004). No estudo de sete gerações dessa família, a surdez estava presente somente nos homens, com alta penetrância (91%). Os autores propuseram a existência de um loco no cromossomo Y (DFNY1) (Tabela 4), sugerindo como candidato o gene *PCDH11Y*. No entanto, análise desse gene não detectou mutações. Outro gene candidato é o *TBL1Y* que tem função

Tabela 3 - Locos mapeados ligados aos cromossomos X e Y relacionados à surdez hereditária não- síndrômica
(modificado de Petersen e col., 2008 e da *Hereditary Hearing Loss Home Page*).

Locos (antiga classificação)	Locos (nova classificação)	Localização cromossômica	Gene	Herança	OMIM	Referências
Cromossomo X						
DFN1	sindrômica	Xq21	<i>TIMM8A</i>	recessiva	304700	(Jin e col., 1996; Tranebjaerg e col., 2001)
DFN2	DFNX1	Xq22-q24	<i>PRPS1</i>	recessiva	304500	(Tyson e col., 1996; Ain e col., 2007a; Liu e col., 2010)
DFN3	DFNX2	Xq21.1	<i>POU3F4</i>	recessiva	304400	(de Kok e col., 1995)
DFN4	DFNX3	Xp21.2	?	dominante	300030	(Lalwani e col., 1994)
DFN5	retirado					
DFN6	DFNX4	Xp22	?	dominante	300066	(del Castillo e col., 1996)
DFN7	retirado					
AUNX1	DFNX5	Xq23-q27.3	?	recessiva	%300614	(Wang e col., 2006)
Cromossomo Y						
	DFNY1	Y	?			(Wang e col., 2004)

homóloga ao gene *TBL1X*, no cromossomo X (Petersen e col., 2008) que estaria associado à surdez síndrômica e não-síndrômica. Por enquanto, não se conhece o gene do loco DFNY1.

I. 4.1.5 - Herança Mitocondrial

Em 1993 foi descrito o primeiro defeito molecular responsável por surdez hereditária não-síndrômica, uma mutação mitocondrial (Fischel-Ghodsian e col., 1993). Desde então, várias mutações no DNA mitocondrial (DNAmt) foram identificadas, associadas tanto à surdez síndrômica como não-síndrômica. Como já discutido, a surdez associada a mutações mitocondriais apresenta grande variação quanto à gravidade e à idade de manifestação, mesmo em uma mesma família. A primeira e mais importante mutação mitocondrial a ser associada com surdez não-síndrômica foi descrita em uma grande família árabe-israelense. Trata-se da mutação A1555G no gene *MTRN1*, que ocorre devido à substituição de uma adenina por uma guanina na posição 1555, cujo gene codifica a subunidade maior do RNAr 12S (Prezant e col., 1993) (Tabela 4). Embora a maioria dos indivíduos portadores dessa mutação em homoplasma dessa família apresentasse surdez de grave a profunda desde a infância, alguns membros manifestavam surdez somente na idade adulta, ou eram até mesmo normais para a audição.

Apesar da mutação A1555G no gene *MTRN1* ter sido inicialmente considerada responsável por surdez, estudos posteriores indicaram que a mutação por si só às vezes é insuficiente para produzir o fenótipo de surdez. É possível que genes nucleares ou outros fatores modificadores interfiram nas manifestações fenotípicas da mutação, interagindo com ela por meio de supressão ou modulando seu efeito. O aspecto mais notável relacionado a essa mutação é que os indivíduos portadores muitas vezes manifestaram a surdez após a administração de aminoglicosídeos, como canamicina, estreptomicina, gentamicina e outros (Kokotas e col., 2007; Bindu e Reddy, 2008), ou seja, ela está relacionada à susceptibilidade aumentada à perda auditiva em virtude dos aminoglicosídeos.

Tabela 4 – Mutações em genes mitocondriais associadas à surdez hereditária síndrome e não-síndrome
(modificado de Lévêque e col., 2007 e da *Hereditary Hearing Loss Home Page*).

Surdez	Mutações	Gene	Homo ou Hetero	MITOMAP	Referências
Síndrome					
MELAS	A3243G	tRNA leu(UUR)	Hetero	confirmado	(Goto e col., 1990; van den Ouweland e col., 1992)
NARP (síndrome Leigh)	T8993C/G	ATPase 6	Hetero	confirmado	(Chinnery e Turnbull, 2000; Chinnery e col., 2000)
Miocardio-patia e surdez	G8363A	tRNA lis	Hetero	confirmado	(Santorelli e col., 1996)
Diabete-surdez	A3243G	tRNA leu1(UUR)	Hetero	confirmado	(Kadowaki e col., 1994)
	A8296G	tRNA lis	Hetero	provisório	(Kameoka e col., 1998)
	T14709C	tRNA glu	Hetero	confirmado	(Hao e col., 1995; Vialettes e col., 1997)
Queratite palmoplantar e surdez	A7445G	Transição tRNA ser 1 - COX1	Homo	confirmado	(Reid e col., 1994; Sevier e col., 1998) (Fischel-Ghodsian e col., 1995)

MELAS = Miopatia mitocondrial, encefalopatia, acidose láctica e episódios tipo AVC; NARP = **N**eurogenia muscular, **A**taxia e **R**etinite **P**igmentosa; Homo = Homoplasmia; Hetero = Heteroplasmia; MITOMAP = *A Human Mitochondrial Genome Database*.

Cont. da **Tabela 4** - Mutações em genes mitocondriais associadas à surdez hereditária síndrômica e não-síndrômica (modificado de Lévêque e col., 2007 e da *Hereditary Hearing Loss Home Page*).

Surdez	Mutações	Gene	Homo ou Hetero	MITOMAP	Referências
Não-síndrômica					
	T1095C	rRNA 12S	Homo	provisório	(Thyagarajan e col., 2000; Tessa e col., 2001)
	A1555G	rRNA 12S	Homo	confirmado	(Prezant e col., 1993; Hutchin e col., 1993; Fischel-Ghodsian e col., 1995; Braverman e col., 1996; Matthijs e col., 1996; Gardner e col., 1997; Pandya e col., 1997; el-Schahawi e col., 1997; Estivill e col., 1998; Friedman e col., 1999)
	A7445G	Transição tRNA ser 1 - COX1	Homo	confirmado	(Thirlwall e col., 2003; Tekin e col., 2003)
	7472insC	tRNA ser1 (UCN)	Homo/Hetero	confirmado	(Tiranti e col., 1995; Ensink e col., 1998; Verhoeven e col., 1999; Hutchin e col., 2001)

MELAS = Miopatia mitocondrial, encefalopatia, acidose láctica e episódios tipo AVC; NARP = Neurogenia muscular, Ataxia e Retinite Pigmentosa; Homo = homoplasmia; Hetero = heteroplasmia; MITOMAP = *A Human Mitochondrial Genome Database*.

Cont. da **Tabela 4** - Mutações em genes mitocondriais associadas à surdez hereditária síndrômica e não-sindrômica (modificado de Lévêque e col., 2007 e da *Hereditary Hearing Loss Home Page*).

Surdez	Mutações	Gene	Homo ou Hetero	MITOMAP	Referências
Espontânea	T7510C	tRNA ser 1 (UCN)	hetero	provisório	(Hutchin e col., 2000; del Castillo e col., 2002)
	T7511C	tRNA ser 1 (UCN)	homo/hetero	confirmado	(Sue e col., 1999; Ishikawa e col., 2002; Chapiro e col., 2002)
	G7444A	Transição tRNA ser 1 - COX1	homo	provisório	(Yuan e col., 2005)
Ototóxico	A1555G	rRNA 12S	homo	confirmado	(Fischel-Ghodsian e col., 1993; Hutchin e col., 1993)
	C1494T	rRNA 12S	homo	confirmado	(Zhao e col., 2004b)
	delT961 Cn	rRNA 12S	hetero	provisório	(Bacino e col., 1995; Casano e col., 1999)
	T961G	rRNA 12S	homo	provisório	(Bacino e col., 1995; Casano e col., 1999)
	A827G	rRNA 12S	homo	provisório	(Anderson e col., 1981)

MELAS = Miopatia mitocondrial, encefalopatia, acidose láctica e episódios tipo AVC; NARP = **N**eurogenia muscular, **A**taxia e **R**etinite **P**igmentosa; Homo = homoplasmia; Hetero = heteroplasmia; MITOMAP = A Human Mitochondrial Genome Database.

Outras mutações como: A7445G, 7472insC, T7510C e T7511C no gene do *tRNA^{ser} (UCN)* (Tabela 4) estão relacionadas com a surdez não-sindrômica. Entretanto, parte dos pacientes com as mutações A7445G e 7472insC podem apresentar além da surdez, outras manifestações clínicas como queratoderma palmoplantar (Sevior e col., 1998) e ataxiaemioclonia (Tiranti e col., 1995), respectivamente. Portanto, as mutações A7445G e 742insC podem estar associadas à surdez sindrômica (Tabela 4).

I. 4.2 - Surdez sindrômica

Apesar do enorme número de síndromes descritas que incluem a surdez como um dos sinais clínicos presentes, um pouco mais que 400 síndromes, apenas 30% dos casos de surdez hereditária são sindrômicos. A seguir serão destacadas apenas algumas das síndromes que apresentam a surdez como principal manifestação clínica. Essas síndromes podem ter padrão de herança autossômico dominante, autossômico recessivo ou ligado ao cromossomo X (Tabela 5). Nos tópicos seguintes estão destacadas as síndromes mais representativas para cada tipo de herança.

I. 4.2.1 - Herança Autossômica Dominante

Síndrome de Waardenburg (WS) - É a mais comum das síndromes de surdez sindrômica autossômica dominante. Além da surdez sensorineural, é caracterizada pela presença de distúrbios de pigmentação de pele e cabelos, heterocromia de íris e telecanto. São descritos quatro tipos clínicos da síndrome de Waardenburg, com base nas características clínicas: o WS1 (Tipo I Waardenburg - OMIM 193500) difere do tipo II (WS2-OMIM 193519) pela ausência de telecanto. O WS3 ou síndrome Klein-Waardenburg (Tipo III - OMIM 148820) apresenta adicionalmente às características do tipo I a hipoplasia dos músculos e defeito dos membros superiores. O fenótipo do WS4 ou síndrome Shah-Waardenburg (Tipo IV - OMIM 277580) é uma combinação do tipo II com a doença Hirschsprung ou megacolo congênito. Mutações no gene *PAX3*, mapeado na banda 2q35, do cromossomo 2, causam o tipo I (WS1). O tipo II (WS2) é heterogêneo. Somente um gene foi identificado para

o tipo II (WS2), o gene *MITF*. Esse gene está localizado no cromossomo 3 (banda 3p12) que é controlado pelo *PAX3*, o que provavelmente explica a similaridade entre os fenótipos WS1 e WS2. Sanchez-Martín e col. (Sanchez-Martin e col., 2002) demonstraram em dois indivíduos não relacionados com WS2 deleções em homozigose no gene *SLUG* (*SNAI2*) (OMIM #608890), localizado no cromossomo 8q11, sendo este o gene candidato para o tipo IID (WS2D). O telecanto provavelmente resulta da ação independente do *PAX3* no desenvolvimento dos ossos crânio-faciais. Mutações nos genes *EDNRB*, *EDN3* e *SOX10* causam o tipo IV WS4.

Síndrome branquio-oto-renal (BOR) (OMIM 113650) – É a segunda forma mais comum de surdez sindrômica autossômica dominante. A surdez pode ser condutiva, sensorineural ou mista e ocorrer em associação com defeitos craniofaciais e renais. Em aproximadamente 40% dos casos, ocorrem mutações no gene *EYA1*. A penetrância é alta, mas a expressividade é extremamente variável. Em outras famílias, mutações foram descritas no gene *SIX1* (Ruf e col., 2004) e *SIX5* (Hoskins e col., 2007). Entretanto, foram também descritos casos com fenótipo BOR sem mutações nesses genes (Kochhar e col., 2007).

Síndrome de Stickler – Trata-se de uma surdez sensorineural progressiva, com fenda palatina e displasia "*spondyloepiphyseal*", resultando em osteoartrite. São reconhecidos três tipos: STL1(*COL2A1*) (OMIM 108300), STL2 (*COL11A1*) (OMIM 604841) e STL3 (*COL11A2*) (OMIM 184840). Os pacientes com STL1 e STL2 apresentam miopia severa com predisposição ao descolamento de retina. O tipo STL1 está associado a mutações no gene *COL2A1*, um colágeno fibrilar, enquanto que o tipo STL2 é causado por mutações em *COL11A1*. Já o STL3 é devido a mutações no gene *COL11A2*. Como o gene *COL11A2* não é expresso nos olhos, pacientes com STL3 não apresentam miopia e alterações na retina.

Neurofibromatose 2 (NF2) (OMIM 607379) – A surdez geralmente inicia-se na 3ª década, como consequência de tumores do 8º par craniano (neurinoma do acústico ou auditivo). Os indivíduos afetados estão mais

Tabela 5 – Algumas síndromes hereditárias que incluem surdez como sinal clínico.

Síndrome	Loco	Localização cromossômica	Gene	Herança	OMIM	Referências
Alport		Xq22	<i>COL4A5</i>	LXR	301050	(Barker e col., 1990)
		2q36q37	<i>COL4A3/COL4A4</i>	AR	203780	(Mochizuki e col., 1994)
Branchio-oto-renal	BOR1	8q13.3	<i>EYA</i>	AD	113650	(Abdelhak e col., 1997)
	BOR2	19q13.3	<i>SIX5</i>	AD	610896	(Hoskins e col., 2007)
	?	1q31	?	AD		(Kumar e col., 2000)
	BOS3	14q21.3q24.3	<i>SIX1</i>	AD	608389	(Ruf e col., 2003; Ruf e col., 2004)
Jervell e Lange Nielsen	JLNS1	11p15.5	<i>KCNO1</i>	AR	192500	(Neyroud e col., 1997)
	JLNS2	21q22.1-q22.2	<i>KCNE1</i>	AR	176261	(Tyson e col., 1997; Schulze-Bahr e col., 1997)
Doença de Norrie	NDP	Xp11.3	<i>NDP</i>	LXR	310600	(Chen e col., 1992; Berger e col., 1992)
Pendred	PDS	7q21q34	<i>SLC26A4</i>	AR	SLC26A4	(Everett e col., 1997)
	PDS	5q35.1	<i>FOXI1</i>	AR	FOXI1	(Yang e col., 2007a)
Stickler	STL1	12q13.11-q13.2	<i>COL2A1</i>	AD	108300	(Ahmad e col., 1991)
	STL2	1p21	<i>COL11A1</i>	AD	604841	(Richards e col., 1996)
	STL3	6p21.3	<i>COL11A2</i>	AD	184840	(Vikkula e col., 1995)
		6q13	<i>COL9A1</i>	AD		(Van Camp e col., 2006)
Treacher Collins	TCOF1	5q32q33.1	<i>TCOF1</i>	AR	154500	(Dixon, 1996)

AR = Autossômica Recessiva; AD Autossômica Dominante; LXR = Ligada ao X Recessiva.

Continuação da **Tabela 5** – Algumas síndromes hereditárias que incluem surdez como sinal clínico.

Síndrome	Loco	Localização cromossômica	Gene	Herança	OMIM	Referências
Usher						
Tipo 1	USH1A*	14q32	?	AR	276900	(Kaplan e col., 1992; Gerber e col., 2006)
	USH1B	11q13.5	<i>MYO7A</i>	AR	276903	(Weil e col., 1995)
	USH1C	11p15.3	<i>USH1C</i>	AR	276904	(Smith e col., 1992; Verpy e col., 2000; Bitner-Glindzicz e col., 2000)
	USH1D	10q22.1	<i>CDH23</i>	AR	601067	(Wayne e col., 1996; Bork e col., 2001; Bolz e col., 2001)
	USH1E	21q21	?	AR	602097	(Chaib e col., 1997)
	USH1F	10q21q22	<i>PCDH25</i>	AR	602083	(Ahmed e col., 2001; Alagramam e col., 2001)
	USH1G	17q24q25	<i>SANS</i>	AR	606943	(Mustapha e col., 2002b; Weil e col., 2003)
Tipo 2	USH2A	1q41	<i>USH2A</i>	AR	276901	(Kimberling e col., 1990; Eudy e col., 1998)
	USH2B	3p23p24.2	?	AR	276905	(Hmani e col., 1999)
	USH2C	5q14.3-q21.3	<i>VLGR1</i>	AR	605472	(Pieke-Dahl e col., 2000; Weston e col., 2004)
	USH2D	9q32	<i>WHRN</i>	AR	611383	(Ebermann e col., 2007)
Tipo 3	USH3	3q21q35	<i>USH3</i>	AR	276902	(Sankila e col., 1995)
					606397	(Joensuu e col., 2001)

AR = Autossômica Recessiva; AD Autossômica Dominante; LXR = Ligada ao X Recessiva.

Continuação da **Tabela 5** – Algumas síndromes hereditárias que incluem surdez como sinal clínico.

Síndrome	Loco	Localização cromossômica	Gene	Herança	OMIM	Referências
Waardenburg						
Tipo I	WS1	2q35	PAX3	AD	193500	(Tassabehji e col., 1992)
Tipo IIA	WS2A	3p14.1p12.3	MITF	AD	193510	(Tassabehji e col., 1994)
Tipo IIB	WS2B	1p21p13.3	?	AD	600193	(Farrer e col., 1994)
Tipo IIC	WS2C	8p23	?	AD	606662	(Selicorni e col., 2002)
Tipo IID	WS2D	8q11	SNAI2	AD	608890	(Sanchez-Martin e col., 2002)
Tipo III	WS3	2q35	PAX3	AD	148820	(Hoth e col., 1993)
Tipo IV	WS4	13q22	EDNRB	AD	131244	(Attie e col., 1995)
	WS4	20q13.2q13.2	EDN3	AD	131242	(Edery e col., 1996)
	WS4	22q13	SOX10	AD	602229	(Pingault e col., 1998)

AR = Autossômica Recessiva; AD Autossômica Dominante; LXR = Ligada ao X Recessiva.

predispostos a uma variedade de tumores, incluindo: meningiomas, astrocitomas,ependimomas e meningioangiomatose. Membros das famílias portadoras de mutações no gene *neurofibromina 2 (merlin)* ou *NF2* do cromossomo 22q12.2), podem ser diagnosticados e monitorados precocemente.

I. 4.2.2 - Herança Autossômica Recessiva

Síndrome de Usher – É a mais comum das formas de surdez sindrômica autossômica recessiva, caracterizada por estar associada à retinite pigmentosa. Existem três subtipos I, II e III, classificados de acordo com a gravidade e evolução da surdez e pela presença ou ausência de função do sistema vestibular. Até o momento, 12 locos já foram mapeados para o tipo I (OMIM 276900) - *USH1A* e *USH1B*; *USH1C*; *USH1D*, *USH1E* e *USH1F*; dois para o tipo II (OMIM 276901) - *USH2A* e *USH2C* e um loco para o tipo III (*USH3* – OMIM 276902), podendo apresentar herança autossômica recessiva, autossômica dominante (OMIM # 604717) ou ligada ao X (OMIM #300455).

Síndrome de Pendred (OMIM 274600) – É a segunda forma mais comum da surdez sindrômica autossômica recessiva. Essa síndrome é caracterizada pela presença de bócio e surdez sensorineural, geralmente variando de grave (severa) a profunda. O bócio não está presente ao nascimento, desenvolvendo-se no início da puberdade (40%) ou na fase adulta (60%). Mutações no gene *SLC26A4* foram identificadas em aproximadamente 50% das famílias com síndrome de Pendred, embora mutações nesse gene possam também causar surdez não-sindrômica autossômica recessiva (DFNB4) (Baldwin e col., 1995; Li e col., 1998). Podem ocorrer malformações como displasia de Mondini e alargamento do aqueduto vestibular (Reardon e col., 2000).

Síndrome Jervell e Lange-Nielsen – (OMIM 220400) – É a terceira forma mais comum de síndrome de surdez sindrômica autossômica recessiva. Esta síndrome consiste de surdez congênita e prolongação do intervalo de QT detectada por eletrocardiograma. Os indivíduos afetados apresentam episódios de síncope e podem ter morte súbita. A forma do tipo I (JNLS1) é causada por

mutações no gene *KCNQ1*, enquanto a tipo II (JLNS2) por mutações no gene *KCNE1*.

Síndrome de Wolfram (OMIM #222300) colocaliza com locos DFNA6/DFNA14/DFNA38 e é uma síndrome rara de herança autossômica recessiva neurodegenerativa progressiva, que inclui entre seus sintomas diabetes *insipidus*, diabetes *mellitus*, atrofia ótica e surdez sensorineural. A síndrome de Wolfram é geneticamente heterogênea, porém mutações ocorrem frequentemente nos genes *WFS1* (4p18) ou *WFS2* (4q22-24) (revisão de (Finsterer e Fellingner 2005)). As mutações que ocorrem no *WFS1* estão distribuídas ao longo de todo o gene, inativando o produto gênico, uma glicoproteína de 100.3 kDa, localizada no retículo endoplasmático. Os indivíduos que têm mutações nos locos DFNA6/14/38 apresentam surdez moderada, bilateral e em baixas frequências (Hone e Smith, 2003). As mutações desses locos são do tipo *missense* heterozigota e, ao contrário das mutações que causam a síndrome de Wolfram, não inativam o produto gênico.

I. 4.2.3 - Herança Ligada ao Cromossomo X

Síndrome de Alport – Esta síndrome é caracterizada pela combinação de glomerulonefrite e surdez, frequentemente sensorineural. É geneticamente heterogênea, podendo apresentar padrão de herança autossômica dominante (OMIM #104200), recessiva (OMIM #203780) ou ligada ao X (OMIM #301050). Estudos imunológicos em biópsias renais de indivíduos com síndrome de Alport demonstraram anormalidades na membrana basal glomerular renal da terceira (*COL4A3*), quarta (*COL4A4*) e quinta (*COL4A5*) cadeia alfa do colágeno tipo IV. A maioria dos casos apresenta padrão de herança ligada ao X (Flinter e col., 1988; Flinter e Bobrow, 1988). O gene *COL4A5* foi mapeado no cromossomo X (Hostikka e col., 1990) e seu papel na síndrome foi confirmado pela identificação de mutações em indivíduos afetados (Barker e col., 1990). Além disso, mutações têm sido também detectadas nos genes *COL4A3* e *COL4A4*, ambos localizados no cromossomo 2, em indivíduos com síndrome de Alport de herança autossômica recessiva (Keats, 2002).

Síndrome de Mohr-Tranebjaerg – Foi descrita primeiramente em uma família como surdez não-sindrômica (OMIM 304700), progressiva e pós-lingual. A reavaliação dessa família revelou a presença de distúrbio visual, distonia, fraturas e danos mentais de manifestação tardia e progressiva. O loco dessa síndrome foi mapeado no cromossomo X (DFN1) e o gene descrito, *TIMM8A* (Tabela 3), de padrão herança recessiva, envolvido no transporte de proteínas do citoplasma, através da membrana interna da mitocôndria, para a matriz mitocondrial (Tranebjaerg e col., 1995; Jin e col., 1996).

I. 4.2.4 - Herança Mitocondrial

Uma variedade de doenças está associada a mutações no DNA mitocondrial. Essas incluem, além de surdez, síndromes neuromusculares raras, como: Kearns-Sayre MELAS (miopatia mitocondrial com encefalopatia, acidose láctica e surtos similares) e MERRF (Epilepsia mioclônica com fibras vermelhas puídas), síndrome de Pearson e diabetes (Tabela 4). As manifestações clínicas das mutações mitocondriais dependem da porcentagem e distribuição das mitocôndrias com mutações.

I. 5 - As ferramentas de investigação cromossômica

Apesar de todo o desenvolvimento das técnicas moleculares, restam ainda muitos genes a serem identificados, tanto relacionados à surdez sindrômica como não-sindrômica. A detecção de alterações genômicas em pacientes com surdez idiopática abre caminho para a identificação de novos genes relacionados à audição e poderá fornecer base para o diagnóstico, prognóstico e aconselhamento genético para pacientes com deficiência auditiva e seus familiares.

I. 5.1- Citogenética Clássica

A Citogenética Humana teve início com os trabalhos de Arnold em 1879 e Fleming em 1882, que primeiramente observaram cromossomos mitóticos humanos. A partir daí, surgiram vários trabalhos que procuraram estimar o número de cromossomos humanos, dentre os quais se destaca o de Painter, em 1923, que descreveu que o cariótipo humano continha 48 cromossomos. Outros relatos confirmaram esse número. As limitações técnicas, como o uso de cortes histológicos e a dificuldade de analisar cromossomos sobrepostos ou aglomerados fizeram com que essa estimativa permanecesse como válida por três décadas (revisão (Trask, 2002)). Em 1956, devido à combinação de solução hipotônica e colchicina na preparação cromossômica, Tjio e Levan obtiveram preparações metafásicas melhores e estimaram como 46 o número de cromossomos em fibroblastos de pulmão (Tjio e Levan, 1956). Esses resultados abriram caminho para o desenvolvimento da citogenética humana e primeiros relatos de cariótipos humanos anormais. Em 1959, Lejeune e cols. descreveram a presença de um cromossomo pequeno adicional no cariótipo de nove crianças com síndrome de Down, a trissomia do cromossomo 21 (Lejeune e col., 1959). Os trabalhos subsequentes descreveram anormalidades de número de cromossomos sexuais, especificamente, a presença de um cromossomo X extranumerário na síndrome de Klinefelter (Jacobs e Strong,

1959) e o cariótipo com 45 cromossomos, contendo apenas um cromossomo X na síndrome de Turner (Ford e col., 1959).

Em 1960, Nowell descobriu que fitohemaglutinina (PHA) estimulava a divisão de linfócitos em cultura (Nowell, 1960). Esse achado adicional permitiu a Moorhead e col. (Moorhead e col., 1960) descreverem método de preparação de cromossomos combinando culturas de linfócitos contendo PHA e acúmulo e espalhamento dos cromossomos em metáfase com o uso de colchicina e solução hipotônica respectivamente, seguidos por fixação com metanol-ácido acético e coloração com Giemsa. Esse protocolo muito menos invasivo facilitou a identificação de outras duas trissomias autossômicas, a do cromossomo 13, síndrome de Patau (Patau e col., 1960), e a do cromossomo 18, síndrome de Edwards (Edwards e col., 1960). Ainda em 1960, Nowell e Hungerford descreveram um “cromossomo minuto” (o cromossomo Philadelphia) em leucemia mieloide crônica (LMC) (Nowell e Hungerford, 1960), demonstrado por Rowley em 1973 ser resultante de uma translocação entre os cromossomos 9 e 22 (Rowley, 1973).

Em 1968, Caspersson e colaboradores (revisão em (Trask 2002)) demonstraram que cada cromossomo apresentava um padrão distinto de bandas após a coloração fluorescente com quinacrina mostarda (banda Q). Outros métodos para obtenção de bandas foram descritos subsequentemente. A banda G, em que emprega digestão com tripsina seguida de coloração com Giemsa, não requer fluorescência e é o procedimento mais usado em diagnóstico clínico até hoje. As bandas R (reversas) são decorrentes de uma desnaturação controlada por aquecimento, e têm o padrão “negativo” da banda G (banda escura em vez de clara e vice-versa). As bandas C revelam a presença de heterocromatina constitutiva e estão situadas, sobretudo, nas regiões pericentroméricas dos cromossomos humanos, mais acentuadamente na região pericentromérica dos cromossomos 1, 9, 16 e braço longo do Y. As bandas T (teloméricas) evidenciam as regiões teloméricas dos cromossomos (ISCN,2009). Em 1981, Yunis descreveu um método para estudar os cromossomos humanos com alta resolução (ao redor de 2.000 bandas), usando preparações prometáfásicas, quando os cromossomos estão apenas na fase inicial de condensação, permitindo descrever anormalidades raras e sutis do genoma humano.

Com as técnicas de bandas e de maior resolução (de 800 a 2.000 bandas) tornou-se possível identificar algumas anormalidades cromossômicas estruturais associadas a fenótipos característicos e resultantes de desequilíbrio de dosagem de segmentos cromossômicos específicos. Síndromes de múltiplas malformações causadas por deleções ou duplicações de regiões genômicas têm sido identificadas em pacientes com alterações cromossômicas visíveis (Shaffer e col., 2007).

A análise cromossômica por bandamento permanece até hoje como um dos exames genéticos mais comuns realizados para diagnóstico, tanto na área de obstetrícia/ginecologia, como na pediatria e oncologia. Porém, uma importante limitação dessa técnica é a necessidade de se cultivar células, o que aumenta consideravelmente o tempo necessário para obtenção do diagnóstico (cerca de três dias para linfócitos e 1-2 semanas para amostras fetais de líquido amniótico ou vilosidade coriônica). Além disso, a análise cromossômica é trabalhosa e requer treinamento extensivo. Outra limitação de análise por bandamento é a impossibilidade de detectar rearranjos menores que 4-10 Mb (revisão em (Shaffer e Bejjani, 2004; Gouas e col., 2008). A técnica de hibridação *in situ* fluorescente, discutida a seguir, conseguiu superar os limites de resolução da citogenética clássica.

I. 5.2 – Hibridação “*in situ*” fluorescente - FISH

Aneuploidias cromossômicas (ganho ou perda de cromossomos) e aberrações estruturais (deleções, duplicações, translocações, inversões ou cromossomos marcadores) são causas frequentes de anormalidades congênitas, distúrbios, alterações de crescimento e comportamento e abortos.

A análise citogenética clássica pode identificar tanto anormalidades numéricas quanto estruturais. Entretanto, a análise de cariótipo com bandamento, mesmo que de alta resolução (800-1200 bandas), não detecta rearranjos cromossômicos tênues (menores que aproximadamente 4-10 Mb) (revisão em (Shaffer e Bejjani 2004; Gouas e col., 2008). Para suprir a limitação

de resolução da citogenética clássica, algumas novas técnicas foram incorporadas à análise cromossômica.

Métodos não isotópicos de hibridação *in situ* foram desenvolvidos entre os anos de 1980 e 1990 para detectar alterações submicroscópicas. O método mais comum é a hibridação *in situ* fluorescente (FISH) em que segmentos relativamente grandes de DNA humano (geralmente > 40 kb) são clonados em uma variedade de vetores, como cosmídios, cromossomos bacterianos artificiais (BAC's), cromossomos artificiais derivados de P1- (PAC's) ou cromossomos de levedura artificiais (YAC's), marcados e usados como sonda para hibridar com regiões cromossômicas humanas de sequências complementares (revisão de (Shaffer e Bejjani 2004)). Segmentos menores de DNA (~ 3kb) são também usados após clonagem em plasmídeos; esses segmentos hibridam em regiões alvo maiores, com várias cópias (por exemplo, sequências alfoides que hibridam com centrômeros específicos) ou uma coleção desses segmentos cobrindo um cromossomo ou região (bibliotecas) são hibridados em conjunto.

A aplicação de FISH no cenário clínico inclui triagem de aneuploidias em amostras de líquido amniótico, vilosidade coriônica, assim como em amostras de sangue e tumor. As alterações estruturais cujo valor diagnóstico em pacientes com anomalias congênitas ou retardo mental já é conhecido incluem síndrome de microdeleções de gene contíguos e rearranjos em regiões subteloméricas. Os rearranjos envolvendo genes associados às leucemias e linfomas, como os genes *P53* ou *ATM*, funcionam como marcadores de diagnóstico, prognóstico e de melhor conduta terapêutica. O FISH também pode ser usado em interfases, em material não cultivado, para detectar anormalidades como a amplificação de genes (por exemplo, amplificação de *HER2* em câncer de mama) (Bejjani e Shaffer, 2008; Gouas e col., 2008).

O uso de FISH em metáfases permite determinar o número e a localização de sequências específicas de DNA. A técnica de hibridação *in situ* fluorescente é de elevada especificidade e sensibilidade, permitindo visualizar rotineiramente fragmentos de DNA maiores que ~40 Kb mediante sua marcação e posterior análise ao microscópio de fluorescência. O princípio desta metodologia está baseado na capacidade da fita simples de DNA se hibridar ao DNA complementar. Assim, um grande número de cópias de

sequências específicas de DNA são desnaturadas e usadas como sondas para reconhecer e hibridar uma sequência específica complementar desnaturada de DNA. Essa interação forma o complexo sonda-DNA complementar, detectado pela incorporação direta de fluorocromos ao DNA (isotiocianato fluoresceína – FITC, isotiocianato Texas Red – TRITC, rodamina, SpectrumOrange, SpectrumGreen) ou por meio de marcação com haptenos (biotina, digoxigenina) seguida de detecção imunohistoquímica.

No método de FISH, uma variedade de tipos de sondas é usada para investigar segmentos genômicos específicos. Por exemplo: sondas de sequência única para identificar deleções ou duplicações associadas com síndromes de genes contíguos ou outras síndromes causadas por microrrearranjos de único loco; sonda de sequência única repetitiva para centrômero, que possibilita identificar o número de cópias de cromossomos específicos ou a origem de pequenos cromossomos supranumerários (marcadores); bibliotecas de sondas, que consistem em uma coleção de sondas que hibridam em um cromossomo ou região cromossômica (pintura cromossômica), úteis para identificar a origem do material em translocações ou outros rearranjos complexos (Bejjani e Shaffer 2008).

Apesar da sua alta resolução, FISH é limitado no número de sondas que podem ser simultaneamente investigadas, que por sua vez é limitado pelo número de fluorocromos (ou combinações entre eles) que podem ser discernidas. Portanto, a escolha da sonda a ser usada está vinculada à presença de características clínicas sugestivas de uma síndrome de etiologia conhecida, ou a alguma anormalidade detectada no cariótipo que requer melhor caracterização molecular (Bejjani e Shaffer 2008). Isto ocorre porque as sondas de FISH revelam ganho, perdas ou rearranjos apenas dos segmentos específicos investigados, não proporcionando nenhuma outra informação do genoma restante.

A introdução de técnicas citogenéticas moleculares (FISH) trouxe um grande avanço na detecção e identificação de rearranjos cromossômicos e elucidou as bases citogenéticas de síndromes conhecidas. Por exemplo, a síndrome de Williams-Beuren (OMIM #194050) havia sido descrita clinicamente em 1961 por Williams e col. e também por Beuren, 1961, mas somente em 1993, Ewart e col., usando FISH, descreveram que a hemizigose do gene da

elastina (ELN), no cromossomo 7 (7q11.23), estava associada aos defeitos cardíacos nos pacientes com essa síndrome. Assim, investigações posteriores em pacientes com síndrome de Williams-Beuren demonstraram que a microdeleção de 7q11.23 está presente em mais de 90% desses pacientes (Ewart e col., 1993; Lowery e col., 1995; Nickerson e col., 1995). A partir daí outros métodos surgiram baseados em FISH, entre eles o cariótipo espectral (SKY) (Liyana e col., 1996) e multicolor FISH (m-FISH) (Uhrig e col., 1999), que por combinação de fluorocromos permitem identificar cada um dos 23 pares de cromossomos, e a hibridação comparativa genômica (CGH).

I. 5.3 – Hibridação comparativa de genomas em *arrays* (aCGH)

A técnica de hibridação comparativa de genomas (CGH) foi descrita em 1992 (Kallioniemi e col., 1992) e era aplicada, sobretudo, na análise citogenética de tumores sólidos. Na CGH, utiliza-se o DNA ao invés de metáfases do material testado, superando uma das principais limitações do estudo citogenético de tumores sólidos que é a obtenção de metáfases para análise. O DNA de tumor (teste) e um DNA de controle normal (referência) são diferencialmente marcados e co-hibridados com cromossomos metafásicos de indivíduos normais. As intensidades de hibridação dos genomas teste e de referência são representadas em imagem digital e quantificadas. Através da comparação de intensidades dos dois DNAs nas diferentes regiões cromossômicas, CGH possibilita detectar alterações no número de cópias do DNA teste, ou seja, ganho ou perda de segmentos cromossômicos. Posteriormente, CGH foi também extensivamente aplicado para análise de material do qual se obtinha metáfases, porém cujo padrão de banda não permitia identificar a origem do material, isto é, cromossomos marcadores, material adicional e rearranjos não equilibrados (Levy e col., 1998). Porém, CGH apresenta duas importantes limitações: não detecta rearranjos equilibrados e apenas detecta deleções e duplicações de tamanho igual ou maior a alguns megabases: ≥ 5 Mb para deleções (Edelmann e Hirschhorn, 2009) e ≥ 2 Mb para o produto do número de cópias e tamanho do segmento genômico amplificado para duplicações (Piper e col., 1995).

A técnica de hibridação comparativa do genoma em *arrays* (*aCGH*) permite detectar simultaneamente alterações no número de cópias (deleções ou duplicações) em milhares de sequências alvo do genoma (Figura 4), com resolução muito maior que CGH. A técnica de *aCGH* utiliza como alvo de hibridação, em lugar dos cromossomos metafásicos utilizados para CGH, um conjunto de sondas organizadas em alta densidade em uma lâmina de vidro (Solinas-Toldo e col., 1997; Pinkel e col., 1998). A resolução do método é determinada pela distância genômica entre os clones e o tamanho dos fragmentos de DNA clonados. O DNA genômico que se pretende estudar (DNA teste) e o da amostra controle (DNA referência) são diferencialmente marcados em verde e vermelho, e hibridados ao *array* em presença de Cot1 DNA, que suprime as sequências repetitivas. Os sinais fluorescentes são capturados por um *laser scanner* e as intensidades de DNA em cada sequência alvo são quantificadas. As regiões com intensidades fluorescentes equivalentes aparecem como uma mistura dos DNAs teste e de referência, que resulta em amarelo, tendo um índice normalizado correspondente a 1.0. As regiões deletadas, detectadas em vermelho, apresentam um índice significativamente menor que 1.0; as regiões amplificadas, que aparecem em verde, apresentam índice significativamente superior a 1.0 (Carter e col., 2002; Vissers e col., 2003; Albertson e Pinkel, 2003; Flint e Knight, 2003; Oostlander e col., 2004). Atualmente, a escala logarítmica com base 2 é mais comumente utilizada, sendo o valor 1 na escala linear (quantidades semelhantes de DNAs teste e referência) correspondente a zero.

Os fragmentos clonados de DNA (100-200kb) que inicialmente substituíram os cromossomos metafásicos têm localização conhecida nos cromossomos e podem ser diretamente relacionados à sequência do genoma humano. A técnica de *aCGH* vem sendo utilizada nos últimos anos para o estudo de câncer por apresentar como vantagem, além da alta resolução, o fato de utilizar DNA e não necessitar de células em divisão. No entanto, vem também sendo muito utilizada em estudos de pacientes com retardo mental e anomalias congênitas. Publicações de nosso grupo e de outros demonstraram que aproximadamente 20% dos pacientes com cariótipo aparentemente normal apresentam deleções e duplicações menores do que a resolução da citogenética clássica (Vissers e col., 2003; Shaw-Smith e col., 2004; Rosenberg

e col., 2005). O *aCGH*, tem proporcionado a identificação de alterações no número de cópias de segmentos de DNA não visualizáveis ao microscópio em pacientes com atraso de desenvolvimento, retardo mental e/ou múltiplas anormalidades congênitas (Vissers e col., 2003; Shaw-Smith e col., 2004; Rosenberg e col., 2006b; Edelmann e Hirschhorn 2009). Em alguns casos, as alterações detectadas por *aCGH* levaram à identificação de genes responsáveis por síndromes, como nos casos das síndromes de Charge (Vissers e col., 2004) e de Peter-Plus (Lesnik Oberstein e col., 2006).

Ao se comparar o método *aCGH* com os métodos citogenéticos clássicos e moleculares, as vantagens mais significativas são: alta resolução e mapeamento preciso de alterações genômicas; realização em tempo menor por não requerer células cultivadas; investigação de todo o genoma, sem requerer conhecimento prévio da origem da alteração (revisão em (Shinawi e col., 2008)).

Por outro lado, há também desvantagens na tecnologia do *aCGH* quando comparada com técnicas citogenéticas, sendo as principais: impossibilidade de detectar rearranjos equilibrados (translocações, inversões e inserções) ou determinar a ploidia do genoma investigado. Segundo Edelmann e Hirschhorn (Edelmann e Hirschhorn 2009), *aCGH* envolve um conjunto de técnicas moleculares aplicáveis à citogenética e que requerem conhecimentos e aptidões das duas especialidades.

I. 5.3.1 – As plataformas de *aCGH*

As sondas-alvo de *array* são segmentos de DNA conhecidos e clonados em cromossomos artificiais bacterianos (BACs) ou P1(PAC), (de tamanho de 75-200 Kb) ou menores inseridos em cosmídeos (30 – 40 Kb), fasmídeos (40 – 50 Kb) ou plasmídeos (2-6 Kb). Podem também ser sintetizados, como no caso de oligonucleotídeos.

Os primeiros *arrays* foram construídos com plataformas de cosmídeos (Solinas-Toldo e col., 1997), substituídos em seguida por BACs (Pinkel e col., 1998). Devido ao grande tamanho das sondas, esses *arrays* possuem grande sensibilidade e os resultados podem facilmente ser validados por FISH. Porém, a produção de DNA de BACs é extremamente trabalhosa e a resolução está

limitada ao tamanho dos insertos, em geral ao redor de 100-120 Kb. Recentemente, os *arrays* de oligonucleotídeos (Albertson e Pinkel, 2003) têm possibilitado uma cobertura com maior resolução e abrangência do genoma humano (Shaikh, 2007).

Figura 4 – Ilustração da técnica de hibridação comparativa do genoma em *arrays* (aCGH): DNA teste marcado com um dinucleotídeo acoplado a fluorocromo Cy3 (verde) e DNA referência a fluorocromo Cy5 (vermelho) são misturados e precipitados na presença de Cot1 e hibridados em uma lâmina de vidro contendo um conjunto de sondas (*array*). Após aquisição e análise computacional das imagens, as intensidades de fluorescências são quantificadas para cada clone da lâmina: as intensidades equivalentes resultam em cor amarela (mistura de vermelho e verde); DNA teste com menor intensidade do que o DNA referência resulta em vermelho (área deletada); DNA teste com maior intensidade do que o DNA de referência resulta em verde (área duplicada). No gráfico, X=sondas de acordo com posição genômica. Y= log2 do teste/referência e eixo.

I. 5.3.2 – *aCGH* – aplicações, impacto na clínica e na variabilidade humana

Nos últimos anos, o uso de *aCGH* tem levado à descoberta de novas síndromes trazendo grande repercussão e revitalização da citogenética molecular na prática clínica e médica (Shaw-Smith e col., 2006; Koolen e col., 2006; Shaffer e col., 2007; Edelmann e Hirschhorn 2009).

Antes do advento do *aCGH*, as síndromes eram sobretudo determinadas com base no conjunto de sinais clínicos dos indivíduos afetados, e estudos citogenéticos ou moleculares algumas vezes conseguiam estabelecer uma etiologia em comum. A identificação e mapeamento das alterações genômicas eram geralmente demorados e laboriosos (Bejjani e Shaffer 2008).

Com a aplicação de *aCGH*, as causas de síndromes que incluem atraso de crescimento e/ou retardo mental puderam ser mais facilmente identificadas, especificamente as síndromes de microdeleções ou duplicações. Ao contrário do agrupamento baseado no fenótipo, *aCGH* promoveu a associação de alterações similares ou no mesmo loco a grupos de fenótipos mais variados, como nas síndromes de del17q21 (Shaw-Smith e col., 2006) ou DiGeorge/velocardiofacial (VCFS) (de La e col., 2006). Esses dados são compilados e disponibilizados em bancos de dados públicos, como por exemplo, DECIPHER (*DatabasE of Chromosomal Imbalance and Phenotype in Humans* usando as ferramentas do *Ensembl*), o que permite estabelecer uma correlação mais precisa dos achados clínicos com as alterações genômicas encontradas.

Fica claro que *aCGH* é um instrumento muito eficiente para identificar alterações genômicas ou variações no número de cópias de DNA diretamente relacionadas a fenótipos clínicos específicos. No entanto, resultados de *aCGH* têm demonstrado que genomas de indivíduos não aparentados diferem grandemente em relação ao número de cópias de sequências de DNA, designadas “copy number variants” (CNVs). Embora essa fonte de variação não fosse totalmente desconhecida, as dimensões dessa variabilidade só se tornaram evidentes em 2004, quando trabalhos independentes (Sebat e col., 2004; Iafrate e col., 2004; Tuzun e col., 2005) demonstraram pelo uso de diferentes plataformas de *aCGH* que genomas de indivíduos saudáveis apresentavam centenas de regiões genômicas que variavam significativamente

em número de cópias. Dois desses estudos demonstraram a presença de CNVs em larga escala analisando o genoma de indivíduos normais. Um desses estudos usou *array* de BACs com espaçamento genômico de 1 Mb entre os clones e identificou mais de 200 variações de loco em 39 indivíduos (lafrate e col., 2004), enquanto que o outro estudo, que usou plataforma de oligonucleotídeos com espaçamento de 32 kb entre as sondas, determinou 76 locos com CNV entre 20 indivíduos (Sebat e col., 2004). Demonstraram também que essas variações estruturais são geralmente herdadas e representam cerca de 12% do genoma.

O número e tamanho das CNVs detectadas em um indivíduo dependem do tamanho e densidade das sondas do *array* empregado. Estima-se que existam milhares dessas alterações no genoma, algumas das quais comuns, como as deleções polimórficas em genes específicos. Exemplos de CNVs comuns incluem aquelas contendo famílias de genes que codificam esteroides sexuais, metabolismo de drogas e receptores do olfato (lafrate e col., 2004; Tuzun e col., 2005). Outras CNVs podem ser detectadas na população geral, mas ser raras ou étnico-específicas.

Não está clara ainda a contribuição dos CNVs para a variabilidade genética. Entretanto, alguns estudos recentes têm descrito associação entre o aumento no número de cópias de alguns genes com susceptibilidade a doenças, como por exemplo, a susceptibilidade à infecção pelo vírus de HIV-1/AIDS. Alguns indivíduos soro-positivo para o vírus HIV-1 rapidamente desenvolvem a doença (AIDS), enquanto outros mantêm uma relativa estabilidade imunológica, não apresentando os sintomas da doença (Nakajima e col., 2008). Dados pioneiros de Gonzalez e col. (Gonzalez e col., 2005) avaliando mais que 4.000 indivíduos infectados determinaram a associação de CNV de segmento cromossômico contendo o gene *CCL3L1* e susceptibilidade ao HIV1-AIDS. O gene *CCL3L1*, localizado na região cromossômica 17q11.2, varia em número de cópias, de três a seis (Gonzalez e col., 2005). O número médio de cópias do gene *CCL3L1* varia em diferentes grupos étnicos e indivíduos que apresentam um pequeno número de cópias do gene *CCL3L1* em relação ao seu grupo étnico têm um risco aumentado de infecção pelo HIV-1, além de maior predisposição ao rápido progresso da doença (Nakajima e col., 2008).

Outro exemplo de CNV afetando predisposição a doença é o número de cópias do gene *FCFR3B* em relação à susceptibilidade de pacientes a manifestar lúpus. Esse gene, na região cromossômica 1q23, codifica o receptor ativador Fc que, quando em número reduzido de cópias, está associado com aumento à susceptibilidade à doença (Yang e col., 2007b; Ptacek e col., 2008; Wu e col., 2008). E ainda, dados de Mamtani e colaboradores, sugerem que a interação epistática entre CNVs de *FCGR3B* e *CCL3L1* influencia fenotipicamente as doenças autoimunes: lúpus, artrite reumatoide e síndrome Sjögren's primária (Mamtani e col., 2009). O número de cópias do gene alfa sinucleína em 4q21 parece estar relacionado à doença de Parkinson's (Singleton e col., 2003) e a duplicação da região do cromossomo 21 que inclui o loco do gene à proteína precursora da amiloide foi relacionada à doença de Alzheimer's (McCarthy e col., 2008).

Para os citogeneticistas clínicos que atendem pacientes com atraso de desenvolvimento e/ou anomalias congênitas (ou, no presente caso, deficiência auditiva), o maior desafio atual consiste em distinguir entre as variações no número de cópias que estão relacionadas ao fenótipo investigado daquelas presentes na população geral.

OBJETIVOS

II - OBJETIVOS

II. 1- OBJETIVO GERAL

Esse projeto teve como objetivo identificar novos genes ou regiões cromossômicas relacionados com a deficiência auditiva. Para isso, selecionamos pacientes com perda auditiva idiopática e sinais clínicos adicionais cujos fenótipos não puderam ser classificados em síndromes conhecidas. Essa seleção foi baseada no pressuposto de que os indivíduos síndrômicos tendem a apresentar alterações cromossômicas maiores e, portanto, mais facilmente detectáveis por *array*-CGH.

II. 2 - OBJETIVOS ESPECÍFICOS

O presente trabalho teve como objetivos específicos:

- 1- Investigar alterações no número de cópias de sequência de DNA por meio de *array*-CGH (*aCGH*) em indivíduos que apresentavam surdez associada a outros sinais clínicos e com etiologia desconhecida.
- 2- Mapear as regiões cromossômicas que apresentaram número de cópias alterado.
- 3- Com base em bancos de dados sobre variação do número de cópias de segmentos de DNA em indivíduos controle (Database of Genomic Variant) e afetados (DECIPHER), avaliar a relevância das alterações encontradas para o quadro clínico dos pacientes.
- 4- Verificar através de FISH se as alterações detectadas nos afetados eram *de novo* ou herdadas (equilibradas ou não), de pais fenotipicamente normais.

- 5- Determinar entre os genes contidos nos segmentos cromossômicos considerados provavelmente relevantes, os genes candidatos a causar os fenótipos alterados correspondentes.
- 6- Realizar aconselhamento genético das famílias.

CASUÍSTICA E MÉTODOS

III – CASUÍSTICA E MÉTODOS

III. 1- Casuística

A casuística foi composta por 31 indivíduos, de ambos os sexos, sendo 21 do sexo masculino e 10 do sexo feminino. Essa amostra foi composta por indivíduos que compareceram ao Serviço de Aconselhamento Genético do Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo (IB-USP) entre 2000 e 2008. Os pacientes foram encaminhados para estudo genético por diversas instituições, como a DERDIC (Divisão de Educação e Reabilitação de Distúrbios da Comunicação) da PUC de São Paulo; Instituto da Criança, Hospital das Clínicas, Universidade de São Paulo (Prof.^a Dra. Chong A Kim) e Unidade de Genética Clínica do Hospital de Reabilitação de Anomalias Craniofaciais de Bauru da Universidade de São Paulo.

Os indivíduos foram selecionados por apresentarem perda auditiva e de manifestarem outros sinais clínicos e/ou deficiência mental. As avaliações genético-clínicas não permitiram determinar as causas dos fenótipos anormais, nem tampouco classificar os fenótipos em síndromes conhecidas. As anamneses dos pacientes, baseadas em relatos dos pais ou responsáveis, não revelaram contato com medicamentos ototóxicos, ocorrências na gestação ou no parto e episódios de infecção que pudessem justificar a deficiência auditiva desses pacientes, embora nem todos os casos tivessem disponível documentação médica detalhada. Os diagnósticos de deficiência auditiva foram estabelecidos por profissionais da área de Fonoaudiologia e Otorrinolaringologia.

Apenas os indivíduos que apresentaram resultados negativos na triagem das mutações mais comumente associadas à surdez foram incluídos na casuística, especificamente: mutações nos genes *GJB2* (35delG e 167delT) e *GJB6* (delGJB6-D13S1830 e delGJB6-D13S1854), frequentes causas de surdez de herança autossômica recessiva, e mutação mitocondrial A1555G do

gene *MTRNR1*. A análise cromossômica por bandamento G foi realizada para todos os casos.

Na maioria dos pacientes, a avaliação audiológica foi realizada por exames como: timpanometria e limiar de reflexo acústico, audiometria vocal e tonal com métodos adequados à idade do paciente; emissões Oto-acústicas transitórias (OEA) e suas distorções. Audiometria pura foi realizada para testar a condução em ar (250-8000 Hz) e osso (250-4000 Hz). Também foi utilizado o exame BERA ou PEATE (Potenciais Evocados Auditivos do Tronco Encefálico). Além desses exames, procuramos obter cópias de outros exames, quando realizados, tais como: avaliações oftalmológicas, ressonância magnética de cabeça e pescoço, tomografia computadorizada e ecocardiograma. No entanto, como os pacientes foram encaminhados por centros que seguem diferentes protocolos clínicos, nem todos os exames foram realizados em todos os casos.

Esse projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética do Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo (IB-USP) (Anexo 1). Os pais ou responsáveis dos indivíduos incluídos no estudo assinaram o **Termo de Consentimento Livre e Esclarecido** (Anexos 2 e 3).

III. 2 - Métodos

III. 2.1 – Anamnese genético-clínica

Com exceção de dois indivíduos (**Pacientes 13 e 28**), cujas entrevistas foram realizadas em outro Instituto, os demais pacientes compareceram ao Ambulatório de Deficiência Auditiva do Serviço de Aconselhamento Genético do Laboratório de Genética Humana do Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo (IB-USP). Seus pais ou responsáveis foram entrevistados pessoalmente, para preenchimento da ficha de anamnese genético-clínica (ver modelo Anexo 4) e os pacientes submetidos à avaliação genético-clínica. Nas situações em que foram detectadas alterações no número de cópias de sequências de DNA por *array*-CGH, os pais foram investigados

quanto ao *status* de portadores da alteração (equilibrados ou não). Os participantes desse estudo, com exceção de um indivíduo (**Paciente 3** – não localizado), receberam informações dos resultados obtidos, ou seja, entrega de laudos e aconselhamento genético.

III. 2.2 – Extração de DNA genômico

A extração do DNA de linfócitos de sangue periférico foi realizada usando um dos seguintes procedimentos: técnica de extração com fenol e clorofórmio ou a utilização de kits comerciais: “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). Em algumas amostras foi utilizado o sistema de extração automatizada Autopure LS (Gentra Systems, Minneapolis, Minnesota, USA).

III. 2.3 - Análises de mutações específicas

a) Triagem da mutação 35delG no gene da conexina 26 (GJB2):

A mutação 35delG no gene da conexina 26 (*GJB2*) foi detectada por meio de reações de PCR alelo-específicas, de acordo com protocolo de Scott e col. (1998), utilizando dois pares de *primers*, um que amplifica o alelo normal (Reação NOR: **NOR** 5' TTG GGG CAC GCT GCA GAC GAT CCT GGG GAG 3' e **COM** 5' GAA GTA GTG ATC GTA GCA CAC GTT CTT GCA 3') e o outro que amplifica o alelo mutado (Reação MUT: **MUT** 5'TTG GGG CAC GCT GCA GAT GGG GAG 3' e **COM** 5' GAA GTA GTG ATC GTA GCA CAC GTT CTT GCA 3'). A amplificação pode ocorrer em uma, outra ou em ambas as reações indicando os genótipos homozigoto selvagem, homozigoto mutado ou heterozigoto, respectivamente. Os produtos da PCR foram analisados em gel de agarose 2% após coloração com brometo de etídeo.

b) Triagem da mutação 167delT no gene da conexina 26 (GJB2)

Para a detecção da triagem da mutação 167delT no gene da conexina 26 (*GJB2*) foram utilizados os *primers* **1F** 5' GTG TTG TGT GCA TTC GTC TTT TC- 3' e **3R** – 5' ACC TTC TGG GTT TTG ATC TCC TC 3'. Esses *primers* amplificam um fragmento de 425 pb, incluindo a região da mutação 167 delT. Os fragmentos amplificados foram digeridos pela enzima *PstI*. Nas amostras dos indivíduos que não apresentam a mutação, a digestão por essa enzima origina quatro fragmentos de restrição (150pb, 138pb, 69pb e 68pb) e nos indivíduos que apresentam a mutação em homozigose três fragmentos (219pb, 138pb e 68pb), devido à perda de um sítio de restrição. Indivíduos heterozigotos apresentam fragmentos de 219pb, 150pb, 69pb e 68pb. Esses fragmentos foram separados por gel de poliacrilamida 6% e sua visualização foi realizada após impregnação do gel por nitrato de prata.

c) Triagem das mutações $\Delta(GJB6-D13S1830)$ e $\Delta(GJB6-D13S1854)$

A triagem das mutações $\Delta(GJB6-D13S1830)$ e $\Delta(GJB6-D13S1854)$ foi realizada de acordo com os protocolos descritos por del Castillo e col. (del Castillo e col., 2002; del Castillo e col., 2005). A investigação de mutações foi feita através de uma PCR multiplex que investiga a presença de ambas as deleções. Foram utilizados os *primers*: *GJB6-1R*, 5'-TTT AGG GCA TGA TTG GGG TGA TTT-3' e *BKR-1*, 5'-CAC CAT GCG TAG CCT TAA CCA TTT T-3' e *primer* *Cx30Ex1B*, 5'-CAT GAA GAG GGC GTA CAA GTT AGA A- 3' que amplificam a região de quebra da deleção $\Delta(GJB6-D13S1830)$; *DelBK1*, 5'-TCA TAG TGA AGA ACT CGA TGC TGT TT-3' e *DelBK2*, 5'-CAG CGG CTA CCC TAG TTG TGG T-3', para amplificação do ponto de quebra $\Delta(GJB6-D13S1854)$; *primer* *Cx30Ex1A*, 51-CGT CTT TGG GGG TGT TGC TT-3' e *primer* *Cx30x1B*, 5'-CAT GAA GAG GGC GTA CAA GTT AGA A-3' que amplificam o exon 1 do gene *GJB6*, utilizado como controle interno da eficácia das reações de amplificação. Os produtos dessa PCR foram visualizados em gel de agarose 2% após coloração com brometo de etídeo. Indivíduos que não são portadores das mutações exibem a banda controle de 333 pb que

representa o exon 1 do gene *GJB6*. Indivíduos com a mutação $\Delta(GJB6-D13S1830)$ em heterozigose apresentam duas bandas amplificadas sendo uma a da banda controle e a outra a da banda amplificada de 460 pb. Já a deleção $\Delta(GJB6-D13S1854)$ em heterozigose revela a amplificação de uma banda de 564 pb, além da banda controle.

d) *Triagem da mutação A1555G no gene mitocondrial MT-RNR1 (subunidade 12S RNAr)*

A triagem da mutação mitocondrial *A1555G* no gene mitocondrial *MT-RNR1* (subunidade 12S RNAr) foi baseada no protocolo descrito por Estivil e col. (1998), com par de *primers* (5' GCT CAG CCT ATA TAC CGC CAT CTT CAG CAA 3') e (5' TTT CCA GTA CAC TTA CCA TGT TAC GAC TGG 3'). Esse par de *primers* amplifica um fragmento de 339 pb que é digerido com a enzima de restrição *Hae III*. Os produtos dessa digestão completa foram visualizados em gel de poliacrilamida 6% após impregnação por nitrato de prata. Em todos os indivíduos, deve sempre existir um sítio de restrição, que serve como controle da eficácia da digestão e são produzidos dois fragmentos, sendo um de 216 pb e o outro de 123 pb. Nos indivíduos portadores da mutação *A1555G*, o fragmento de 123 pb é cortado em dois, um de 93 pb e o outro de 30 pb.

III. 2.4 - Estudo Cromossômico

Os estudos cromossômicos foram realizados a partir de amostras de sangue periférico. Os linfócitos foram cultivados em meio RPMI 1640, soro bovino fetal 20%, antibióticos (gentamicina e estreptomicina 1%) e fitohemaglutinina (PHA) para estimular a divisão de linfócitos. Após 72 horas a 37 °C, as células foram bloqueadas em metáfase com adição de colcemida (*Karyomax colcemid solution* – Gibco®). Em seguida, as células foram tratadas com solução hipotônica de cloreto de potássio 0,075 M e fixadas com metanol ácido acético 3:1 (Técnica de Moorhead modificada; (Moorhead e col., 1960)). O padrão de banda G foi obtido usando tripsina liofilizada 1:250 e corante

Giemsa 4%. Analisamos no mínimo 20 metáfases de cada paciente. A identificação e classificação dos cromossomos foram realizadas de acordo com as normas do ISCN (2009).

III. 2.5 - Hibridação comparativa do genoma baseada em arrays **(Array Comparative Genomic Hybridization - aCGH)**

Os procedimentos da técnica de *aCGH* foram realizados como descrito em Rosenberg e col., 2005. Sucintamente, as lâminas contendo triplicatas de aproximadamente 3.500 fragmentos de DNA clonados e espaçados cerca de 1 Mb no genoma, foram produzidas na *Leiden University Medical Center*. Esse conjunto de sondas foi gentilmente fornecido pelo *Wellcome Trust Sanger Institute* (UK), e as informações a respeito das sondas se encontram no campo *cytoview* do site do *Wellcome Trust Sanger Institute*, *Ensembl*. Marcação de DNA e procedimentos de hibridação foram baseados em protocolos previamente descritos (Carter e col., 2002; Fiegler e col., 2003). Os DNAs teste e referência foram marcados por *random-priming* com Cy3 e Cy5-dCTPs ([www.bioscreening.com/companies/Amerham Bioscience](http://www.bioscreening.com/companies/Amerham_Bioscience)), respectivamente. Após hibridação e lavagem, a leitura das lâminas foi realizada no scanner GenePix Personal 4100A, e as intensidades de fluorescência medidas pelo programa GenePix Pro 4.1 (*Axon Instruments, Westburg BV, Leusden, Holanda*). As análises foram realizadas usando um conjunto de macros em Microsoft Excel 2000 desenvolvida na *Leiden University Medical Center*. As intensidades de cada *spot* foram normalizadas pelo total das intensidades de cada cor. O valor do log2 da razão verde/vermelho foi calculado para cada *spot* do *array*. Réplicas que apresentaram variação maior que 20% acima ou abaixo da mediana das réplicas foram excluídas da análise, assim como as amostras com apenas uma cópia remanescente. As sequências foram consideradas como amplificadas ou deletadas quando seu log2 da média da razão verde/vermelho foi superior ou inferior ao índice de 0.33 e -0.33, respectivamente.

III. 2.6 – Hibridação *in situ* Fluorescente (FISH)

Os experimentos de FISH foram realizados para validar a presença de deleções ou duplicações, identificadas através da técnica *aCGH*, e também para investigar a presença do rearranjo na forma equilibrada em um dos genitores. Nos casos de duplicação, além das metáfases, núcleos interfásicos também foram considerados. Uma região foi considerada como duplicada quando as interfases apresentavam três sinais e a sonda da região adjacente, usada como controle não duplicado, apresentava dois sinais.

DNA dos mesmos clones detectados como amplificados ou deletados nos *arrays* foram utilizados como sondas nos experimentos de FISH. As sondas clonadas em BAC ou PAC foram cultivadas em meio LB contendo antibióticos (cloranfenicol ou canamicina). Esses clones de DNA foram isolados usando *Wizard SV Plasmid DNA Purification System* da Promega, de acordo com o protocolo Promega, com algumas pequenas modificações.

As sondas foram marcadas com biotina por *nick-translation* (Roche – www.roche.com/) ou *random priming* (kit Bioprime, Invitrogen - www.invitrogen.com/), precipitadas na presença da fração Cot-1 de DNA Humano (*Invitrogen* ou *Roche*) e ressuspensas em meio de hibridação. Essas etapas, assim como as de hibridação, lavagem, pós-hibridação e detecção de anticorpos seguiram os protocolos descritos em Rosenberg e col. (Rosenberg e col., 1992; Rosenberg e col., 1995).

III. 2.7 – Rearranjos mapeados por *oligoarrays*

Além de hibridados com o 1 Mb BAC *array*, as alterações detectadas em nos pacientes **8** e **23** (**Tabela 6**) foram mapeadas pela Dra. Ana Cristina Krepischi em maior resolução utilizando *arrays* de oligonucleotídeos de maior densidade.

Um dos *oligoarrays* utilizados foi produzido pela Agilent Technologies e contém quatro áreas de aproximadamente 44.000 oligonucleotídeos com 60 pb cada (4x44K). As amostras teste e referência foram marcadas por *random priming* com Cy3 e Cy5 dCTPs, respectivamente. Os procedimentos usados de

purificação das amostras, hibridação e lavagem são os descritos pelo fabricante. As imagens obtidas com o uso do *scanner* Agilent e do programa *Feature Extraction v9.5.1* foram analisadas com o programa *CGH Analytics 3.4.40* (ambos da Agilent Technologies), usando o algoritmo estatístico ADM-2 e limiar de sensibilidade 6.0. Apenas as alterações que continham no mínimo cinco oligonucleotídeos consecutivos com razão $\log_2$ alterada foram consideradas pelo programa como uma possível alteração no número de cópias de determinado segmento genômico. Usando esses critérios, a precisão de mapeamento das alterações é de aproximadamente 80 Kb, que é o espaçamento médio entre os oligonucleotídeos. O tamanho mínimo de alterações detectadas é cerca de 400 Kb (cinco oligonucleotídeos).

O outro *oligoarray* utilizado foi o 105 K (*Syndrome Plus from Oxford Gene Technology*- OGT). Um pequeno número de *arrays* nos foi oferecido para serem testados, em base de colaboração. Os *arrays* desenhados e distribuídos pela OGT são de fato produzidos pela Agilent Technologies, e os procedimentos laboratoriais usados são os mesmos dos *array* 4x44k da *Agilent*.

RESULTADOS

IV - RESULTADOS

IV. 1 – Achados genético-clínicos dos pacientes investigados

Nossa casuística foi composta de 31 indivíduos, todos encaminhados para o Serviço de Aconselhamento Genético do Laboratório de Genética Humana do IB-USP, designados de 1 a 31, numerados sequencialmente de acordo com a data de primeiro atendimento: **dez** foram encaminhados pelo Instituto da Criança, Hospital das Clínicas, Universidade de São Paulo; **oito** da DERDIC (Divisão de Educação e Reabilitação de Distúrbios da Comunicação) da PUC de São Paulo e **um** do Centro de Reabilitação de Bauru, Universidade de São Paulo. Os **doze** pacientes remanescentes foram averiguados no Laboratório de Deficiência Auditiva, Departamento de Genética e Biologia Evolutiva, Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo, encaminhados por serviços diversos. Esse laboratório realizou a triagem molecular para mutações de todos os pacientes encaminhados pelos outros centros. As avaliações clínicas foram realizadas pelos médicos geneticistas Dr. Paulo Alberto Otto e pelo Dr. Fernando Kok.

Na **tabela 6**, as características dos 31 indivíduos participantes da presente casuística estão descritas. Nessa tabela constam informações referentes a sexo, sinais clínicos, idade na primeira avaliação, histórico familiar e de desenvolvimento e classificação da deficiência auditiva. A hipótese diagnóstica inicial foi também colocada na tabela, embora a combinação dos resultados obtidos e re-avaliação dos sinais clínicos não tenham confirmado nenhuma delas. A deficiência auditiva foi classificada de acordo com os critérios apresentados por Finsterer e Fellingner (2005). De acordo com esses critérios, dois pacientes apresentaram deficiência auditiva mista (condutiva e sensorineural) confirmada (**Pacientes 10 e 27**) e outro suspeita (**Paciente 14**), todas causadas por malformações de orelha. Os 29 pacientes remanescentes apresentavam deficiência auditiva sensorineural.

A heterogeneidade e diversidade das manifestações clínicas dos pacientes, quando classificadas apenas em “positivo” ou “negativo” para categorias clínicas fixas, resultariam em descrições limitadas quando comparadas aos fenótipos apresentados pelos pacientes. Portanto, descrevemos por extenso os sinais clínicos documentados, embora na **Discussão** abordemos os sinais clínicos recorrentes.

Tabela 6 – Dados e sinais clínicos dos pacientes com deficiência auditiva.

Paciente	Registro e Procedência	Sexo	Idade na 1ª Avaliação e Sinais Clínicos	Histórico familiar e dados gestacionais/desenvolvimento	Caracterização da deficiência auditiva
1	15015 Laboratório de Deficiência Auditiva	F	21a1m baixa estatura (<3º percentil); miopia à direita; menstruação irregular.	G3P3A0 Consanguinidade parental (primos em 1º grau); parto normal; IG a termo; sentou sem apoio aos 6 meses; andou com 1a.	sensorineural bilateral, leve à grave (indício de neuropatia auditiva).
2	15778 Laboratório de Deficiência Auditiva	F	2a11m ADNPM; microcefalia (<5º percentil); inclinação mongoloide das fissuras palpebrais; epicanto; estrabismo; filtro nasal curto; lábios proeminentes; escleróticas azuladas; pregas transicionais de flexão em ambas as mãos; marcha atáxica com aumento da base de sustentação.	G2P2A0 Cesárea; IG a termo; cianose (anoxia?); ficou internada 9 dias (melena); sustentou pescoço aos 6m; sentou sem apoio aos 9m; andou com 1a3m; não fala.	sensorineural bilateral, moderada.
3	15780 DERDIC (PUC/SP)	M	5a11m atraso na aquisição da fonação; cílios longos; estrabismo alternante; epicanto discreto; nariz com base achatada; orelhas em abano discreto.	G1P1A0 Consanguinidade parental (primos em 2º grau); parto normal; IG a termo; andou com 11m; primeiras palavras aos 2a.	sensorineural bilateral, leve.
4	16246 Laboratório de Deficiência Auditiva	M	4a1m retardo mental; frontal abaulado; filtro longo; palato alto; orelhas grandes; microrretrognatia; macrossomia; hipertelorismo mamilar; hiperextensibilidade articular leve.	G3P2A1 Parto normal; IG a termo; PN 3.060 g; sustentou a cabeça com 2 meses; sentou sem apoio com 5-6m; andou com 1a2m; não fala aos 4 anos.	sensorineural bilateral, profunda.

F = Feminino; M = Masculino; a/m = idade em ano(s) e mês(es) na primeira avaliação; G_P_A_ = número de gestações, partos e abortos; PN = peso ao nascimento; CN = comprimento ao nascimento; Perímetro cefálico; FOP = foramen oval pévio; D = Direita; E = Esquerda; ADNPM = atraso no desenvolvimento neuropsicomotor; IG = idade gestacional ao nascimento; USG = ultrassom gestacional; DEDIC = Divisão de Educação e Reabilitação de Distúrbios da Comunicação; HC = Hospital das Clínicas; PUC = Pontifícia Universidade Católica; USP = Universidade de São Paulo.

Continuação da Tabela 6 – Dados e sinais clínicos dos pacientes com deficiência auditiva.

Paciente	Registro e Procedência	Sexo	Idade na 1ª Avaliação e Sinais Clínicos	Histórico familiar e dados gestacionais/desenvolvimento	Caracterização da deficiência auditiva
5	16277 DERDIC (PUC/SP)	M	3a7m distúrbio de aprendizagem; orelhas de implantação baixa; palato alto; filtro aumentado; micrognatia; mãos finas; dedos longos.	G3P2A1 Consanguinidade parental (primos em 1º grau); cesárea; IG a termo; PN 3.350g; CN 52 cm; Incubadora por 9 dias (cardiopatia); andou com 1a1m; primeiras palavras entre 9 e 10 meses; não fala aos 3a; história de otites.	sensorineural bilateral, leve.
6	16509 Laboratório de Deficiência Auditiva	F	2a5m ADNPM; dentes inferiores pequenos e espaçados; cardiopatia congênita (PCA); marcha com base de sustentação aumentada; síndrome velo-cárdio-facial?	G1P1A0 Parto normal; IG a termo; PN 2235 g; CN 47 cm; APGAR 6; hipotônica; sustentou o pescoço entre 7 e 8m; sentou sem apoio aos 1a3m; andou com 2a2m; primeiras palavras 1a.	sensorineural bilateral, moderadamente grave à grave.
7	16886 DERDIC (PUC/SP)	M	9a11m ADNPM; baixa estatura (< 3º percentil); sopro cardíaco (5 meses).	G3P3A0 Parto normal; IG pré-termo; PN 2.650 g; CN 45 cm.	sensorineural bilateral, grave.
8	16910 DERDIC (PUC/SP)	F	6a5m craniossinostose; fronte proeminente; filtro curto; má-oclusão dentária; dentes decíduos hipoplásicos; cardiopatia congênita (CIA e CIV); braquidactilia; clinodactilia do 5º dedo com última falange encurtada; háluces alargados; síndrome de Saethre-Chotzen?; síndrome velo-cárdio-facial?	G1P1A0 Outros afetados da família (pai e tio materno); cesárea; IG a termo; PN 2.890 g; CN 43 cm; icterícia neonatal; sentou sem apoio aos 8m; andou antes de 1 ano.	sensorineural bilateral, profunda.

F = Feminino; M = Masculino; a/m = idade em ano(s) e mês(es) na primeira avaliação; G_P_A_ = número de gestações, partos e abortos; PN = peso ao nascimento; CN = comprimento ao nascimento; Perímetro cefálico; FOP = foramen oval pévio; D = Direita; E = Esquerda; ADNPM = atraso no desenvolvimento neuropsicomotor; IG = idade gestacional ao nascimento; USG = ultrassom gestacional; DERDIC = Divisão de Educação e Reabilitação de Distúrbios da Comunicação; HC = Hospital das Clínicas; PUC = Pontifícia Universidade Católica; USP = Universidade de São Paulo.

Continuação da Tabela 6 – Dados e sinais clínicos dos pacientes com deficiência auditiva.

Paciente	Registro e Procedência	Sexo	Idade na 1ª Avaliação e Sinais Clínicos	Histórico familiar e dados gestacionais/desenvolvimento	Caracterização da deficiência auditiva
9	17097 Laboratório de Deficiência Auditiva	F	2a5m estrabismo; ptose à esquerda; miopia (em regressão); clinodactilia de 5º dedo bilateral; encurtamento bilateral dos háluces; hipotonia muscular leve; almofadas digitais discretas; síndrome de Kabuki?	G1P1A0 Cesárea; IG prematura (24ª semana); PN 1.040 g; CN 35 cm; 70 dias em incubadora; sentou sem apoio aos 9m; andou com 1a2m.	sensorineural bilateral, grave.
10	17385 Laboratório de Deficiência Auditiva	M	2a5m ADNPM; epicanto interno bilateral; sinófre exuberante; hipoplasia do maciço médio da face; filtro bem marcado; braquicefalia discreta; clinodactilia de 5º dedo bilateral; almofadas digitais.	G1P1A0 Pai com braquicefalia; parto a fórceps; IG a termo; PN 2.750 g; hipotônico; sentou sem apoio aos 8-9 meses; andou com 1a8m; não fala. Mãe refere que fez uso de abortivo.	mista bilateral, grave.
11	17402 DERDIC (PUC/SP)	F	12a11m dificuldades escolares; puberdade precoce.	G3P3A0 Surdez (primos irmãos maternos, consanguinidade parental); cesárea; IG pré-termo; PN 2.040g; CN 41 cm; icterícia neonatal; sentou sem apoio aos 7m; andou com 1a3m; ADNPM; hipotonia.	sensorineural bilateral, grave a profunda.
12	17537 DERDIC (PUC/SP)	M	3a10m atresia do esôfago; tetralogia de Fallot; onfalocele, divertículo de Meckel; defeito de rotação intestinal; cisto renal à esquerda; síndrome de Meckel-Gruber?	G1P1A0 USG baixo peso; onfalocele; cesárea; IG a termo; PN 2.790 g; CN 48,5 cm; PC 33 cm; sustentou a cabeça aos 9-10 meses; sentou aos 11m; andou aos 2a (após fisioterapia); não fala.	sensorineural bilateral, grave (D), profunda (E).

F = Feminino; M = Masculino; a/m = idade em ano(s) e mês(es) na primeira avaliação; G_P_A_ = número de gestações, partos e abortos; PN = peso ao nascimento; CN = comprimento ao nascimento; Perímetro cefálico; FOP = foramen oval pévio; D = Direita; E = Esquerda; ADNPM = atraso no desenvolvimento neuropsicomotor; IG = idade gestacional ao nascimento; USG = ultrassom gestacional; DEDIC = Divisão de Educação e Reabilitação de Distúrbios da Comunicação; HC = Hospital das Clínicas; PUC = Pontifícia Universidade Católica; USP = Universidade de São Paulo.

Continuação da Tabela 6 – Dados e sinais clínicos dos pacientes com deficiência auditiva.

Paciente	Registro e Procedência	Sexo	Idade na 1ª Avaliação e Sinais Clínicos	Histórico familiar e dados gestacionais/desenvolvimento	Caracterização da deficiência auditiva
13	17539 Instituto da Criança (HC/SP)	M	11a2m cegueira bilateral; hiperplasia primária do vítreo; obesidade.	G4P1A3 Surdez (primo materno); cesárea; IG a termo; PN 2.500g; CN 47 cm; andou com 1a; não fala.	sensorineural bilateral, leve (E), grave (D).
14	17561 Laboratório de Deficiência Auditiva	F	4a11m ADNPM; corpo caloso; estrabismo; blefarofimose; estreitamento das coanas; síndrome de Duane?	G2P2A0 Retardo mental na família (primo paterno); parto normal; IG pré-termo; PN 2.450 g; CN 47 cm; sentou sem apoio aos 8m; andou com 1a5m (após fisioterapia).	sensorineural bilateral, pode ser mista (defeito anatômico do canal auditivo), moderada.
15	17643 Laboratório de Deficiência Auditiva	F	23a3m retardo mental; baixa estatura (< 3º percentil).	G3P3A0 Surdez e epilepsia na família (duas tias e dois tios maternos); parto normal; IG a termo; PN 3.600 g; ADNPM; hipotônica; sustentou o pescoço entre 1-2a; sentou sem apoio com mais de 1a; andou com 3ª.	sensorineural bilateral, grave, pós-lingual (aos 15 a), progressiva.
16	17907 Instituto da Criança (HC/SP)	M	11a7m ADNPM; déficit de atenção; hiperatividade; epicanto; orelhas proeminentes; lábios superiores finos; dentes com implantação irregular; filtro longo; palato alto; cardiopatia congênita (CIA/CIV/PCA) corrigida; escoliose; almofadas digitais persistentes; clinodactilia; síndrome de hiperatividade e deficiência de atenção (ADHD).	G2P2A0 História de convulsões de parentes pelo lado materno; cesárea; IG a termo; PN 3.010g; suspeita de hidrocefalia ao nascimento; sentou sem apoio aos 9m; andou com 1a3m; falou ao 1a8m.	sensorineural unilateral, grave à direita.

F = Feminino; M = Masculino; a/m = idade em ano(s) e mês(es) na primeira avaliação; G_P_A_ = número de gestações, partos e abortos; PN = peso ao nascimento; CN = comprimento ao nascimento; Perímetro cefálico; FOP = foramen oval pévio; D = Direita; E = Esquerda; ADNPM = atraso no desenvolvimento neuropsicomotor; IG = idade gestacional ao nascimento; USG = ultrassom gestacional; DERDIC = Divisão de Educação e Reabilitação de Distúrbios da Comunicação; HC = Hospital das Clínicas; PUC = Pontifícia Universidade Católica; USP = Universidade de São Paulo.

Continuação da Tabela 6 – Dados e sinais clínicos dos pacientes com deficiência auditiva.

Paciente	Registro e Procedência	Sexo	Idade na 1ª Avaliação e Sinais Clínicos	Histórico familiar e dados gestacionais/desenvolvimento	Caracterização da deficiência auditiva
17	17950 Laboratório de Deficiência Auditiva	M	5a9m crises convulsivas; catarata congênita; orelhas de implantação baixa; pescoço curto e largo; cardiopatia congênita (CIA e CIV); artéria umbilical única; criptorquidia bilateral.	G1P1A0 Pressão alta (8º mês de gestação); cesárea; IG 36; PN 2.865 g; CN47 cm; PC 34; PA 31; APGAR 7/8; ADNPM; não anda e nem fala; otites de repetição.	sensorineural bilateral, moderada.
18	17989 Laboratório de Deficiência Auditiva	M	4a1m ADNPM; miocardiopatia; hipotonia; hérnia inguinal bilateral; ataxia; síndrome de Barth?	G2P2A0 Cesárea; IG a termo; PN 3.300 g; PC 35cm; hipotônico; icterícia neonatal; sustentou o pescoço aos 5-6 m; atraso para sentar sem apoio; andou com 1a3m; não fala (vocaliza alguns sons do tipo lalação).	sensorineural bilateral, profunda.
19	17990 Instituto da Criança (HC/SP)	M	12a6m dificuldades escolares; atraso na aquisição da fonação; baixa estatura; microcefalia; epicanto; fendas palpebrais com inclinação antimongoloide; ponte nasal elevada; palato alto e estreito; orelhas com lóbulos grandes, pectus excavatum discreto; clinodactilia do 5º dedo bilateral; pés cavos.	G4P2A2 Tio materno com deficiência auditiva (unilateral) atribuída a infecções; parto normal; IG a termo; PN 3.170 g; CN = 47; sustentou o pescoço aos 3m; sentou sem apoio aos 6m; andou com 9m; falou com menos de 1a.	sensorineural bilateral; pós-lingual?; progressiva?; moderada
20	18074 Instituto da Criança (HC/SP)	M	4a7m ADNPM; fronte ampla; hipertelorismo; inclinação antimongoloides das fendas palpebrais; atresia de coana à esquerda; palato alto e estreito; orelhas displásicas; pescoço curto; hiperextensibilidade articular; sindactilia (3º/ 4º) à direita; síndrome de Burn-Mckeown?	G2P2A0 Primo materno com autismo; cesárea; IG a termo; PN 3.615 g; CN 51 cm; PC 37 cm; APGAR 8/9; hipotônico; sentou sem apoio com 1a6m; andou com menos de 2a; não fala.	sensorineural bilateral, moderada (D), profunda (E).

F = Feminino; M = Masculino; a/m = idade em ano(s) e mês(es) na primeira avaliação; G_P_A_ = número de gestações, partos e abortos; PN = peso ao nascimento; CN = comprimento ao nascimento; Perímetro cefálico; FOP = foramen oval pévio; D = Direita; E = Esquerda; ADNPM = atraso no desenvolvimento neuropsicomotor; IG = idade gestacional ao nascimento; USG = ultrassom gestacional; DERDIC = Divisão de Educação e Reabilitação de Distúrbios da Comunicação; HC = Hospital das Clínicas; PUC = Pontifícia Universidade Católica; USP = Universidade de São Paulo.

Continuação da Tabela 6 – Dados e sinais clínicos dos pacientes com deficiência auditiva.

Paciente	Registro e Procedência	Sexo	Idade na 1ª Avaliação e Sinais Clínicos	Histórico familiar e dados gestacionais/desenvolvimento	Caracterização da deficiência auditiva
21	18085 Instituto da Criança (HC/SP)	M	1a6m ADNPM; hiperexcitabilidade; fácies peculiar; disgenesia de corpo caloso; estrabismo; obstrução parcial de coana à direita; sinéquia à esquerda; cardiopatia congênita (FOP + PCA); criptorquidia à esquerda; hérnia inguinal à direita; clinodactilia do 2º dedo bilateral.	G2P2A1 Tratamento de bronquite durante a gravidez; cesárea; IG a termo; PN 2.800 g; CN 48.5 cm; PC 33 cm; APGAR 9/ 9; icterícia neonatal; apnéia no 2º dia; internação por 1 mês em UTI (infecções, paradas cardio-respiratórias); sentou sem apoio aos 8m; engatinhou com 1a4m; não anda e nem fala aos 1a6m.	sensorineural unilateral, grave à direita.
22	18086 Instituto da Criança (HC/SP)	M	3a3m ADNPM; hipertelorismo; agenesia renal (D); ânus imperfurado; ectasia pielo-calicial leve à esquerda; sindactilia (2º/3º artelhos) bilateral.	G2P2A0 Sangramento até o 2º mês de gestação; cesárea; IG 30; PN 1550 g; CN 40 cm; PC 27 cm; APGAR 8/9; sustentou pescoço com 1a; sentou sem apoio com 1a6m; andou com mais de 2a; somente balbucia.	sensorineural bilateral, grave.
23	18087 Instituto da Criança (HC/SP)	M	5a3m ADNPM; hipertelorismo; orelha discretamente em abano; pectus excavatum; escroto em cachecol; polidactilia (5º artelho duplicado) à esquerda; mãos em tridente; dedos curtos e grossos; síndrome de Aarskog?	G2P2A0 Tio materno com retardo mental; cesárea; IG a termo; PN 3.170 g; CN 48 cm; PC 34.5 cm; APGAR 8/9; sustentou pescoço aos 7m; sentou sem apoio com cerca de 1a; andou aos 2a; balbucia algumas palavras com 5a3m.	sensorineural bilateral, moderada à esquerda, grave à direita.

Continuação da Tabela 6 – Dados e sinais clínicos dos pacientes com deficiência auditiva.

Paciente	Registro e Procedência	Sexo	Idade na 1ª Avaliação e Sinais Clínicos	Histórico familiar e dados gestacionais/desenvolvimento	Caracterização da deficiência auditiva
24	18088 Instituto da Criança (HC/SP)	M	17a10m baixa estatura (<3º percentil); microcefalia; fâcies "bird-like"; nariz proeminente; desvio de septo; palato alto; retrognatia; encurtamento de membros inferiores; escoliose lombar discreta.	G3P3A1 Tio materno com surdez pós-lingual; pequeno sangramento; cesárea (laqueadura); IG a termo; PN 2850g; CN 48 cm; icterícia neonatal; andou com 1a; atraso na aquisição da fonação.	sensorineural unilateral, profunda, progressiva.
25	18089 Instituto da Criança (HC/SP)	M	6a11m retardo mental; paralisia facial à esquerda; fâcies triangular; miopia; fendas palpebrais com inclinação antimongoloide; órbitas rasas; lábios finos; prognatismo leve; orelhas internas malformadas com hipoplasia acentuada do conduto auditivo interno.	G3P3A0 Um caso com retardo mental e pé torto congênito e outro com lábio leporino e palato fendido (primos paternos); queda no 8º mês com deficiência de líquido amniótico; parto normal; IG 38; PN 2.730 g; CN 47 cm; icterícia neonatal; sustentou pescoço entre 2-3a; sentou sem apoio com 6a; não anda e não fala.	sensorineural bilateral, profunda.
26	18090 Instituto da Criança (HC/SP)	M	8a5m baixa estatura (altura 1,01m, < 3º percentil); micrognatia; atrofia do nervo óptico; orelhas displásicas; pescoço alado; rins em ferradura; braquidactilia; polegar alargado; criptorquidia; hérnia umbilical; síndrome brânquio-oto-renal?	G1P1A0 Pai, irmão e sobrinho maternos com rim policístico; cesárea; IG 37; PN 2.760 g; CN 46 cm; hipotônico; sentou sem apoio aos 9m; andou aos 3a; não fala.	sensorineural bilateral, grave.

Continuação da Tabela 6 – Dados e sinais clínicos dos pacientes com deficiência auditiva.

Paciente	Registro e Procedência	Sexo	Idade na 1ª Avaliação e Sinais Clínicos	Histórico familiar e dados gestacionais/desenvolvimento	Caracterização da deficiência auditiva
27	18106 DERDIC (PUC/SP)	M	5m20d orelhas displásicas; ectopia renal cruzada com fusão; síndrome brânquio-oto-renal?	G3P3A0 Parto normal; reanimação (anoxia); sustentou pescoço aos 3m; ainda não senta aos 6m.	sensorineural e condutiva bilateral, grave.
28	18107 Hospital de Reabilitação de Anomalias Craniofaciais - Bauru/SP	F	22a9m ADNPM; distúrbio do comportamento (apatia e timidez); dificuldades de aprendizagem; estatura elevada (percentil); hábito marfanoide; fronte ampla e alta; face alongado; hipoplasia malar; micrognatia; hipotonia oral; orelhas com hélices hiperenroladas; pescoço longo; dígitos e artelhos longos; hiperextensibilidade articular; síndrome de Lujan-Fryns?	G1P1A0 Mãe com mecha branca de cabelo na região parietal esquerda; dois primos maternos com atraso de aprendizagem e de aquisição de fonação; parto a fórceps; IG 31 (deficiência de líquido amniótico); PN 900 g; apresentação pélvica; anóxia neonatal; internação por 45 dias; ADNPM; hipotônica; sustentou o pescoço e sentou sem apoio com mais de 1a; andou com 3a.	sensorineural bilateral, moderada.
29	18127 Laboratório de Deficiência Auditiva	F	11a3m dificuldades escolares leves; microcefalia; mamilo extranumerário; quadro leve de puberdade precoce com mamas tipo I Tanner; escoliose discreta tóraco-lombar; pés pequenos com hálux valgo e desvio fibular dos artelhos; polidactilia pós-axial (pés).	G2P2A0 Primo com síndrome de Down; cesárea; IG a termo; APGAR 8.0; dificuldade na amamentação e hipotonia muscular; miopatia congênita?; tiques que se acentuam nos períodos de muita ansiedade.	sensorineural bilateral, moderadamente grave.

Continuação da Tabela 6 – Dados e sinais clínicos dos pacientes com deficiência auditiva.

Paciente	Registro e Procedência	Sexo	Idade na 1ª Avaliação e Sinais Clínicos	Histórico familiar e dados gestacionais/desenvolvimento	Caracterização da deficiência auditiva
30	18263 Laboratório de Deficiência Auditiva	M	7a10m ADNPM; hipertelorismo/telecanto; orelhas em abano; cisto pré-auricular à esquerda; orelha simplificada; dedos longos e finos.	G2P2A1 Pai com surdez discreta; parto norma; IG a termo; PN 2800g; CN 49 cm; icterícia neonatal; ADNPM; hipotônico; sentou sem apoio 1a1m; andou com 2a; falou com 4a.	sensorioneural e condutiva, bilateral, moderadamente grave (D), severa(E).
31	18457 DERDIC (PUC/SP)	M	11a9m retardo mental; heterocromia de íris; prega epicântica; nariz grosso; orelha com implantação baixa e defeito no lóbulo; hiperqueratose palmar; síndrome de Waardenburg?	G6P6A0 Irmão com baixa estatura e crises convulsivas; parto normal; IG pós-termo; hipotônico; engatinhou com mais de 1a; andou com 3a; não fala, balbucia algumas palavras.	sensorioneural bilateral, profunda.

IV. 2 Resultados de *aCGH*

De um total de 31 pacientes investigados por *aCGH*, **oito** apresentaram variações raras (não documentadas no *Database of Genomic Variants* – DGV, dados de 21/08/2009) no número de cópias de sequências de DNA. Os resultados dos rearranjos detectados por *aCGH* e suas localizações genômicas estão descritas na **Tabela 7** de acordo com a versão 36.3 (NCBI) do Genoma Humano. Quatro dos rearranjos eram *de novo*, duas deleções (Pacientes **6** e **26**) e duas duplicações (Pacientes **8** e **31**), e os outros quatro herdados, três deleções (Pacientes **10**, **20** e **23**) e uma duplicação (Paciente**19**). Fotos da face e de sinais clínicos específicos de cinco dos pacientes com alterações no número de cópias estão apresentadas na **Figura 5**. Os três pacientes remanescentes com alteração no número de cópias de segmentos de DNA não consentiram com a apresentação de fotografias.

As informações de todas as alterações genômicas detectadas nesses pacientes foram disponibilizadas e comparadas com as alterações cromossômicas já documentadas no banco público de dados *DECIPHER*. Nas figuras ilustrativas de perfis cromossômicos obtidos por *aCGH* (Figuras 6 a 13), o eixo vertical (Y) do gráfico representa o $\log_2$ da razão teste/referência, e o eixo horizontal (X) as sondas hibridadas de acordo com suas posições nos cromossomos (do braço curto para o longo).

Tabela 7 – Descrição das variações no número de cópias de oito pacientes com surdez sindrômica. As posições genômicas estão descritas de acordo com *Human Genome Building NCBI36,1,HG18*.

Paciente	Rearranjo	Posição Genômica		Posição Genômica		Tamanho	Herança	Registro DECIPHER
		Ponto de quebra distal (Mb)		Ponto de quebra proximal (Mb)		Mínimo (Mb)		
26	del(1)(q23.3q25.2)	160.19	161.21	175.27	175.56	14.06	<i>de novo</i>	USP00002396
31	dup(2)(q22.2q23.3)	143.17	144.59	150.78	150.86	6.19	<i>de novo</i>	USP00248386
8	dup(6)(p25.2p25.3)	2.98	2.86	1.26	1.32	1.60	<i>de novo</i>	USP00001448
6	del(11)(q13.2q13.4)	67.55	68.07	70.31	70.60	2.24	<i>de novo</i>	USP00002389
19	dup(2)(q12.3q12.3)	107.03	108.13	108.34	108.50	0.21	materna	USP00002394
10	del(4)(q23q24)	101.15	101.51	101.96	103.22	0.46	paterna	USP00002392
23	del(7)(q31.1q31.1)	109.93	110.06	110.31	110.39	0.25	materna	USP00002391
20	del(15)(q15.3q15.3)	41.41	41.68	41.85	42.76	0.17	materna	USP00002390

Posições genômicas de tamanho mínimo (em negrito) e máximo dos rearranjos.

Figura 5 – Fotos de pacientes que apresentaram alterações no número de cópias. **(5A)** Paciente 23 - hipertelorismo, tórax *pectus excavatum*, dedos curtos e grossos e 5º artelho. **(5B)** Paciente 20 - fronte ampla, hipertelorismo, inclinação antimongoloides das fendas palpebrais, orelhas displásicas e pescoço curto. **(5C)** Paciente 31 - heterocromia de íris, prega epicântica, nariz grosso, orelha com implantação baixa e defeito no lóbulo. **(5D)** Paciente 6 – ADNPM. **(5E)** Paciente 26 micrognatia, atrofia do nervo óptico, orelhas displásicas e pescoço alado.

IV. 2.1 – Rearranjos *de novo*

O cariótipo do **Paciente 26** foi considerado inicialmente como normal. No entanto, o exame de *aCGH* revelou uma deleção de aproximadamente 16 Mb no cromossomo 1 (1q23.3q25.2) que, quando analisada retrospectivamente após a identificação da alteração por *aCGH*, pôde ser visualizada ao microscópio. As sondas contidas na região deletada são: RP11-430G6; RP11-541J2; RP-11180L13; RP11-306I1; RP11-277B15; RP4-702J19; RP1-206D15; RP11-277C14; RP3-433G19; RP5-1045J21 e RP11-415M14 (**Figura 6**). As sondas usadas para FISH foram RP3-423N22 fora da região deletada, como controle (vermelho) e RP11-430G6, na região deletada (verde). No perfil a sonda RP1-127D3 (posição 171059083-171217158 bp) aparece dentro do limite da normalidade. Aparentes inconsistências foram encontradas também em resultados de outros *arrays*, como por exemplo, uma sonda com valor normal intercalada na deleção do **Paciente 6** (Figura 9). Sondas de comportamento inconsistente estavam quase sempre associadas, a mapeamento errado, a maioria corrigida com o tempo. No entanto, como essa sonda não foi testada por FISH, no **Paciente 26**, existe também a possibilidade de que o rearranjo seja mais complexo do que apenas dois pontos de quebra.

Uma duplicação *de novo* foi detectada no **Paciente 31** em 2q22.2q22.3 e seu tamanho foi estimado entre 6.19 Mb e 7.19 Mb. As sondas duplicadas são: RP11-285H23; RP11-207O14; RP11-3P4; RP11-16J22; RP11-329H24; RP11-62P16 (**Figura 7**). As sondas usadas para FISH foram RP11-62P16 (na região duplicada - verde) e RP11-21M18 (fora da região duplicada – vermelho).

Também foi realizado FISH usando a sonda RP11-397D2, que contém o gene *PAX3* e não mostrou nenhuma alteração.

Figura 6 – Deleção em 1q23.2q23.5 no **Paciente 26**. **(A)** Perfil do cromossomo 1 por *aCGH*. Em vermelho (seta), as sondas que apresentaram redução no número de cópias. **(B)** FISH, apresentando metáfase parcial com os dois cromossomos 1 com sinais vermelhos (sonda controle) mas apenas um com sinal verde (sonda com alteração no número de cópias) (setas) **(C)** Ideograma do cromossomo 1 indicando a área deletada (retângulo vermelho) com a ilustração dos genes deletados dessa região, retirada do *Ensembl Genome Browser* em 09/2009.

Figura 7 – Duplicação em 2q22.2q22.3 no **Paciente 31**. **(A)** Perfil do cromossomo 2 por *aCGH*. Em vermelho (seta), as sondas que apresentaram ganho no número de cópias. **(B)** Ideograma do cromossomo 2 indicando a área duplicada (retângulo vermelho) com a ilustração dos genes presentes nessa região, retirada do *Ensembl Genome Browser* em 11/2009.

Outra duplicação *de novo* foi demonstrada no **Paciente 8**, na região 6p25.2p25.3. As sondas envolvidas na duplicação são: RP11-13J16, RP1-283K11, RP1-136B1. Essa duplicação foi mapeada em maior resolução por *aCGH* usando uma plataforma contendo 105.000 *oligoarrays* e seu tamanho estimado está entre 1.58 a 1.60 Mb (**Tabela 6**). Na **Figura 8**, estão ilustrados os resultados desse mapeamento.

Figura 8 – Duplicação na região 6p25.2p25.3 no **Paciente 8** (A) Perfil do cromossomo 6 por *aCGH*. Em vermelho a região com aumento no número de cópias de DNA. (B) Perfil da duplicação por *aCGH* usando *oligoarray*. A imagem em forma de “bolha” resulta da sobreposição de duas hibridações com marcações reversas. Os genes presentes nesse segmento genômico estão representados na figura (imagem retirada de Catelani e col., 2009).

IV. 2.2 – Rearranjos Herdados

No **Paciente 19** foi detectada uma duplicação de 0.21 a 1.47 Mb em 2q12.3q12.3 abrangendo uma única sonda, R11-443K (**Figura 10**). Para visualizar essa duplicação por FISH e verificar sua presença nos pais, seria necessário distinguir dois sinais em intérfase que, devido ao pequeno tamanho da alteração, estariam muito próximos. Os resultados de FISH nesse caso seriam possivelmente difíceis de interpretar. Para investigar a presença do rearranjo nos pais, decidimos então utilizar *aCGH* que mostrou que o rearranjo foi herdado da mãe.

Figura 10 – Duplicação em 2q12.3q12.3 no **Paciente 19**. (A) Perfil do cromossomo 2 por *aCGH*. Em vermelho (seta), a sonda que apresentou ganho no número de cópias. (B) Ideograma do cromossomo 2 indicando a área duplicada (retângulo vermelho) com a representação dos genes dessa região, retirada do *Ensembl Genome Browser* em 09/2009.

O **Paciente 10** apresentou um deleção de 0.46 a 2.07 Mb, na região (q24q24) do cromossomo 4, (**Figura 11**), contendo as sondas RP11-13F20 e RP11-167N19. FISH com a sonda RP11-13F20 mostrou que a deleção era parcial, o que está de acordo com o valor limítrofe para o log2 da razão teste/referência obtido em *aCGH*. Também foi demonstrado por FISH que a deleção havia sido herdada do pai.

Figura 11 – Deleção em 4q23q24 no **Paciente 10**. (A) Perfil do cromossomo 4 por *aCGH*. Em vermelho (seta), a sonda que apresentou redução no número de cópias. (B) FISH, apresentando metáfase parcial com os cromossomos 4 com sinais verdes de intensidades claramente diferentes (setas) (C) Ideograma do cromossomo 4 indicando a área deletada (retângulo vermelho) com a apresentação dos genes presentes nessa região, retirada do *Ensembl Genome Browser* em 09/2009.

No **Paciente 23** foi identificada uma deleção no braço longo do cromossomo 7 em (q31.1q31.1) (**Figura 12**) compreendendo uma única sonda, RP11-358A10. Essa deleção foi mapeada em maior detalhe com o uso de *oligoarray* com 44.000 sondas, que revelou uma deleção de 25-46 kb, abrangendo os exons 4 e 5 do gene *IMMP2L*.

Figura 12 – Deleção em 7q31.1q31.1 no **Paciente 23**. **(A)** Perfil do cromossomo 7 por aCGH de 1 Mb. Em vermelho (seta), a sonda que apresentou redução no número de cópias. **(B)** Resultados de aCGH com *oligoarrays* 44K: acima, ideograma do cromossomo 7 e representação da área deletada. Abaixo, perfil da região próxima à alteração mostrando deleção de 25-46 kb, que compreende os exons 4 e 5 do gene *IMMP2L*.

Outra microdeleção foi detectada no **Paciente 20** e mapeada no cromossomo 15 em (q15.3q15.3). A alteração inclui uma única sonda, RP11-263I19, e seu tamanho foi estimado em 0.17 a 1.35 Mb. (sonda controle RP11-355D3 posição 2795 e a sonda deletada posição 2796) (**Figura 13**).

Figura 13 – Deleção em 15q15.3q15.3 no **Paciente 20**. **(A)** Perfil do cromossomo 15 por aCGH. Em vermelho (seta), a sonda que apresentou redução no número de cópias. **(B)** Ideograma do cromossomo 15 e representação da área deletada e dos genes presentes nessa região, retirada do *Ensembl Genome Browser* em 02/2009.

DISCUSSÃO

V - DISCUSSÃO

V. 1 - Caracterização clínica da amostra de pacientes com deficiência auditiva

Dos trinta e um indivíduos estudados com sinais adicionais, a maioria (20/31) apresentava dificuldades de aprendizado, atraso de desenvolvimento neuropsicomotor (ADNPM) ou deficiência mental. Outros sinais recorrentes observados nos pacientes foram (em ordem de frequência): braquidactilia ou clinodactilia (9/31), baixa estatura (7/31), defeitos cardíacos (7/31), pregas epicânticas (7/31), palato alto (3/31), sindactilia (2/31) e polidactilia (2/31). Esses sinais clínicos muito frequentes entre indivíduos síndrômicos e não permitiram definir um padrão de fenótipos mais específico relacionado à perda auditiva.

V. 2 – Plataformas de *aCGH*

Com a intenção de investigarmos pacientes síndrômicos e com surdez de causa não definida, utilizamos como ferramenta principal nesse estudo a hibridação comparativa de genomas baseada em *arrays* (*aCGH*) complementada pelas técnicas da citogenética tradicional e FISH. Quando esse projeto foi iniciado, em 2006, *aCGH* já havia sido implementado no IBUSP há dois anos e outros projetos de nosso grupo foram ou estavam sendo desenvolvidos com ênfase em deficiência mental, associada ou não a outras anomalias congênitas (Krepischi-Santos e col., 2006a; Rosenberg e col., 2006b). Nessa época, poucas versões comerciais de *arrays* genômicos existiam e os disponíveis eram produzidos a partir de BACs, com resolução que variava entre 3 Mb a uma cobertura completa do genoma (*tiling path microarrays*). Os *arrays* utilizados nesses projetos eram procedentes da Universidade de Leiden, Holanda, e tinham resolução de 1 Mb. Essa resolução representava um aumento considerável quando comparada àquela da

citogenética clássica e o uso desses BAC *arrays* revelou desequilíbrios cromossômicos submicroscópicos em 16-17% de indivíduos com cariótipo normal e deficiência mental não explicada (Krepischi-Santos e col., 2006a; Rosenberg e col., 2006b) e em frequência ainda mais alta em pacientes averiguados por anomalias Müllarianas (Cheroki e col., 2008).

Os primeiros *arrays* foram desenhados e produzidos logo após a revista *Nature* ter publicado a versão inicial do Projeto Genoma Humano (*International Human Genome Sequencing Consortium*, 2001) com cobertura de cerca de 90% do genoma; grande parte dos BACs usados foi mapeada por FISH e não tinham ainda suas sequências determinadas. Nos anos que decorreram durante o desenvolvimento desse projeto, mudanças substanciais ocorreram no campo de *aCGH*, incluindo o mapeamento pelo Sanger Center das extremidades de todas as sondas usadas no nosso *array* de 1 Mb. Na deleção 11q13.2q13.4 no **Paciente 6**, duas das sondas no segmento supostamente deletado mostraram valores dentro do intervalo normal. Essas sondas não pertenciam ao conjunto do Sanger Center, não tiveram seu mapeamento confirmado por sequenciamento das extremidades e foram posteriormente excluídas do *array*. No começo do estudo, portanto, nos deparávamos com frequência com sondas “problemáticas”, mas esses eventos foram diminuindo conforme as informações sobre esse conjunto de sondas do Sanger Center se acumulavam.

Nos últimos anos, *microarrays* desenvolvidos para determinar o número de cópias de sequências de DNA passaram a ser produzidos comercialmente e usam oligonucleotídeos (*oligoarrays*): as sequências alvo são polimorfismos de sequência única (*SNPs*) (Ropers e col., 2003; Friedman e col., 2006; Slater e col., 2006) ou sequências genômicas aleatórias (Carvalho e col., 2004). Enquanto os *arrays* de *SNPs* têm a vantagem de poder também indicar simultaneamente a origem parental dos desequilíbrios genômicos, os *arrays* de sequências genômicas propiciam cobertura mais homogênea e espaçada, mais adequada para a verificação de desequilíbrios cromossômicos crípticos. No entanto, enquanto os *arrays* de BAC da Universidade de Leiden nos eram fornecidos sem ônus, nosso acesso a *arrays* de oligonucleotídeos era limitado por seu elevado custo. Um número pequeno de *oligoarrays* de diferentes

plataformas foi adquirido por nosso laboratório durante esses anos, e foram usados para definir o mapeamento de alguns dos rearranjos detectados em nossa amostra por 1 Mb BAC *array*. Os *arrays* de BACs apresentavam *design* pouco flexível e produção laboriosa e cara, e em 2008 a Universidade de Leiden, seguindo a tendência das instituições acadêmicas, descontinuou sua produção para usar *oligoarrays* comerciais.

Com o uso dos *arrays* de 1 Mb para averiguar as CNVs, detectamos **oito** alterações, mas é provável que esse número seria mais alto se tivéssemos disponível *arrays* de maior resolução. Diferentes amostras de indivíduos com deficiência auditiva são atualmente investigadas em nosso laboratório com *oligoarrays* de alta resolução (180K). Os tamanhos das CNVs detectadas e mapeadas nesse trabalho variaram entre 250 Kb e 15 Mb, e o tamanho das menores foi determinado com o uso de *oligoarrays*. Com exceção da deleção no cromossomo 1, retrospectivamente visualizada por banda G, nenhuma outra alteração era detectável no nível de resolução da citogenética clássica. Embora o tamanho da duplicação no cromossomo 2 do **Paciente 31** (~6 Mb) estivesse teoricamente dentro da resolução da citogenética clássica, a duplicação não pode ser vista mesmo retrospectivamente após sua detecção por *array*. A pesquisa por FISH em metáfases dos genitores demonstrou que em quatro pacientes os rearranjos foram *de novo* (**Pacientes 6, 8, 26 e 31**) e nos outros quatro foram herdadas de um dos pais (**Pacientes 10, 19, 20 e 23**). Usamos os dados de *aCGH* para determinar regiões cromossômicas e até mesmo genes possivelmente relacionados com audição.

V. 3 – Alterações genômicas e seu possível impacto na deficiência auditiva

Os resultados da análise de *aCGH* detectaram a presença em nossos pacientes de CNVs (*“copy number variations”*) frequentemente presentes na população geral, CNVs já associadas a fenótipos específicos, assim como CNVs nunca ou raramente descritas. Uma CNV é definida como um segmento de DNA, cujo tamanho varia de 1 kb a poucos Mb e está presente em número

variável em diferentes genomas. Embora ao nível citogenético, variantes ou polimorfismos cromossômicos sem aparente impacto fenotípico já tenham sido descritos há muito tempo, a baixa frequência em que são detectados reduz seu impacto populacional quando comparados às CNVs. Na literatura, encontramos alternadamente o uso do termo CNV tanto para designar apenas as variações presentes na população geral (documentadas no *Database of Genomic Variants* (DGV) quanto para incluir também aquelas com efeito patogênico (documentadas no *DECIPHER*). No entanto, como discutiremos mais adiante (alterações genômicas herdadas), a classificação de CNVs em patogênicas e não patogênicas não é sempre clara e muda de acordo com novos achados (revisão em (Lee e col., 2007). Nesse trabalho, chamaremos de CNVs todas as sequências de DNA em número variável, independentemente do seu impacto fenotípico.

Vários consórcios e reuniões científicas têm sido organizados na tentativa de prover parâmetros para que os geneticistas clínicos possam decidir se uma dada CNV é ou não a causa do fenótipo investigado. Os achados científicos e clínicos são documentados em bancos de dados de variantes normais ou patogênicas, tais como DGV e DECIPHER, respectivamente. No entanto, esses bancos de dados compilam, porém não avaliam, os dados neles depositados. No caso de DGV, por exemplo, o banco de dados compila amostras estudadas por *aCGH* e publicadas em revistas científicas. Já o DECIPHER, exibe informações depositadas por membros do consórcio, representantes de diferentes instituições. Ambos apresentam a limitação de reunir dados derivados de diferentes plataformas, populações e critérios científicos. De maneira geral, os bancos de dados não são revistos por nenhum comitê e são usados como referências importantes, porém não absolutas, como já discutido na literatura (Sharp, 2009).

O impacto fenotípico mais óbvio das CNVs é a alteração no número de cópias de genes cujas funções são sensíveis à dosagem gênica. No entanto, sequências promotoras ou supressoras, miRNAs, etc., podem influir na expressão de genes. Adicionalmente, uma CNV pode não ser suficiente para

causar um fenótipo, mas predispor ou contribuir para manifestações clínicas específicas (Wain e col., 2009).

Embora ainda não existam critérios definitivos que permitam discriminar se uma CNV em um afetado é responsável pelo seu fenótipo, os parâmetros de avaliação são relativamente consensuais. A seguir apresentamos um quadro (**Quadro I**), retirado da revisão de Lee e col. (2007), que sumariza os principais aspectos avaliados.

Com base nesses critérios discutiremos, nesse trabalho, apenas as CNVs não presentes na população geral, de acordo com o DGV. Adicionalmente, dividimos as CNVs detectadas em nossos pacientes em duas categorias principais, *de novo* e herdadas, listadas de acordo com a ordem cromossômica.

V. 3.1 – Rearranjos *de novo*

Na análise dos dados obtidos neste trabalho, consideramos como alterações cromossômicas mais evidentemente determinantes do fenótipo aquelas raras e *de novo*. Na nossa amostra, os rearranjos raros *de novo* incluem duas deleções (**Pacientes 6 e 26**) e duas duplicações (**Pacientes 8 e 31**). A deleção encontrada no **Paciente 26**, em 1q23.3q25.2 compreende aproximadamente 100 genes, sendo praticamente impossível determinar os genes que contribuíram para determinar o fenótipo. Entretanto, o segmento genômico deletado inclui os locos de surdez não sindrômica, de herança autossômica dominante, DFNA7 (Fagerheim e col., 1996) e DFNA49 (Moreno-Pelayo e col., 2003), o que por si só já seria suficiente para explicar a deficiência auditiva.

Adicionalmente, nessa área deletada, consideramos por sua função como possíveis candidatos a explicar a deficiência auditiva também os genes *PPOX*, *NDUFS2*, *TOMM40L* e *MPZ* (**Tabela 8**). Entre esses, destaca-se o gene *MPZ*, que codifica a mielina, presente nas células de Schwann (Lemke, 1988). Mutações em *MPZ* estão associadas à síndrome de neuropatia Charcot-Marie-

Tooth tipo 1B (CMT1B), de herança autossômica dominante, caracterizada pela desmielinização periférica e atrofia dos músculos. Algumas famílias com indivíduos afetados por CMT1B também apresentam neuropatia auditiva, tipo de surdez caracterizada por função normal das células ciliadas da cóclea (Warner e col., 1996; Nystad e col., 2008). Embora seja difícil delimitar a ação individual de genes em uma deleção tão grande, o gene *MPZ* poderia contribuir para a surdez apresentada.

O **Paciente 31** apresentou uma duplicação que se estende de 2q22.2 a 2q23.3. Farrel e col., (Farrell e col., 2003) descreveram o único caso até o momento de trissomia parcial dessa área, em um indivíduo com 3 anos de idade sem deficiência auditiva. O fenótipo apresentado pelo **Paciente 31** (surdez, retardo mental, heterocromia de íris e hiperqueratose palmar), é sugestivo da síndrome de Waardenburg. Entretanto, o gene associado à síndrome de Waardenburg que mapeia no cromossomo 2 (banda q35), *PAX3*, está 70 Mb distante da área genômica duplicada em nosso paciente, praticamente descartando a possibilidade de associar o gene *PAX3* ao fenótipo apresentado. Pelo menos oito deleções nessa região já foram descritas (Jaillard e col., 2008), todas associadas a fenótipos mais graves do que o apresentado pelo nosso paciente: esse achado é esperado, uma vez que fenótipos associados a deleções são geralmente mais graves do que aqueles associados a duplicações. A descrição desses casos deixa claro que deleções dessa região não estão associadas à deficiência auditiva. Até o momento, genes associados à audição não foram descritos no intervalo genômico duplicado em nosso paciente. Seleccionamos alguns genes na área dessa duplicação que consideramos provavelmente relevantes para o fenótipo do paciente: *MBD5* associado a retardo mental (Wagenstaller e col., 2007; Williams e col., 2009), *EPC (PEDF)* relacionado com heterocromia de íris (Yafai e col., 2007) e o *GTDC1*, que desempenha função de catalisar a síntese de glicolípídeos, glicoproteínas e proteoglicanos, como possível candidato para explicar a perda auditiva (Zhao e col., 2004a).

Quadro I – Fatores que influenciam o efeito fenotípico de CNV.

Critérios maiores		Características das CNVs	
		Patológica	Benigna
1	a. CNV é herdada de um genitor normal b. CNV é herdada de um genitor afetado	X	X
2	a. CNV é similar à de um indivíduo normal b. CNV é similar à de um indivíduo afetado	X	X
3	a. CNV se sobrepõe a um rearranjo genômico em um banco de dados de indivíduos normais (DGV, por exemplo) b. CNV se sobrepõe a um rearranjo genômico em um banco de dados de indivíduos afetados (DECIPHER, por exemplo)	X	X
4	CNV contém genes classificados como mórbidos pelo OMIM	X	
5	a. CNV é rica em genes b. CNV é pobre em genes	X	X
Critérios menores		Características das CNVs	
		Patológica	Benigna
1	a. CNV é uma deleção b. CNV é uma deleção em homozigose	X X	
2	a. CNV é uma duplicação b. CNV é uma amplificação (ganho maior que uma cópia)	X	X
3	CNV é > 3 Mb		X
4	CNV está livre de elementos de regulação conhecidos		X

Já o **Paciente 8**, portador de uma duplicação <1.8 MB, no cromossomo 6 (dup(6)(p25.2p25.3)) exibiu surdez sensorineural profunda e defeitos cardíacos, características comuns à síndrome de microdeleção (porém não de duplicação) de 6p25 (Maclean e col., 2005). A correlação genótipo-fenótipo em pacientes com deleções distais no 6p indica a presença de genes envolvidos com a audição (Gould e col., 2004; Martinet e col., 2008). Também foram descritas duplicações nessa região, na maioria das vezes associadas a anormalidades oftalmológicas e glaucoma, sem menção a deficiência auditiva (Chanda e col., 2008), com exceção de um paciente com tetrassomia parcial de 6p25 *de novo* (Stohler e col., 2007).

Para investigar se a duplicação encontrada no **Paciente 8** poderia ter causado sua surdez, possivelmente por ruptura ou inibição da expressão de um gene presente em 6p25.3, foi feito mapeamento em maior resolução da região do ponto de quebra, usando *aCGH* com *oligoarrays* (105 K) e MLPA. Dados do mapeamento (**Figura 8**) revelaram que o ponto de quebra distal se encontra na região entre os genes *FOXF2/FOXC1* (duplicado) e o segmento proximal do gene *FOXQ1* (não duplicado). Como a sonda de MLPA cobre somente uma parte do único exon do gene *FOXQ1*, rearranjos da parte remanescente não podem ser descartados. Além disso, enquanto o gene *FOXQ1* aparentemente não está duplicado, elementos de regulação (NM_033260.3) desse gene supostamente mapeiam na posição genômica 1.33 Mb do cromossomo 6, que está dentro do segmento duplicado (*Ensembl Genome Browser*). Outra possibilidade é a alteração na expressão dos genes *FOXF2* e/ou *FOXQ1* devido à proximidade do ponto de quebra.

O último rearranjo *de novo*, a deleção 11q13.2q13.4 no **Paciente 6**, compreende muitos genes no segmento alterado. Convém destacar que a deleção em hemizigose do gene *FGF3* que causa a síndrome oto-dental de herança autossômica dominante inclui a surdez sensorineural como um dos sinais clínicos (Gregory-Evans e col., 2007). Adicionalmente, mutações em homozigose no gene *FGF3* foram recentemente demonstradas como sendo causadoras de surdez sensorineural autossômica recessiva congênita, microtia e microdontia (Alsmadi e col., 2008; Tekin e col., 2008). Curiosamente,

o nosso paciente não apresentou características graves da síndrome otodental, porém seus dentes inferiores são pequenos e espaçados. Nessa área, destacam-se por suas funções os genes: *SHANK2*, *NDUFS8* e *TPCN2* que estão brevemente descritas na **Tabela 8**.

V. 3.2- Rearranjos Herdados

Os **Pacientes 10, 19, 20 e 23** apresentaram rearranjos herdados de um de seus genitores não afetados, ou seja, a presença dos rearranjos *per se* não em teoria não justificariam deficiência auditiva; nesses casos, as CNVs detectadas seriam apenas variantes constitutivas raras, sem consequências clínicas diretas. Porém, não se pode descartar a possibilidade de que alguns, se não todos os rearranjos desses pacientes, estejam envolvidos nos fenótipos apresentados. Nessa situação, mecanismos como recessividade, *imprinting* ou penetrância incompleta do gene poderiam explicar a presença dessas manifestações clínicas apenas nos pacientes e não nos seus genitores não afetados.

Vários exemplos desses mecanismos têm sido demonstrados em casos averiguados por *aCGH*. Um exemplo é a deleção de aproximadamente 1.5 Mb no cromossomo 13(q12.3q13.1) descrita (Oberstein e col., 2006) em dois irmãos com sinais clínicos da síndrome de Peters-Plus (MIM 261540). No entanto, os autores demonstraram que a deleção havia sido herdada da mãe, não afetada. Essa região compreende cinco genes (*HSPH1*, *B3GALTL*, *LGR8*, *LOC196545*, *FRY*) além dos 13 primeiros exons do gene *BCRA2*, o que está de acordo com o histórico familiar de câncer de mama recorrente. Após o sequenciamento dos exons dos genes presentes nessa área, constatou-se que os dois irmãos tinham uma mutação de ponto no alelo *B3GALTL* remanescente (dec.1020+1G->A), e que o pai era heterozigoto em relação a essa mutação. Posteriormente, sequenciaram o gene *B3GALTL* em 18 indivíduos com a síndrome de Peters-Plus, pertencentes a 15 famílias não aparentadas. Quatorze desses indivíduos apresentaram em homozigose e dois em heterozigose (com deleção do alelo materno) a mesma mutação presente nos irmãos com deleção do gene. Os outros dois indivíduos (irmãos), além da

mutação de origem materna dec.1020+1G->A, eram heterozigotos para uma mutação no intron 5 (c.437 + 5G->A). Dos pais avaliados (11) todos eram heterozigotos para as mutações detectadas nos seus descendentes.

Outro exemplo de CNVs causativas que se manifestam no afetado, mas não no genitor portador é a síndrome TAR (*trombocytopenia-absent radius*) (MIM 274000). Em todos os 30 pacientes com a síndrome TAR investigados por *aCGH* (Klopocki e col., 2007), uma deleção intersticial no cromossomo 1(q21.1) com sobreposição de 200 kb foi detectada, deixando claro que a deleção é necessária para a manifestação do fenótipo. No entanto, a deleção foi herdada de um dos genitores que apresentavam fenótipo normal em 75% dos pacientes. Neste estudo, Klopocki e col. (2007) demonstraram que a deleção presente é rara e predispõe um indivíduo à síndrome TAR, mas a presença de um ou mais modificadores adicionais são necessários para a manifestação do fenótipo.

O **Paciente 19** apresenta uma duplicação de ≤ 1.5 Mb no cromossomo 2 (dup2q12.3q12.3). Uma duplicação maior, que contém inteiramente o segmento duplicado em nosso paciente, está presente em outro indivíduo com surdez profunda, documentado no banco de dados DECIPHER (Paciente LEI00248451). Recentemente, outro caso de triplicação parcial *de novo* de 7.28 Mb nessa região (2q12.3→q13) foi publicado. A paciente do sexo feminino, com 33 anos de idade, além de outros sinais clínicos como rim policístico e infertilidade, apresentava surdez (Mercer e col., 2009). Dados de FISH nesse paciente mapearam o segmento alterado no intervalo genômico 2:107140721-114416131. Esses dados sugerem a presença de um gene candidato à surdez na região de sobreposição entre o rearranjo publicado e aquele do **Paciente 19**. Na região duplicada do cromossomo 2 do nosso paciente, destacam-se por suas funções os genes *SCLA7* (transporte de colina), *SULT1C1*, *SULT1C2* e *SULTC3* (metabolismo de neurotransmissores) (**Tabela 8**).

No segmento genômico deletado no cromossomo 4 (4q24) do **Paciente 10**, nenhum gene relacionado à surdez foi até o momento mapeado. Nessa região encontra-se o gene *PP3CA*, que desempenha importantes funções na diferenciação dos osteoblastos e no músculo esquelético cardíaco (OMIM

114105). Essa informação nos permite especular se esse gene teria algum papel na formação da cadeia dos ossículos do ouvido médio e, assim, estar associado à surdez de nosso paciente. Os genes presentes nessa área são o *DDIT4L* e *EMCN*, cujas funções estão brevemente descritas na **Tabela 8**.

No **Paciente 23**, a deleção demonstrada (7q31.1q31.1), herdada da mãe, foi mapeada em maior resolução usando um *oligoarray*. A deleção de 25-46 kb compreende os exons 4 e 5 do gene *IMMP2L* (*inner mitochondrial membrane peptidase 2-like*) (OMIM 605977). Mutações no gene *IMMP2L* são conhecidas por afetar a função mitocondrial em camundongos (Lu e col., 2008).

Já a síndrome Gilles de La Tourette (GTS; MIM 137580) e autismo ou doença autística (AD; MIM 209850) já foram associados a rearranjos envolvendo o braço longo do cromossomo 7 (Kroisel e col., 2001; Petek e col., 2001). Tyson e colaboradores (2004) descreveram uma deleção intersticial bem maior (>4 Mb) mas incluindo totalmente a de nosso paciente, em um paciente com retardo mental e, entre outros, surdez moderada (Tyson e col., 2004). Como o foco desses autores era o retardo mental e distúrbio de linguagem, atribuíram o distúrbio de linguagem à deleção de *FOXP2* (7q31.2). Como a deleção do gene *IMMP2L* é a única alteração em comum no paciente descrito e no **Paciente 23**, esse gene é um forte candidato a causar a surdez moderada apresentada por eles. Considerando que diversas mutações no DNA mitocondrial já foram descritas que alteram a função mitocondrial e que várias delas causam perda auditiva síndrômica ou não síndrômica, não é surpreendente que um gene que se expressa na membrana interna da mitocôndria seja candidato a explicar a deficiência auditiva (**Tabela 4**, da Introdução).

E, por fim, discutimos a deleção heterozigota do cromossomo 15 (15q15.3) (**Paciente 20**). A deleção desse segmento foi descrita como uma variante no *Database of Genomic Variants* (DGV) e resulta na perda do gene *STRC*, ou de região adjacente com alta homologia, contendo seu pseudogene. O gene *STRC* é conhecido como gene de surdez não síndrômica autossômica recessiva, no loco DFNB16 (Verpy e col., 2001). Essa deleção em homozigose já foi associada à surdez (Knijnenburg e col., 2009), razão pela qual não

descartamos diretamente esse paciente da amostra de pacientes com CNVs raras. Em mais de 400 famílias investigadas por *aCGH* até o presente em nosso laboratório, a deleção não foi detectada em nenhum outro indivíduo, evidenciando que essa variante não é muito frequente na população brasileira. FISH com a sonda deletada em indivíduos controle mostrou a presença de dois sinais muito próximos nos cromossomos 15, supostamente derivados das duas regiões com alta homologia. Em nosso paciente, a deleção detectada no *array* foi confirmada pela presença de um único sinal em um dos cromossomos 15, supostamente derivados das duas regiões com alta homologia. Em nosso paciente, a deleção detectada no *array* foi confirmada pela presença de um único sinal em um dos cromossomos 15, mas não foi possível determinar qual das duas regiões estaria deletada. Na tentativa de diferenciar a perda do gene *STRC*, que pode ser confundida com a perda de seu pseudogene, o grupo de Leiden realizou MLPA na amostra de DNA de nosso paciente e nos informou que uma cópia do gene *STRC* estava deletada, enquanto as duas do pseudogene presentes. No entanto, não conseguimos reproduzir o resultado aqui no Brasil. É possível que a deleção dessa região esteja associada à deficiência auditiva em nosso paciente; nesse caso, teríamos que postular que o gene *STRC* estaria no segmento deletado e, adicionalmente, uma mutação no seu alelo remanescente teria ocorrido.

Nos últimos anos, a aplicação do *aCGH* em indivíduos com retardo mental de causa desconhecida de nosso (Rosenberg e col., 2006a; Krepischi-Santos e col., 2006b; Kriek e col., 2007) e de outros grupos (Shaw-Smith e col., 2004; de Vries e col., 2005; Menten e col., 2006; Lu e col., 2007), demonstraram rearranjos submicroscópicos em 10% a 17% dos indivíduos. No presente estudo, investigamos pacientes com surdez e outros sinais clínicos para elucidar a causa da deficiência auditiva tanto para aconselhamento genético quanto para mapeamento de novas regiões cromossômicas associadas à audição. Utilizamos como ferramenta *aCGH* de 1 Mb que, como já discutido no início, provavelmente resulta em uma subestimativa das variações no número de cópias de segmentos de DNA (CNVs). Se considerarmos apenas as CNVs *de novo* como causativas dos fenótipos

Tabela 8 – Descrição sumarizada das funções de possíveis genes candidatos dos indivíduos que apresentaram alteração no número de cópias.

Herança	Paciente	Possíveis genes candidatos	Função
de novo	26	<i>PPOX</i> <i>NDUFS2</i> <i>TOMM40L</i> <i>MPZ</i>	catalisa a oxidação da protoporfirina -IX catalisa a oxidação de NADH no complexo I mitocondrial receptor da subunidade TOM40B na mitocôndria codifica a protein mielina
	31	<i>MBD5</i> <i>EPC (PEDP)</i> <i>GTDC1</i>	proteína sintetizada no cérebro fetal acetilação da histona H4 metabolismo de glicoproteínas, glicolípídeos e Proteoglicanos
	8	<i>GMDS</i> <i>FOXQ1, FOXF2 e FOXC1</i> <i>SGK85</i> <i>TUBB2B</i> <i>MYLK4</i>	GDP-manose 4,6 desidratase (glicoconjugado associado ao desenvolvimento embrionário e na regulação da resposta) Candidatos a causar surdez na síndrome 6p- serina/treonina quinase não caracterizada cadeia tubulina B2 família da cadeia leve da miosina quinase
	6	<i>SHANK2</i> <i>NDUFS8</i> <i>TPCN2</i>	ligado aos receptores neurotransmissores moléculas de adesão do citoesqueleto – candidato ao DFNB63 deficiência do complexo respiratório proteína de membrana dos canais iônicos de cálcio
HERDADO	19	<i>SCLA7</i> <i>SULT1C1, SULT1C2 e SULT1C3</i>	transporte de colina metabolismo de neurotransmissores
	10	<i>DDIT4L</i> <i>EMCN</i> <i>PP3CA</i>	proteína reguladora precursor da endomucina subunidade catalítica da proteína 3-fosfatase
	23	<i>IMMP2L</i>	proteína da membrana interna da mitocôndria
	20	<i>STRC</i> <i>MAP1A</i>	gene recessivo (DFNB16) gene como modificador do canal auditivo

investigados, detectamos **quatro** pacientes portadores entre os 31 investigados (13%). Se considerarmos também as CNVs herdadas como possivelmente causativas, a taxa de desequilíbrios cromossômicos associados à surdez será de 26%. Esses resultados, embora limitados, indicam que investigação por *aCGH* em pacientes com surdez sindrômica idiopática está entre os testes mais eficientes para detectar etiologia dos fenótipos, devendo ser incorporado à rotina no diagnóstico e aconselhamento genético. No Brasil, a aplicação de *aCGH* ainda é limitada pelo alto custo e poucos centros realizam o teste. No entanto, o preço do teste tem se tornado gradualmente mais acessível no passar dos anos.

V. 4 – *aCGH* – BAC, *oligoarrays* e perspectivas

Plataformas de oligonucleotídeos sintéticos (*oligoarrays*) têm aumentado constantemente em densidade e, conseqüentemente, resolução. Dado que a sequência total do genoma humano encontra-se disponível, encomendar *oligoarrays* para projetos específicos é fácil e rápido, além de comparativamente barato. Por exemplo, vários milhões de oligonucleotídeos de 60 pb estão atualmente disponíveis no *website e-ARRAY* da empresa Agilent Technologies e só o nosso grupo já utilizou 4 versões distintas do *array* 44K dessa companhia (um desenhado pela própria Agilent, um pelo grupo do Dr. Crolla em Wessex-UK, um pelo Consórcio Internacional organizado pelo Dr. Ledbetter e um dedicado ao cromossomo X, desenhado pela Dra. Claudia Carvalho).

Um trabalho recentemente publicado descreve o impressionante uso de 42 milhões de oligonucleotídeos em 40 indivíduos, que geraram um mapa de 11700 CNVs maiores do que 443bp (Conrad e col., 2009). Como discutimos nessa tese, quanto menores as alterações detectadas, menor a probabilidade de causar impacto clínico e esses trabalhos, enquanto extremamente valiosos para a compreensão da biologia e variabilidade do genoma humano, são pouco transferíveis para o contexto clínico. *Next Generation Sequencing* de alguns desses indivíduos gerou perfil de número de cópias muito semelhante à *aCGH*,

o que sugere que as técnicas de sequenciamento de nova geração provavelmente substituirão *aCGH* no futuro próximo.

O Consórcio para *International Standard Cytogenetic Array and Public Database* realizou dois encontros internacionais para estabelecer parâmetros para a análise clínica por *aCGH* e as resoluções serão publicadas em breve (C. Rosenberg, comunicação pessoal). Quando uma alteração é detectada e considerada como possivelmente patogênica, deve-se realizar o *aCGH* dos pais para comparação. O aumento de resolução não apenas implica em detectar alterações menores, mas também investigá-las nos pais, com grande aumento de custo do exame. Entre as decisões tomadas pelo consórcio, o tamanho mínimo de alterações que devem ser consideradas, levando em conta a relação custo-benefício, seria 400 Kb. A coleta de mais informações deverá permitir identificar o papel de CNVs em doenças complexas e/ou doenças comuns, como câncer, diabetes e hipertensão. Só após termos um quadro completo do papel das CNVs nas diversas situações clínicas é que as diretrizes diagnósticas definitivas poderão ser estabelecidas.

VI. 1 – RESUMO

A perda auditiva é o defeito mais comum ao nascimento e cerca de 70 milhões de pessoas no mundo apresentam algum grau de perda auditiva. Além da alta incidência, as implicações da perda auditiva na linguagem, na cognição e no desenvolvimento emocional e social reforçam sua importância. No entanto, em grande parte dos pacientes, a causa da deficiência auditiva não é esclarecida. Nós usamos hibridação comparativa do genoma baseada em arrays (**Array Comparative Genomic Hybridization – aCGH**) para investigar alterações no número de cópias de segmentos de DNA (**Copy Number Variation – CNV**) em 31 indivíduos que apresentavam deficiência auditiva e sinais clínicos adicionais, mas que não puderam ser classificados em síndrome conhecida. A escolha de indivíduos síndrômicos se baseou no pressuposto de que, em média, apresentam alterações genômicas maiores e, portanto, mais provavelmente detectáveis com o uso de *aCGH* de 1 Mb, que era a plataforma disponível no início do projeto.

CNVs não descritas em bancos de dados de indivíduos normais foram identificadas em oito pacientes, quatro delas ocorreram *de novo* enquanto as outras quatro foram herdadas de um genitor fenotipicamente normal. As alterações *de novo* definem segmentos cromossômicos que provavelmente contêm genes relacionados à deficiência auditiva e sensíveis a dose, especificamente: 1q23.3-q25.2, 2q22q23, 6p25.3 e 11q13.2-q13.4. As alterações raras identificadas tanto nos pacientes quanto em um genitor normal poderiam ser um evento ao acaso, sem papel na deficiência auditiva; no entanto, a possibilidade de que essas alterações possam funcionar como fatores de predisposição não podem ser descartadas.

Se considerarmos apenas as CNVs *de novo* como causativas dos fenótipos investigados, detectamos quatro pacientes portadores entre os 31 investigados (13%). Se considerarmos também as CNVs herdadas como possivelmente causativas, a taxa de desequilíbrios cromossômicos associados à surdez será de 26%. Esses resultados são provavelmente uma subestimativa e esses números seriam possivelmente maiores com o uso de uma das

plataformas de alta resolução disponíveis atualmente. Esses resultados, embora limitados, indicam que investigação por *aCGH* em pacientes com surdez sindrômica idiopática está entre os testes mais eficientes para detectar etiologia dos fenótipos, devendo ser incorporado à rotina no diagnóstico e aconselhamento genético.

VI. 2 – ABSTRACT

Hearing loss is the most common congenital deficiency and about 70 million people worldwide present some degree of hearing impairment. In addition to its high incidence, hearing loss impacts language, cognition and social and emotional development. However, in a large proportion of patients, the cause of the hearing deficiency cannot be elucidated. . We screened copy number changes by 1 Mb-array Comparative Genomic Hybridization (*aCGH*) in 31 individuals with syndromic hearing impairment whose clinical features were untypical for known disorders. The choice of evaluating syndromic rather than non-syndromic individuals was based on the assumption that they are more likely to carry larger genomic alterations which could be more easily detected by the comparatively low resolution 1 Mb *aCGH*, which was the available platform when this project started.

Copy number changes (CNV) not documented in the database of normal individuals were detected in eight patients, four *de novo* imbalances and four inherited from a normal parent. The *de novo* alterations define candidate chromosome segments likely to harbor dosage sensitive genes related to hearing impairment, namely 1q23.3-q25.2, 2q22q23, 6p25.3 and 11q13.2-q13.4.

The rare imbalances also present in normal parents might be casually associated with hearing impairment, but also have a possible role as a predisposition factor. When only the *de novo* CNVs were considered causative for the disease phenotypes, our study revealed relevant copy number changes in 4 patients (13%). If we also count the rare CNVs that had been inherited as possibly causative, the frequency of chromosome imbalances associated with syndromic deafness in our sample becomes 26%. These figures are probably underestimates and will probably become larger when high resolution oligo-array platforms are applied. These results indicate that *aCGH* is an efficient tool for defining the etiology of syndromic deafness and its use in routine diagnosis of hearing impairment and for genetic counseling is highly recommended.

REFERÊNCIAS

VII.1 – REFERÊNCIAS ELETRÔNICAS

Baylor College of Medicine (BCM):

<http://www.bcm.edu/oto/research/cochlea/hearing/index.htm/>

DECIPHER - Database of Chromosomal Imbalances and Phenotype in Humans:

<http://www.sanger.ac.uk/PostGenomics/decipher>

DGV: Database of Genomic Variants:

<http://projects.tcag.ca/variation>

Earlab (A Virtual Laboratory for Auditory Research):

<http://earlab.bu.edu:>

Enciclopédia Britânica:

<http://media-2.web.britannica.com/eb-media/04/14304-004-6C1B7EB1.gif>.

Ensembl Genome Browser:

<http://www.ensembl.org/>

FORL (Fundação Otorrinolaringologia):

<http://www.forl.org.br>

GenBank:

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>

Gene Reviews - van Camp e Smith, 01/2010:

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/GeneTests/?db=GeneTests>

Hereditary Hearing Loss Home Page:

<http://webhost.ua.ac.be/hhh/>

MITOMAP = A Human Mitochondrial Genome Database:

<http://www.mitomap.org>

OMIM – Online Mendelian Inheritance on Man Ensembl Genome Browser:

<http://www.ensembl.org/>

MITOMAP = A Human Mitochondrial Genome Database:

<http://www.mitomap.org>

VII.2 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ISCN (2009): An international system for human cytogenetics nomenclature (2009). *Cytogenet Genome Res*.
- Abdelhak S, Kalatzis V, Heilig R et al. Clustering of mutations responsible for branchio-oto-renal (BOR) syndrome in the eyes absent homologous region (eyaHR) of EYA1 (1997). *Hum Mol Genet*, 6:2247-55.
- Abe S, Usami S, Shinkawa H, Kelley PM, Kimberling WJ. Prevalent connexin 26 gene (GJB2) mutations in Japanese (2000). *J Med Genet*, 37:41-43.
- Ahmad J, Khan SN, Khan SY et al. DFNB48, a new nonsyndromic recessive deafness locus, maps to chromosome 15q23-q25.1 (2005). *Hum Genet*, 116:407-12.
- Ahmad NN, la-Kokko L, Knowlton RG et al. Stop codon in the procollagen II gene (COL2A1) in a family with the Stickler syndrome (arthro-ophthalmopathy) (1991). *Proc Natl Acad Sci U S A*, 88:6624-27.
- Ahmed ZM, Masmoudi S, Kalay E et al. Mutations of LRTOMT, a fusion gene with alternative reading frames, cause nonsyndromic deafness in humans (2008). *Nat Genet*, 40:1335-40.
- Ahmed ZM, Morell RJ, Riazuddin S et al. Mutations of MYO6 are associated with recessive deafness, DFNB37 (2003a). *Am J Hum Genet*, 72:1315-22.
- Ahmed ZM, Riazuddin S, Ahmad J et al. PCDH15 is expressed in the neurosensory epithelium of the eye and ear and mutant alleles are responsible for both USH1F and DFNB23 (2003b). *Hum Mol Genet*, 12:3215-23.
- Ahmed ZM, Riazuddin S, Bernstein SL et al. Mutations of the protocadherin gene PCDH15 cause Usher syndrome type 1F (2001). *Am J Hum Genet*, 69:25-34.
- Ahmed ZM, Smith TN, Riazuddin S et al. Nonsyndromic recessive deafness DFNB18 and Usher syndrome type 1C are allelic mutations of USH1C (2002). *Hum Genet*, 110:527-31.
- Ain Q, Nazli S, Riazuddin S et al. The autosomal recessive nonsyndromic deafness locus DFNB72 is located on chromosome 19p13.3 (2007b). *Hum Genet*, 122:445-50.
- Ain Q, Nazli S, Riazuddin S et al. The autosomal recessive nonsyndromic deafness locus DFNB72 is located on chromosome 19p13.3 (2007a). *Hum Genet*, 122:445-50.
- Alagramam KN, Yuan H, Kuehn MH et al. Mutations in the novel protocadherin PCDH15 cause Usher syndrome type 1F (2001). *Hum Mol Genet*, 10:1709-18.

- Albertson DG, Pinkel D. Genomic microarrays in human genetic disease and cancer (2003). *Hum Mol Genet*, 12 Spec No 2:R145-R152.
- Ali G, Santos RL, John P et al. The mapping of DFNB62, a new locus for autosomal recessive non-syndromic hearing impairment, to chromosome 12p13.2-p11.23 (2006). *Clin Genet*, 69:429-33.
- Alsmadi O, Meyer BF, Alkuraya F et al. Syndromic congenital sensorineural deafness, microtia and microdontia resulting from a novel homoallelic mutation in fibroblast growth factor 3 (FGF3) (2008). *Eur J Hum Genet*.
- Anderson S, Bankier AT, Barrell BG et al. Sequence and organization of the human mitochondrial genome (1981). *Nature*, 290:457-65.
- Ansar M, Chahrour MH, min Ud DM et al. DFNB44, a novel autosomal recessive non-syndromic hearing impairment locus, maps to chromosome 7p14.1-q11.22 (2004). *Hum Hered*, 57:195-99.
- Ansar M, Din MA, Arshad M et al. A novel autosomal recessive non-syndromic deafness locus (DFNB35) maps to 14q24.1-14q24.3 in large consanguineous kindred from Pakistan (2003a). *Eur J Hum Genet*, 11:77-80.
- Ansar M, Ramzan M, Pham TL et al. Localization of a novel autosomal recessive non-syndromic hearing impairment locus (DFNB38) to 6q26-q27 in a consanguineous kindred from Pakistan (2003b). *Hum Hered*, 55:71-74.
- Aslam M, Wajid M, Chahrour MH et al. A novel autosomal recessive nonsyndromic hearing impairment locus (DFNB42) maps to chromosome 3q13.31-q22.3 (2005). *Am J Med Genet A*, 133A:18-22.
- Attie T, Till M, Pelet A et al. Mutation of the endothelin-receptor B gene in Waardenburg-Hirschsprung disease (1995). *Hum Mol Genet*, 4:2407-9.
- Bacino C, Prezant TR, Bu X, Fournier P, Fischel-Ghodsian N. Susceptibility mutations in the mitochondrial small ribosomal RNA gene in aminoglycoside induced deafness (1995). *Pharmacogenetics*, 5:165-72.
- Baldwin CT, Weiss S, Farrer LA et al. Linkage of congenital, recessive deafness (DFNB4) to chromosome 7q31 and evidence for genetic heterogeneity in the Middle Eastern Druze population (1995). *Hum Mol Genet*, 4:1637-42.
- Barker DF, Hostikka SL, Zhou J et al. Identification of mutations in the COL4A5 collagen gene in Alport syndrome (1990). *Science*, 248:1224-27.
- Bejjani BA, Shaffer LG. Clinical utility of contemporary molecular cytogenetics (2008). *Annu Rev Genomics Hum Genet*, 9:71-86.

- Belguith H, Masmoudi S, Medlej-Hashim M et al. Re-assigning the DFNB33 locus to chromosome 10p11.23-q21.1 (2009). *Eur J Hum Genet*, 17:122-24.
- Berger W, van de PD, Warburg M et al. Mutations in the candidate gene for Norrie disease (1992). *Hum Mol Genet*, 1:461-65.
- Bespalova IN, Van CG, Bom SJ et al. Mutations in the Wolfram syndrome 1 gene (WFS1) are a common cause of low frequency sensorineural hearing loss (2001). *Hum Mol Genet*, 10:2501-8.
- Bhatti A, Lee K, McDonald ML et al. Mapping of a new autosomal recessive non-syndromic hearing impairment locus (DFNB45) to chromosome 1q43-q44 (2008). *Clin Genet*, 73:395-98.
- Bindu LH, Reddy PP. Genetics of aminoglycoside-induced and prelingual non-syndromic mitochondrial hearing impairment: a review (2008). *Int J Audiol*, 47:702-7.
- Bitner-Glindzicz M. Hereditary deafness and phenotyping in humans (2002). *Br Med Bull*, 63:73-94.
- Bitner-Glindzicz M, Lindley KJ, Rutland P et al. A recessive contiguous gene deletion causing infantile hyperinsulinism, enteropathy and deafness identifies the Usher type 1C gene (2000). *Nat Genet*, 26:56-60.
- Blanton SH, Liang CY, Cai MW et al. A novel locus for autosomal dominant non-syndromic deafness (DFNA41) maps to chromosome 12q24-qter (2002). *J Med Genet*, 39:567-70.
- Bolz H, von BB, Ramirez A et al. Mutation of CDH23, encoding a new member of the cadherin gene family, causes Usher syndrome type 1D (2001). *Nat Genet*, 27:108-12.
- Bonne-Tamir B, DeStefano AL, Briggs CE et al. Linkage of congenital recessive deafness (gene DFNB10) to chromosome 21q22.3 (1996). *Am J Hum Genet*, 58:1254-59.
- Bonsch D, Scheer P, Neumann C et al. A novel locus for autosomal dominant, non-syndromic hearing impairment (DFNA18) maps to chromosome 3q22 immediately adjacent to the DM2 locus (2001). *Eur J Hum Genet*, 9:165-70.
- Bonsch D, Schmidt CM, Scheer P et al. [A new locus for an autosomal dominant, non-syndromic hearing impairment (DFNA57) located on chromosome 19p13.2 and overlapping with DFNB15] (2008). *HNO*, 56:177-82.

- Bonsch D, Schmidt CM, Scheer P et al. [A new gene locus for an autosomal-dominant non-syndromic hearing impairment (DFNA 33) is situated on chromosome 13q34-qter] (2009). *HNO*, 57:371-76.
- Bork JM, Peters LM, Riazuddin S et al. Usher syndrome 1D and nonsyndromic autosomal recessive deafness DFNB12 are caused by allelic mutations of the novel cadherin-like gene CDH23 (2001). *Am J Hum Genet*, 68:26-37.
- Braga,MC. Cálculo de Risco em Doenças Geneticamente Heterogêneas: Desenvolvimento de Método e Aplicação no Caso da Surdez Congênita. 1998.
- Braga MC, Otto PA, Spinelli M. Recurrence Risks in cases of Nonsyndromic Deafness (1999). *Braz J Dys and Speech-ear Dis*, 2:33-40.
- Braverman I, Jaber L, Levi H et al. Audiovestibular findings in patients with deafness caused by a mitochondrial susceptibility mutation and precipitated by an inherited nuclear mutation or aminoglycosides (1996). *Arch Otolaryngol Head Neck Surg*, 122:1001-4.
- Brobby GW, Muller-Myhsok B, Horstmann RD. Connexin 26 R143W mutation associated with recessive nonsyndromic sensorineural deafness in Africa (1998). *N Engl J Med*, 338:548-50.
- Brown MR, Tomek MS, Van LL et al. A novel locus for autosomal dominant nonsyndromic hearing loss, DFNA13, maps to chromosome 6p (1997). *Am J Hum Genet*, 61:924-27.
- Bu FX, Peng Y, Wang SH et al. [Mutation screening of 20 candidate genes located in chromo-some 5q31-5q32 for DFNA52 locus] (2009). *Yi Chuan*, 31:43-49.
- Bykhovskaya Y, Estivill X, Taylor K et al. Candidate locus for a nuclear modifier gene for maternally inherited deafness (2000). *Am J Hum Genet*, 66:1905-10.
- Campbell DA, McHale DP, Brown KA et al. A new locus for non-syndromal, autosomal recessive, sensorineural hearing loss (DFNB16) maps to human chromosome 15q21-q22 (1997). *J Med Genet*, 34:1015-17.
- Carter NP, Fiegler H, Piper J. Comparative analysis of comparative genomic hybridization microarray technologies: report of a workshop sponsored by the Wellcome Trust (2002). *Cytometry*, 49:43-48.
- Carvalho B, Ouwerkerk E, Meijer GA, Ylstra B. High resolution microarray comparative genomic hybridisation analysis using spotted oligonucleotides (2004). *J Clin Pathol*, 57:644-46.

- Casano RA, Johnson DF, Bykhovskaya Y, Torricelli F, Bigozzi M, Fischel-Ghodsian N. Inherited susceptibility to aminoglycoside ototoxicity: genetic heterogeneity and clinical implications (1999). *Am J Otolaryngol*, 20:151-56.
- Chaib H, Kaplan J, Gerber S et al. A newly identified locus for Usher syndrome type I, USH1E, maps to chromosome 21q21 (1997). *Hum Mol Genet*, 6:27-31.
- Chaib H, Lina-Granade G, Guilford P et al. A gene responsible for a dominant form of neurosensory non-syndromic deafness maps to the NSRD1 recessive deafness gene interval (1994). *Hum Mol Genet*, 3:2219-22.
- Chaib H, Place C, Salem N et al. A gene responsible for a sensorineural nonsyndromic recessive deafness maps to chromosome 2p22-23 (1996a). *Hum Mol Genet*, 5:155-58.
- Chaib H, Place C, Salem N et al. Mapping of DFNB12, a gene for a non-syndromal autosomal recessive deafness, to chromosome 10q21-22 (1996b). *Hum Mol Genet*, 5:1061-64.
- Chanda B, sai-Coakwell M, Ye M et al. A novel mechanistic spectrum underlies glaucoma-associated chromosome 6p25 copy number variation (2008). *Hum Mol Genet*, 17:3446-58.
- Chapiro E, Feldmann D, Denoyelle F et al. Two large French pedigrees with non syndromic sensorineural deafness and the mitochondrial DNA T7511C mutation: evidence for a modulatory factor (2002). *Eur J Hum Genet*, 10:851-56.
- Chen A, Wayne S, Bell A et al. New gene for autosomal recessive non-syndromic hearing loss maps to either chromosome 3q or 19p (1997). *Am J Med Genet*, 71:467-71.
- Chen AH, Fukushima K, McGuirt WT, Smith RJ. DFNB15: autosomal recessive non-syndromic hearing loss gene-chromosome 3q, 19p or digenic recessive inheritance? (2000). *Adv Otorhinolaryngol*, 56:171-75.
- Chen AH, Ni L, Fukushima K et al. Linkage of a gene for dominant non-syndromic deafness to chromosome 19 (1995). *Hum Mol Genet*, 4:1073-76.
- Chen W, Kahrizi K, Meyer NC et al. Mutation of COL11A2 causes autosomal recessive non-syndromic hearing loss at the DFNB53 locus (2005). *J Med Genet*, 42:e61.
- Chen ZY, Sims KB, Coleman M et al. Characterization of a YAC containing part or all of the Norrie disease locus (1992). *Hum Mol Genet*, 1:161-64.

- Cheroki C, Krepischi-Santos AC, Szuhai K et al. Genomic imbalances associated with mullerian aplasia (2008). *J Med Genet*, 45:228-32.
- Chinnery PF, Elliott C, Green GR et al. The spectrum of hearing loss due to mitochondrial DNA defects 2000). *Brain*, 123 (Pt 1):82-92.
- Chinnery PF, Turnbull DM. Mitochondrial DNA mutations in the pathogenesis of human disease (2000). *Mol Med Today*, 6:425-32.
- Chishti MS, Lee K, McDonald ML et al. Novel autosomal recessive non-syndromic hearing impairment locus (DFNB71) maps to chromosome 8p22-21.3 (2009). *J Hum Genet*, 54:141-44.
- Collin RW, Kalay E, Tariq M et al. Mutations of ESRRB encoding estrogen-related receptor beta cause autosomal-recessive nonsyndromic hearing impairment DFNB35 (2008). *Am J Hum Genet*, 82:125-38.
- Conrad DF, Pinto D, Redon R et al. Origins and functional impact of copy number variation in the human genome (2009). *Nature*.
- Coucke P, Van CG, Djoyodiharjo B et al. Linkage of autosomal dominant hearing loss to the short arm of chromosome 1 in two families (1994). *N Engl J Med*, 331:425-31.
- Cristobal R, Oghalai JS. Hearing loss in children with very low birth weight: current review of epidemiology and pathophysiology (2008). *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed*, 93:F462-F468.
- Cui B, Zhang H, Lu Y et al. Refinement of the locus for non-syndromic sensorineural deafness (DFN2) (2004). *J Genet*, 83:35-38.
- D'Adamo P, Donaudy F, D'Eustacchio A, Di IE, Melchionda S, Gasparini P. A new locus (DFNA47) for autosomal dominant non-syndromic inherited hearing loss maps to 9p21-22 in a large Italian family (2003a). *Eur J Hum Genet*, 11:121-24.
- D'Adamo P, Pinna M, Capobianco S et al. A novel autosomal dominant non-syndromic deafness locus (DFNA48) maps to 12q13-q14 in a large Italian family (2003b). *Hum Genet*, 112:319-20.
- de Kok YJ, van der Maarel SM, Bitner-Glindzicz M et al. Association between X-linked mixed deafness and mutations in the POU domain gene POU3F4 (1995). *Science*, 267:685-88.
- de La RC, Joly-Helas G, Goldenberg A et al. The intrafamilial variability of the 22q11.2 microduplication encompasses a spectrum from minor cognitive deficits to severe congenital anomalies (2006). *Am J Med Genet A*, 140:1608-13.

- de Nobrega M, Weckx LL, Juliano Y. Study of the hearing loss in children and adolescents, comparing the periods of 1990-1994 and 1994-2000 (2005). *Int J Pediatr Otorhinolaryngol*, 69:829-38.
- de Vries BB, Pfundt R, Leisink M et al. Diagnostic genome profiling in mental retardation (2005). *Am J Hum Genet*, 77:606-16.
- del Castillo FJ, Rodriguez-Ballesteros M, Alvarez A et al. A novel deletion involving the connexin-30 gene, del(GJB6-d13s1854), found in trans with mutations in the GJB2 gene (connexin-26) in subjects with DFNB1 non-syndromic hearing impairment (2005). *J Med Genet*, 42:588-94.
- del Castillo FJ, Villamar M, Moreno-Pelayo MA et al. Maternally inherited non-syndromic hearing impairment in a Spanish family with the 7510T>C mutation in the mitochondrial tRNA(Ser(UCN)) gene (2002). *J Med Genet*, 39:e82.
- Del Castillo I, Villamar M, Sarduy M et al. A novel locus for non-syndromic sensorineural deafness (DFN6) maps to chromosome Xp22 (1996). *Hum Mol Genet*, 5:1383-87.
- Delmaghani S, Aghaie A, Compain-Nouaille S et al. DFNB40, a recessive form of sensorineural hearing loss, maps to chromosome 22q11.21-12.1 (2003). *Eur J Hum Genet*, 11:816-18.
- Delmaghani S, del Castillo FJ, Michel V et al. Mutations in the gene encoding pejvakín, a newly identified protein of the afferent auditory pathway, cause DFNB59 auditory neuropathy (2006). *Nat Genet*, 38:770-778.
- Denoyelle F, Lina-Granade G, Plauchu H et al. Connexin 26 gene linked to a dominant deafness (1998). *Nature*, 393:319-20.
- Dixon MJ. Treacher Collins syndrome (1996). *Hum Mol Genet*, 5 Spec No:1391-96.
- Donaudy F, Ferrara A, Esposito L et al. Multiple mutations of MYO1A, a cochlear-expressed gene, in sensorineural hearing loss (2003). *Am J Hum Genet*, 72:1571-77.
- Donaudy F, Snoeckx R, Pfister M et al. Nonmuscle myosin heavy-chain gene MYH14 is expressed in cochlea and mutated in patients affected by autosomal dominant hearing impairment (DFNA4) (2004). *Am J Hum Genet*, 74:770-776.
- Ebermann I, Scholl HP, Charbel IP et al. A novel gene for Usher syndrome type 2: mutations in the long isoform of whirlin are associated with retinitis pigmentosa and sensorineural hearing loss (2007). *Hum Genet*, 121:203-11.

- Edelmann L, Hirschhorn K. Clinical utility of array CGH for the detection of chromosomal imbalances associated with mental retardation and multiple congenital anomalies (2009). *Ann N Y Acad Sci*, 1151:157-66.
- Edery P, Attie T, Amiel J et al. Mutation of the endothelin-3 gene in the Waardenburg-Hirschsprung disease (Shah-Waardenburg syndrome) (1996). *Nat Genet*, 12:442-44.
- Edwards J, Harndnen N, Cameron A, Crosse V, Wolff O. A new trisomic syndrome (1960). *Lancet*, 1:787-90.
- Eisen MD, Ryugo DK. Hearing molecules: contributions from genetic deafness (2007). *Cell Mol Life Sci*, 64:566-80.
- el-Schahawi M, Lopez de MA, Sarrazin AM et al. Two large Spanish pedigrees with nonsyndromic sensorineural deafness and the mtDNA mutation at nt 1555 in the 12s rRNA gene: evidence of heteroplasmy (1997). *Neurology*, 48:453-56.
- Ensink RJ, Verhoeven K, Marres HA et al. Early-onset sensorineural hearing loss and late-onset neurologic complaints caused by a mitochondrial mutation at position 7472 (1998). *Arch Otolaryngol Head Neck Surg*, 124:886-91.
- Estivill X, Govea N, Barcelo E et al. Familial progressive sensorineural deafness is mainly due to the mtDNA A1555G mutation and is enhanced by treatment of aminoglycosides (1998). *Am J Hum Genet*, 62:27-35.
- Eudy JD, Weston MD, Yao S et al. Mutation of a gene encoding a protein with extracellular matrix motifs in Usher syndrome type IIa (1998). *Science*, 280:1753-57.
- Everett LA, Glaser B, Beck JC et al. Pendred syndrome is caused by mutations in a putative sulphate transporter gene (PDS) (1997). *Nat Genet*, 17:411-22.
- Ewart AK, Morris CA, Atkinson D et al. Hemizygoty at the elastin locus in a developmental disorder, Williams syndrome (1993). *Nat Genet*, 5:11-16.
- Fagerheim T, Nilssen O, Raeymaekers P et al. Identification of a new locus for autosomal dominant non-syndromic hearing impairment (DFNA7) in a large Norwegian family (1996). *Hum Mol Genet*, 5:1187-91.
- Farrell SA, Sajoo A, Maybury D, Speevak MD. Pure partial trisomy of 2q22-q23 secondary to a paternally inherited direct insertion: a rare duplication (2003). *Clin Genet*, 64:255-57.

- Farrer LA, Arnos KS, Asher JH, Jr. et al. Locus heterogeneity for Waardenburg syndrome is predictive of clinical subtypes (1994). *Am J Hum Genet*, 55:728-37.
- Fiegler H, Carr P, Douglas EJ et al. DNA microarrays for comparative genomic hybridization based on DOP-PCR amplification of BAC and PAC clones (2003). *Genes Chromosomes Cancer*, 36:361-74.
- Finsterer J, Fellingner J. Nuclear and mitochondrial genes mutated in nonsyndromic impaired hearing (2005). *Int J Pediatr Otorhinolaryngol*, 69:621-47.
- Fischel-Ghodsian N, Prezant TR, Bu X, Oztas S. Mitochondrial ribosomal RNA gene mutation in a patient with sporadic aminoglycoside ototoxicity (1993). *Am J Otolaryngol*, 14:399-403.
- Fischel-Ghodsian N, Prezant TR, Fournier P, Stewart IA, Maw M. Mitochondrial mutation associated with nonsyndromic deafness (1995). *Am J Otolaryngol*, 16:403-8.
- Flex E, Mangino M, Mazzoli M et al. Mapping of a new autosomal dominant non-syndromic hearing loss locus (DFNA43) to chromosome 2p12 (2003). *J Med Genet*, 40:278-81.
- Flint J, Knight S. The use of telomere probes to investigate submicroscopic rearrangements associated with mental retardation (2003). *Curr Opin Genet Dev*, 13:310-316.
- Flinter FA, Bobrow M. The application of molecular biology to the prenatal diagnosis of renal disease (1988). *Pediatr Nephrol*, 2:343-50.
- Flinter FA, Cameron JS, Chantler C, Houston I, Bobrow M. Genetics of classic Alport's syndrome (1988). *Lancet*, 2:1005-7.
- Ford CE, Jonas KW, Polani PE, de Almeida JC, Briggs JH. A sex-chromosome anomaly in a case of gonadal dysgenesis (Turner's syndrome) (1959). *Lancet*, 1:711-13.
- Friedman JM, Baross A, Delaney AD et al. Oligonucleotide microarray analysis of genomic imbalance in children with mental retardation (2006). *Am J Hum Genet*, 79:500-513.
- Friedman LM, Dror AA, Avraham KB. Mouse models to study inner ear development and hereditary hearing loss (2007). *Int J Dev Biol*, 51:609-31.
- Friedman RA, Bykhovskaya Y, Sue CM et al. Maternally inherited nonsyndromic hearing loss (1999). *Am J Med Genet*, 84:369-72.

- Friedman RA, Bykhovskaya Y, Tu G et al. Molecular analysis of the POU3F4 gene in patients with clinical and radiographic evidence of X-linked mixed deafness with perilymphatic gusher (1997). *Ann Otol Rhinol Laryngol*, 106:320-325.
- Friedman TB, Liang Y, Weber JL et al. A gene for congenital, recessive deafness DFNB3 maps to the pericentromeric region of chromosome 17 (1995). *Nat Genet*, 9:86-91.
- Fukushima K, Kasai N, Ueki Y et al. A gene for fluctuating, progressive autosomal dominant nonsyndromic hearing loss, DFNA16, maps to chromosome 2q23-24.3 (1999). *Am J Hum Genet*, 65:141-50.
- Fukushima K, Ramesh A, Srisailapathy CR et al. Consanguineous nuclear families used to identify a new locus for recessive non-syndromic hearing loss on 14q (1995a). *Hum Mol Genet*, 4:1643-48.
- Fukushima K, Ramesh A, Srisailapathy CR et al. An autosomal recessive nonsyndromic form of sensorineural hearing loss maps to 3p-DFNB6 (1995b). *Genome Res*, 5:305-8.
- Gardner JC, Goliath R, Viljoen D et al. Familial streptomycin ototoxicity in a South African family: a mitochondrial disorder (1997). *J Med Genet*, 34:904-6.
- Gasparini P, Rabionet R, Barbujani G et al. High carrier frequency of the 35delG deafness mutation in European populations. Genetic Analysis Consortium of GJB2 35delG (2000). *Eur J Hum Genet*, 8:19-23.
- Gerber S, Bonneau D, Gilbert B et al. USH1A: chronicle of a slow death (2006). *Am J Hum Genet*, 78:357-59.
- Gonzalez E, Kulkarni H, Bolivar H et al. The influence of CCL3L1 gene-containing segmental duplications on HIV-1/AIDS susceptibility (2005). *Science*, 307:1434-40.
- Goto Y, Nonaka I, Horai S. A mutation in the tRNA(Leu)(UUR) gene associated with the MELAS subgroup of mitochondrial encephalomyopathies (1990). *Nature*, 348:651-53.
- Gouas L, Goumy C, Veronese L, Tchirkov A, Vago P. Gene dosage methods as diagnostic tools for the identification of chromosome abnormalities (2008). *Pathol Biol (Paris)*, 56:345-53.
- Gould DB, Jaafar MS, Addison MK et al. Phenotypic and molecular assessment of seven patients with 6p25 deletion syndrome: relevance to ocular dysgenesis and hearing impairment (2004). *BMC Med Genet*, 5:17.

- Greene CC, McMillan PM, Barker SE et al. DFNA25, a novel locus for dominant nonsyndromic hereditary hearing impairment, maps to 12q21-24 (2001). *Am J Hum Genet*, 68:254-60.
- Gregory-Evans CY, Moosajee M, Hodges MD et al. SNP genome scanning localizes oto-dental syndrome to chromosome 11q13 and microdeletions at this locus implicate FGF3 in dental and inner-ear disease and FADD in ocular coloboma (2007). *Hum Mol Genet*, 16:2482-93.
- Greinwald JH, Jr., Wayne S, Chen AH et al. Localization of a novel gene for nonsyndromic hearing loss (DFNB17) to chromosome region 7q31 (1998). *Am J Med Genet*, 78:107-13.
- Grifa A, Wagner CA, D'Ambrosio L et al. Mutations in GJB6 cause nonsyndromic autosomal dominant deafness at DFNA3 locus (1999). *Nat Genet*, 23:16-18.
- Grillet N, Schwander M, Hildebrand MS et al. Mutations in LOXHD1, an evolutionarily conserved stereociliary protein, disrupt hair cell function in mice and cause progressive hearing loss in humans (2009). *Am J Hum Genet*, 85:328-37.
- Guilford P, Ayadi H, Blanchard S et al. A human gene responsible for neurosensory, non-syndromic recessive deafness is a candidate homologue of the mouse sh-1 gene (1994a). *Hum Mol Genet*, 3:989-93.
- Guilford P, Ben AS, Blanchard S et al. A non-syndrome form of neurosensory, recessive deafness maps to the pericentromeric region of chromosome 13q (1994b). *Nat Genet*, 6:24-28.
- Gurtler N, Kim Y, Mhatre A, Schlegel C, Mathis A, Lalwani AK. DFNA54, a third locus for low-frequency hearing loss (2004). *J Mol Med*, 82:775-80.
- Hafner FM, Salam AA, Linder TE et al. A novel locus (DFNA24) for prelingual nonprogressive autosomal dominant nonsyndromic hearing loss maps to 4q35-qter in a large Swiss German kindred (2000). *Am J Hum Genet*, 66:1437-42.
- Hamelmann C, Amedofu GK, Albrecht K et al. Pattern of connexin 26 (GJB2) mutations causing sensorineural hearing impairment in Ghana (2001). *Hum Mutat*, 18:84-85.
- Hao H, Bonilla E, Manfredi G, DiMauro S, Moraes CT. Segregation patterns of a novel mutation in the mitochondrial tRNA glutamic acid gene associated with myopathy and diabetes mellitus (1995). *Am J Hum Genet*, 56:1017-25.

- Hassan MJ, Santos RL, Rafiq MA et al. A novel autosomal recessive non-syndromic hearing impairment locus (DFNB47) maps to chromosome 2p25.1-p24.3 (2006). *Hum Genet*, 118:605-10.
- Hilgert N, Smith RJ, Van CG. Forty-six genes causing nonsyndromic hearing impairment: which ones should be analyzed in DNA diagnostics? (2009). *Mutat Res*, 681:189-96.
- Hmani M, Ghorbel A, Boulila-Elgaied A et al. A novel locus for Usher syndrome type II, USH2B, maps to chromosome 3 at p23-24.2 (1999). *Eur J Hum Genet*, 7:363-67.
- Hone SW, Smith RJ. Genetic screening for hearing loss (2003). *Clin Otolaryngol Allied Sci*, 28:285-90.
- Hoskins BE, Cramer CH, Silviu D et al. Transcription factor SIX5 is mutated in patients with branchio-oto-renal syndrome (2007). *Am J Hum Genet*, 80:800-804.
- Hostikka SL, Eddy RL, Byers MG, Hoyhtya M, Shows TB, Tryggvason K. Identification of a distinct type IV collagen alpha chain with restricted kidney distribution and assignment of its gene to the locus of X chromosome-linked Alport syndrome (1990). *Proc Natl Acad Sci U S A*, 87:1606-10.
- Hoth CF, Milunsky A, Lipsky N, Sheffer R, Clarren SK, Baldwin CT. Mutations in the paired domain of the human PAX3 gene cause Klein-Waardenburg syndrome (WS-III) as well as Waardenburg syndrome type I (WS-I) (1993). *Am J Hum Genet*, 52:455-62.
- Hutchin T, Haworth I, Higashi K et al. A molecular basis for human hypersensitivity to aminoglycoside antibiotics (1993). *Nucleic Acids Res*, 21:4174-79.
- Hutchin TP, Lench NJ, Arbuzova S, Markham AF, Mueller RF. Maternally inherited hearing impairment in a family with the mitochondrial DNA A7445G mutation (2001). *Eur J Hum Genet*, 9:56-58.
- Hutchin TP, Parker MJ, Young ID et al. A novel mutation in the mitochondrial tRNA(Ser(UCN)) gene in a family with non-syndromic sensorineural hearing impairment (2000). *J Med Genet*, 37:692-94.
- lafrate AJ, Feuk L, Rivera MN et al. Detection of large-scale variation in the human genome (2004). *Nat Genet*, 36:949-51.
- International Human Genome Sequencing Consortium. (2001). *Nature*, 409:860-921.

- Irshad S, Santos RL, Muhammad D et al. Localization of a novel autosomal recessive non-syndromic hearing impairment locus DFNB55 to chromosome 4q12-q13.2 (2005). *Clin Genet*, 68:262-67.
- Ishikawa K, Tamagawa Y, Takahashi K et al. Nonsyndromic hearing loss caused by a mitochondrial T7511C mutation (2002). *Laryngoscope*, 112:1494-99.
- Jacobs PA, Strong JA. A case of human intersexuality having a possible XXY sex-determining mechanism (1959). *Nature*, 183:302-3.
- Jaillard S, Dubourg C, Gerard-Blanluet M et al. 2q23.1 microdeletion identified by array-CGH: an emerging phenotype with Angelman-like features? ((2008). *J Med Genet*.
- Jain PK, Fukushima K, Deshmukh D et al. A human recessive neurosensory nonsyndromic hearing impairment locus is potential homologue of murine deafness (dn) locus (1995). *Hum Mol Genet*, 4:2391-94.
- Jain PK, Lalwani AK, Li XC et al. A gene for recessive nonsyndromic sensorineural deafness (DFNB18) maps to the chromosomal region 11p14-p15.1 containing the Usher syndrome type 1C gene (1998). *Genomics*, 50:290-292.
- Jin H, May M, Tranebjaerg L et al. A novel X-linked gene, DDP, shows mutations in families with deafness (DFN-1), dystonia, mental deficiency and blindness (1996). *Nat Genet*, 14:177-80.
- Joensuu T, Hamalainen R, Yuan B et al. Mutations in a novel gene with transmembrane domains underlie Usher syndrome type 3 (2001). *Am J Hum Genet*, 69:673-84.
- Kadowaki T, Kadowaki H, Mori Y et al. A subtype of diabetes mellitus associated with a mutation of mitochondrial DNA (1994). *N Engl J Med*, 330:962-68.
- Kalay E, Caylan R, Kiroglu AF et al. A novel locus for autosomal recessive nonsyndromic hearing impairment, DFNB63, maps to chromosome 11q13.2-q13.4 (2007). *J Mol Med*, 85:397-404.
- Kalay E, Li Y, Uzumcu A et al. Mutations in the lipoma HMGIC fusion partner-like 5 (LHFPL5) gene cause autosomal recessive nonsyndromic hearing loss (2006). *Hum Mutat*, 27:633-39.
- Kallioniemi A, Kallioniemi OP, Sudar D et al. Comparative genomic hybridization for molecular cytogenetic analysis of solid tumors (1992). *Science*, 258:818-21.

- Kameoka K, Isotani H, Tanaka K, Kitaoka H, Ohsawa N. Impaired insulin secretion in Japanese diabetic subjects with an A-to-G mutation at nucleotide 8296 of the mitochondrial DNA in tRNA(Lys) (1998). *Diabetes Care*, 21:2034-35.
- Kaplan J, Gerber S, Bonneau D et al. A gene for Usher syndrome type I (USH1A) maps to chromosome 14q (1992). *Genomics*, 14:979-87.
- Keats BJ. Genes and syndromic hearing loss (2002). *J Commun Disord*, 35:355-66.
- Keats BJ, Berlin CI. Genomics and hearing impairment (1999). *Genome Res*, 9:7-16.
- Kelsell DP, Dunlop J, Stevens HP et al. Connexin 26 mutations in hereditary non-syndromic sensorineural deafness (1997). *Nature*, 387:80-83.
- Khan SY, Ahmed ZM, Shabbir MI et al. Mutations of the RDX gene cause nonsyndromic hearing loss at the DFNB24 locus (2007a). *Hum Mutat*, 28:417-23.
- Khan SY, Riazuddin S, Shahzad M et al. DFNB79: reincarnation of a nonsyndromic deafness locus on chromosome 9q34.3 (2010). *Eur J Hum Genet*, 18:125-29.
- Khan SY, Riazuddin S, Tariq M et al. Autosomal recessive nonsyndromic deafness locus DFNB63 at chromosome 11q13.2-q13.3 (2007b). *Hum Genet*, 120:789-93.
- Kim TB, Isaacson B, Sivakumaran TA, Starr A, Keats BJ, Lesperance MM. A gene responsible for autosomal dominant auditory neuropathy (AUNA1) maps to 13q14-21 (2004). *J Med Genet*, 41:872-76.
- Kimberling WJ, Weston MD, Moller C et al. Localization of Usher syndrome type II to chromosome 1q (1990). *Genomics*, 7:245-49.
- Kirschhofer K, Kenyon JB, Hoover DM et al. Autosomal-dominant, prelingual, nonprogressive sensorineural hearing loss: localization of the gene (DFNA8) to chromosome 11q by linkage in an Austrian family (1998). *Cytogenet Cell Genet*, 82:126-30.
- Klopocki E, Schulze H, Strauss G et al. Complex inheritance pattern resembling autosomal recessive inheritance involving a microdeletion in thrombocytopenia-absent radius syndrome (2007). *Am J Hum Genet*, 80:232-40.

- Knijnenburg, J et al. A homozygous deletion of a normal variation locus causes hearing loss in a patient from non-consanguineous parents. (2009). *J. Med. Genet.* 46:412-17.
- Kochhar A, Fischer SM, Kimberling WJ, Smith RJ. Branchio-oto-renal syndrome (2007). *Am J Med Genet A*, 143A:1671-78.
- Kokotas H, Petersen MB, Willems PJ. Mitochondrial deafness (2007). *Clin Genet*, 71:379-91.
- Koolen DA, Herbergs J, Veltman JA et al. Holoprosencephaly and preaxial polydactyly associated with a 1.24 Mb duplication encompassing FBXW11 at 5q35.1 (2006). *J Hum Genet*, 51:721-26.
- Krepischi-Santos AC, Vianna-Morgante AM, Jehee FS et al. Whole-genome array-CGH screening in undiagnosed syndromic patients: old syndromes revisited and new alterations (2006a). *Cytogenet Genome Res*, 115:254-61.
- Krepischi-Santos AC, Vianna-Morgante AM, Jehee FS et al. Whole-genome array-CGH screening in undiagnosed syndromic patients: old syndromes revisited and new alterations (2006b). *Cytogenet Genome Res*, 115:254-61.
- Kriek M, Knijnenburg J, White SJ et al. Diagnosis of genetic abnormalities in developmentally delayed patients: A new strategy combining MLPA and array-CGH (2007). *Am J Med Genet A*, 143:610-614.
- Kroisel PM, Petek E, Emberger W, Windpassinger C, Wladika W, Wagner K. Candidate region for Gilles de la Tourette syndrome at 7q31 (2001). *Am J Med Genet*, 101:259-61.
- Kubisch C, Schroeder BC, Friedrich T et al. KCNQ4, a novel potassium channel expressed in sensory outer hair cells, is mutated in dominant deafness (1999). *Cell*, 96:437-46.
- Kumar S, Deffenbacher K, Marres HA, Cremers CW, Kimberling WJ. Genomewide search and genetic localization of a second gene associated with autosomal dominant branchio-oto-renal syndrome: clinical and genetic implications (2000). *Am J Hum Genet*, 66:1715-20.
- Kunst H, Marres H, Huygen P et al. Non-syndromic autosomal dominant progressive non-specific mid-frequency sensorineural hearing impairment with childhood to late adolescence onset (DFNA21) (2000). *Clin Otolaryngol Allied Sci*, 25:45-54.
- Kurima K, Peters LM, Yang Y et al. Dominant and recessive deafness caused by mutations of a novel gene, TMC1, required for cochlear hair-cell function (2002). *Nat Genet*, 30:277-84.

- Lalwani AK, Brister JR, Fex J et al. A new nonsyndromic X-linked sensorineural hearing impairment linked to Xp21.2 (1994). *Am J Hum Genet*, 55:685-94.
- Lalwani AK, Goldstein JA, Kelley MJ, Luxford W, Castelein CM, Mhatre AN. Human nonsyndromic hereditary deafness DFNA17 is due to a mutation in nonmuscle myosin MYH9 (2000). *Am J Hum Genet*, 67:1121-28.
- Lalwani AK, Luxford WM, Mhatre AN, Attaie A, Wilcox ER, Castelein CM. A new locus for nonsyndromic hereditary hearing impairment, DFNA17, maps to chromosome 22 and represents a gene for cochleosaccular degeneration (1999). *Am J Hum Genet*, 64:318-23.
- Lee C, Iafrate AJ, Brothman AR. Copy number variations and clinical cytogenetic diagnosis of constitutional disorders (2007). *Nat Genet*, 39:S48-S54.
- Leon PE, Raventos H, Lynch E, Morrow J, King MC. The gene for an inherited form of deafness maps to chromosome 5q31 (1992). *Proc Natl Acad Sci U S A*, 89:5181-84.
- Lerer I, Sagi M, Malamud E, Levi H, Raas-Rothschild A, Abeliovich D. Contribution of connexin 26 mutations to nonsyndromic deafness in Ashkenazi patients and the variable phenotypic effect of the mutation 167delT (2000). *Am J Med Genet*, 95:53-56.
- Lesnik Oberstein SA, Kriek M, White SJ et al. Peters Plus syndrome is caused by mutations in B3GALT1, a putative glycosyltransferase (2006). *Am J Hum Genet*, 79:562-66.
- Lesperance MM, Hall JW, III, Bess FH et al. A gene for autosomal dominant nonsyndromic hereditary hearing impairment maps to 4p16.3 (1995). *Hum Mol Genet*, 4:1967-72.
- Leujene J, Turpin R, Gautier M. [Mongolism; a chromosomal disease (trisomy).] (1959). *Bull Acad Natl Med*, 143:256-65.
- Li G, Wang J, Rossiter SJ, Jones G, Cotton JA, Zhang S. The hearing gene Prestin reunites echolocating bats (2008). *Proc Natl Acad Sci U S A*, 105:13959-64.
- Li XC, Everett LA, Lalwani AK et al. A mutation in PDS causes non-syndromic recessive deafness (1998). *Nat Genet*, 18:215-17.
- Liu X, Han D, Li J et al. Loss-of-function mutations in the PRPS1 gene cause a type of nonsyndromic X-linked sensorineural deafness, DFN2 (2010). *Am J Hum Genet*, 86:65-71.

- Liu XZ, Ouyang XM, Xia XJ et al. Prestin, a cochlear motor protein, is defective in non-syndromic hearing loss (2003). *Hum Mol Genet*, 12:1155-62.
- Liu XZ, Walsh J, Mburu P et al. Mutations in the myosin VIIA gene cause non-syndromic recessive deafness (1997a). *Nat Genet*, 16:188-90.
- Liu XZ, Walsh J, Tamagawa Y et al. Autosomal dominant non-syndromic deafness caused by a mutation in the myosin VIIA gene (1997b). *Nat Genet*, 17:268-69.
- Liyanage M, Coleman A, du MS et al. Multicolour spectral karyotyping of mouse chromosomes (1996). *Nat Genet*, 14:312-15.
- Longhitano SB, Brunoni D. Genetic hearing loss: a study of 228 brazilians patients. (2000). *Genetics and Molecular Biology*, 23:25-27.
- Lowery MC, Morris CA, Ewart A et al. Strong correlation of elastin deletions, detected by FISH, with Williams syndrome: evaluation of 235 patients (1995). *Am J Hum Genet*, 57:49-53.
- Lu B, Poirier C, Gaspar T et al. A mutation in the inner mitochondrial membrane peptidase 2-like gene (Immp2l) affects mitochondrial function and impairs fertility in mice (2008). *Biol Reprod*, 78:601-10.
- Lu X, Shaw CA, Patel A et al. Clinical implementation of chromosomal microarray analysis: summary of 2513 postnatal cases (2007). *PLoS One*, 2:e327.
- Lynch ED, Lee MK, Morrow JE, Welcsh PL, Leon PE, King MC. Nonsyndromic deafness DFNA1 associated with mutation of a human homolog of the Drosophila gene diaphanous (1997). *Science*, 278:1315-18.
- Maclea K, Smith J, St HL et al. Axenfeld-Rieger malformation and distinctive facial features: Clues to a recognizable 6p25 microdeletion syndrome (2005). *Am J Med Genet A*, 132:381-85.
- Mamtani M, Anaya JM, He W, Ahuja SK. Association of copy number variation in the FCGR3B gene with risk of autoimmune diseases (2009). *Genes Immun*.
- Mangino M, Flex E, Capon F et al. Mapping of a new autosomal dominant nonsyndromic hearing loss locus (DFNA30) to chromosome 15q25-26 (2001). *Eur J Hum Genet*, 9:667-71.
- Manolis EN, Eavey RD, Sangwatanaroj S et al. Hereditary postlingual sensorineural hearing loss mapping to chromosome Xq21 (1999). *Am J Otol*, 20:621-26.

- Manolis EN, Yandavi N, Nadol JB, Jr. et al. A gene for non-syndromic autosomal dominant progressive postlingual sensorineural hearing loss maps to chromosome 14q12-13 (1996). *Hum Mol Genet*, 5:1047-50.
- Martinet D, Filges I, Besuchet SN et al. Subtelomeric 6p deletion: clinical and array-CGH characterization in two patients (2008). *Am J Med Genet A*, 146A:2094-102.
- Masmoudi S, Tlili A, Majava M et al. Mapping of a new autosomal recessive nonsyndromic hearing loss locus (DFNB32) to chromosome 1p13.3-22.1 (2003). *Eur J Hum Genet*, 11:185-88.
- Matthijs G, Claes S, Longo-Mbenza B, Cassiman JJ. Non-syndromic deafness associated with a mutation and a polymorphism in the mitochondrial 12S ribosomal RNA gene in a large Zairean pedigree (1996). *Eur J Hum Genet*, 4:46-51.
- Mburu P, Mustapha M, Varela A et al. Defects in whirlin, a PDZ domain molecule involved in stereocilia elongation, cause deafness in the whirler mouse and families with DFNB31 (2003). *Nat Genet*, 34:421-28.
- McCarthy MI, Abecasis GR, Cardon LR et al. Genome-wide association studies for complex traits: consensus, uncertainty and challenges (2008). *Nat Rev Genet*, 9:356-69.
- McGuirt WT, Prasad SD, Griffith AJ et al. Mutations in COL11A2 cause non-syndromic hearing loss (DFNA13) (1999). *Nat Genet*, 23:413-19.
- Medlej-Hashim M, Mustapha M, Chouery E et al. Non-syndromic recessive deafness in Jordan: mapping of a new locus to chromosome 9q34.3 and prevalence of DFNB1 mutations (2002). *Eur J Hum Genet*, 10:391-94.
- Melchionda S, Ahituv N, Bisceglia L et al. MYO6, the human homologue of the gene responsible for deafness in Snell's waltzer mice, is mutated in autosomal dominant nonsyndromic hearing loss (2001). *Am J Hum Genet*, 69:635-40.
- Menten B, Maas N, Thienpont B et al. Emerging patterns of cryptic chromosomal imbalance in patients with idiopathic mental retardation and multiple congenital anomalies: a new series of 140 patients and review of published reports (2006). *J Med Genet*, 43:625-33.
- Mercer CL, Browne CE, Barber JC et al. A complex medical phenotype in a patient with triplication of 2q12.3 to 2q13 characterized with oligonucleotide array CGH (2009). *Cytogenet Genome Res*, 124:179-86.

- Mir A, Ansar M, Chahrour MH et al. Mapping of a novel autosomal recessive nonsyndromic deafness locus (DFNB46) to chromosome 18p11.32-p11.31 (2005). *Am J Med Genet A*, 133A:23-26.
- Mochizuki T, Lemmink HH, Mariyama M et al. Identification of mutations in the alpha 3(IV) and alpha 4(IV) collagen genes in autosomal recessive Alport syndrome (1994). *Nat Genet*, 8:77-81.
- Modamio-Hoybjor S, Mencia A, Goodyear R et al. A mutation in CCDC50, a gene encoding an effector of epidermal growth factor-mediated cell signaling, causes progressive hearing loss (2007). *Am J Hum Genet*, 80:1076-89.
- Modamio-Hoybjor S, Moreno-Pelayo MA, Mencia A et al. A novel locus for autosomal dominant nonsyndromic hearing loss (DFNA44) maps to chromosome 3q28-29 (2003). *Hum Genet*, 112:24-28.
- Modamio-Hoybjor S, Moreno-Pelayo MA, Mencia A et al. A novel locus for autosomal dominant nonsyndromic hearing loss, DFNA50, maps to chromosome 7q32 between the DFNB17 and DFNB13 deafness loci (2004). *J Med Genet*, 41:e14.
- Moorhead M, Nowell PC, Mellman WJ, Battisp DM, HUNGERFORD DA. Chromosome preparations of leukocytes cultured from human peripheral blood (1960). *Exp Cell Res*, 20:613-16.
- Morell RJ, Friderici KH, Wei S, Elfenbein JL, Friedman TB, Fisher RA. A new locus for late-onset, progressive, hereditary hearing loss DFNA20 maps to 17q25 (2000). *Genomics*, 63:1-6.
- Moreno-Pelayo MA, Modamio-Hoybjor S, Mencia A et al. DFNA49, a novel locus for autosomal dominant non-syndromic hearing loss, maps proximal to DFNA7/DFNM1 region on chromosome 1q21-q23 (2003). *J Med Genet*, 40:832-36.
- Morton CC, Nance WE. Newborn hearing screening--a silent revolution (2006). *N Engl J Med*, 354:2151-64.
- Morton NE. Genetic epidemiology of hearing impairment (1991). *Ann N Y Acad Sci*, 630:16-31.
- Moynihan L, Houseman M, Newton V, Mueller R, Lench N. DFNB20: a novel locus for autosomal recessive, non-syndromal sensorineural hearing loss maps to chromosome 11q25-qter (1999). *Eur J Hum Genet*, 7:243-46.
- Mustapha M, Chardenoux S, Nieder A et al. A sensorineural progressive autosomal recessive form of isolated deafness, DFNB13, maps to chromosome 7q34-q36 (1998a). *Eur J Hum Genet*, 6:245-50.

- Mustapha M, Chouery E, Chardenoux S et al. DFNB31, a recessive form of sensorineural hearing loss, maps to chromosome 9q32-34 (2002a). *Eur J Hum Genet*, 10:210-212.
- Mustapha M, Chouery E, Torchard-Pagnez D et al. A novel locus for Usher syndrome type I, USH1G, maps to chromosome 17q24-25 (2002b). *Hum Genet*, 110:348-50.
- Mustapha M, Salem N, Weil D, El-Zir E, Loiselet J, Petit C. Identification of a locus on chromosome 7q31, DFNB14, responsible for prelingual sensorineural non-syndromic deafness (1998b). *Eur J Hum Genet*, 6:548-51.
- Mustapha M, Weil D, Chardenoux S et al. An alpha-tectorin gene defect causes a newly identified autosomal recessive form of sensorineural pre-lingual non-syndromic deafness, DFNB21 (1999). *Hum Mol Genet*, 8:409-12.
- Nakajima T, Kaur G, Mehra N, Kimura A. HIV-1/AIDS susceptibility and copy number variation in CCL3L1, a gene encoding a natural ligand for HIV-1 co-receptor CCR5 (2008). *Cytogenet Genome Res*, 123:156-60.
- Naz S, Alasti F, Mowjoodi A et al. Distinctive audiometric profile associated with DFNB21 alleles of TECTA (2003). *J Med Genet*, 40:360-363.
- Naz S, Giguere CM, Kohrman DC et al. Mutations in a novel gene, TMIE, are associated with hearing loss linked to the DFNB6 locus (2002). *Am J Hum Genet*, 71:632-36.
- Naz S, Griffith AJ, Riazuddin S et al. Mutations of ESPN cause autosomal recessive deafness and vestibular dysfunction (2004). *J Med Genet*, 41:591-95.
- Neyroud N, Tesson F, Denjoy I et al. A novel mutation in the potassium channel gene KVLQT1 causes the Jervell and Lange-Nielsen cardioauditory syndrome (1997). *Nat Genet*, 15:186-89.
- Nickerson E, Greenberg F, Keating MT, McCaskill C, Shaffer LG. Deletions of the elastin gene at 7q11.23 occur in approximately 90% of patients with Williams syndrome (1995). *Am J Hum Genet*, 56:1156-61.
- Nowell PC. Phytohemagglutinin: an initiator of mitosis in cultures of normal human leukocytes (1960). *Cancer Res*, 20:462-66.
- Nowell PC, Hungerford D. Chromosome studies on normal and leukemic human leukocytes (1960). *J Natl Cancer Inst*, 25:85-109.

- Nystad M, Fagerheim T, Brox V, Fortunato EA, Nilssen O. Human cytomegalovirus (HCMV) and hearing impairment: infection of fibroblast cells with HCMV induces chromosome breaks at 1q23.3, between loci DFNA7 and DFNA49 -- both involved in dominantly inherited, sensorineural, hearing impairment (2008). *Mutat Res*, 637:56-65.
- O'Neill ME, Marietta J, Nishimura D et al. A gene for autosomal dominant late-onset progressive non-syndromic hearing loss, DFNA10, maps to chromosome 6 (1996). *Hum Mol Genet*, 5:853-56.
- Oberstein SAL, Kriek M, White SJ et al. Peters Plus syndrome is caused by mutations in B3GALTL, a putative glycosyltransferase (2006). *Am J Hum Genet*, 79:562-66.
- Odeh H, Hagiwara N, Skynner M et al. Characterization of two transgene insertional mutations at pirouette, a mouse deafness locus (2004). *Audiol Neurotol*, 9:303-14.
- Oostlander AE, Meijer GA, Ylstra B. Microarray-based comparative genomic hybridization and its applications in human genetics (2004). *Clin Genet*, 66:488-95.
- Ouyang XM, Xia XJ, Verpy E et al. Mutations in the alternatively spliced exons of USH1C cause non-syndromic recessive deafness (2002). *Hum Genet*, 111:26-30.
- Pandya A, Xia X, Radnaabazar J et al. Mutation in the mitochondrial 12S rRNA gene in two families from Mongolia with matrilineal aminoglycoside ototoxicity (1997). *J Med Genet*, 34:169-72.
- Patau K, Smith D, Therman E, Inhorn S, Wagner H. Multiple congenital anomaly caused by an extra autosome (1960). *Lancet*, 1:790-793.
- Petek E, Windpassinger C, Vincent JB et al. Disruption of a novel gene (IMMP2L) by a breakpoint in 7q31 associated with Tourette syndrome (2001). *Am J Hum Genet*, 68:848-58.
- Peters LM, Anderson DW, Griffith AJ et al. Mutation of a transcription factor, TFCP2L3, causes progressive autosomal dominant hearing loss, DFNA28 (2002). *Hum Mol Genet*, 11:2877-85.
- Peters LM, Fridell RA, Boger ET et al. A locus for autosomal dominant progressive non-syndromic hearing loss, DFNA27, is on chromosome 4q12-13.1 (2008). *Clin Genet*, 73:367-72.
- Petersen MB, Wang Q, Willems PJ. Sex-linked deafness (2008). *Clin Genet*, 73:14-23.

- Pieke-Dahl S, Moller CG, Kelley PM et al. Genetic heterogeneity of Usher syndrome type II: localisation to chromosome 5q (2000). *J Med Genet*, 37:256-62.
- Pingault V, Bondurand N, Kuhlbrodt K et al. SOX10 mutations in patients with Waardenburg-Hirschsprung disease (1998). *Nat Genet*, 18:171-73.
- Pinkel D, Segraves R, Sudar D et al. High resolution analysis of DNA copy number variation using comparative genomic hybridization to microarrays (1998). *Nat Genet*, 20:207-11.
- Piper J, Rutovitz D, Sudar D et al. Computer image analysis of comparative genomic hybridization (1995). *Cytometry*, 19:10-26.
- Prezant TR, Agopian JV, Bohlman MC et al. Mitochondrial ribosomal RNA mutation associated with both antibiotic-induced and non-syndromic deafness (1993). *Nat Genet*, 4:289-94.
- Ptacek T, Li X, Kelley JM, Edberg JC. Copy number variants in genetic susceptibility and severity of systemic lupus erythematosus (2008). *Cytogenet Genome Res*, 123:142-47.
- Pulleyn LJ, Jackson AP, Roberts E et al. A new locus for autosomal recessive non-syndromal sensorineural hearing impairment (DFNB27) on chromosome 2q23-q31 (2000). *Eur J Hum Genet*, 8:991-93.
- Qiong P, Hu Z, Feng Y, Pan Q, Xia J, Xia K. Bioinformatics analysis of candidate genes and mutations in a congenital sensorineural hearing loss pedigree: detection of 52 genes for the DFNA52 locus (2008). *J Laryngol Otol*, 122:1029-36.
- Ramzan K, Shaikh RS, Ahmad J et al. A new locus for nonsyndromic deafness DFNB49 maps to chromosome 5q12.3-q14.1 (2005). *Hum Genet*, 116:17-22.
- Reardon W, OMahoney CF, Trembath R, Jan H, Phelps PD. Enlarged vestibular aqueduct: a radiological marker of pendred syndrome, and mutation of the PDS gene (2000). *QJM*, 93:99-104.
- Reid FM, Vernham GA, Jacobs HT. A novel mitochondrial point mutation in a maternal pedigree with sensorineural deafness (1994). *Hum Mutat*, 3:243-47.
- Riazuddin S, Anwar S, Fischer M et al. Molecular basis of DFNB73: mutations of BSND can cause nonsyndromic deafness or Bartter syndrome (2009). *Am J Hum Genet*, 85:273-80.

- Riazuddin S, Castelein CM, Ahmed ZM et al. Dominant modifier DFNM1 suppresses recessive deafness DFNB26 (2000). *Nat Genet*, 26:431-34.
- Riazuddin S, Khan SN, Ahmed ZM et al. Mutations in TRIOBP, which encodes a putative cytoskeletal-organizing protein, are associated with nonsyndromic recessive deafness (2006). *Am J Hum Genet*, 78:137-43.
- Richards AJ, Yates JR, Williams R et al. A family with Stickler syndrome type 2 has a mutation in the COL11A1 gene resulting in the substitution of glycine 97 by valine in alpha 1 (XI) collagen (1996). *Hum Mol Genet*, 5:1339-43.
- Robertson NG, Lu L, Heller S et al. Mutations in a novel cochlear gene cause DFNA9, a human nonsyndromic deafness with vestibular dysfunction (1998). *Nat Genet*, 20:299-303.
- Ropers HH, Hoeltzenbein M, Kalscheuer V et al. Nonsyndromic X-linked mental retardation: where are the missing mutations? (2003). *Trends Genet*, 19:316-20.
- Rosenberg C, Blakemore KJ, Kearns WG et al. Analysis of reciprocal translocations by chromosome painting: applications and limitations of the technique (1992). *Am J Hum Genet*, 50:700-705.
- Rosenberg C, Borovik CL, Canonaco RS, Sichero LC, Queiroz AP, Vianna-Morgante AM. Identification of a supernumerary marker derived from chromosome 17 using FISH (1995). *Am J Med Genet*, 59:33-35.
- Rosenberg C, Knijnenburg J, Bakker E et al. Array-CGH detection of micro rearrangements in mentally retarded individuals: Clinical significance of imbalances present both in affected children and normal parents (2006a). *J Med Genet*, 43:180-186.
- Rosenberg C, Knijnenburg J, Bakker E et al. Array-CGH detection of micro rearrangements in mentally retarded individuals: clinical significance of imbalances present both in affected children and normal parents (2006b). *J Med Genet*, 43:180-186.
- Rosenberg C, Knijnenburg J, Chauffaille ML et al. Array CGH detection of a cryptic deletion in a complex chromosome rearrangement (2005). *Hum Genet*, 116:390-394.
- Rowley JD. Identification of a translocation with quinacrine fluorescence in a patient with acute leukemia (1973). *Ann Genet*, 16:109-12.
- Ruf RG, Berkman J, Wolf MT et al. A gene locus for branchio-otic syndrome maps to chromosome 14q21.3-q24.3 (2003). *J Med Genet*, 40:515-19.

- Ruf RG, Xu PX, Silvius D et al. SIX1 mutations cause branchio-oto-renal syndrome by disruption of EYA1-SIX1-DNA complexes (2004). *Proc Natl Acad Sci U S A*, 101:8090-8095.
- Salam AA, Hafner FM, Linder TE, Spillmann T, Schinzel AA, Leal SM. A novel locus (DFNA23) for prelingual autosomal dominant nonsyndromic hearing loss maps to 14q21-q22 in a Swiss German kindred (2000). *Am J Hum Genet*, 66:1984-88.
- Sanchez-Martin M, Rodriguez-Garcia A, Perez-Losada J, Sagrera A, Read AP, Sanchez-Garcia I. SLUG (SNAIL2) deletions in patients with Waardenburg disease (2002). *Hum Mol Genet*, 11:3231-36.
- Sankila EM, Pakarinen L, Kaariainen H et al. Assignment of an Usher syndrome type III (USH3) gene to chromosome 3q (1995). *Hum Mol Genet*, 4:93-98.
- Santorelli FM, Barmada MA, Pons R, Zhang LL, DiMauro S. Leigh-type neuropathology in Pearson syndrome associated with impaired ATP production and a novel mtDNA deletion (1996). *Neurology*, 47:1320-1323.
- Santos RL, Hassan MJ, Sikandar S et al. DFNB68, a novel autosomal recessive non-syndromic hearing impairment locus at chromosomal region 19p13.2 (2006). *Hum Genet*, 120:85-92.
- Sartorato EL, Gottardi E, de Oliveira CA et al. Determination of the frequency of the 35delG allele in Brazilian neonates (2000). *Clin Genet*, 58:339-40.
- Schulze-Bahr E, Wang Q, Wedekind H et al. KCNE1 mutations cause jervell and Lange-Nielsen syndrome (1997). *Nat Genet*, 17:267-68.
- Scott DA, Carmi R, Elbedour K, Yosefsberg S, Stone EM, Sheffield VC. An autosomal recessive nonsyndromic-hearing-loss locus identified by DNA pooling using two inbred Bedouin kindreds (1996). *Am J Hum Genet*, 59:385-91.
- Scott HS, Kudoh J, Wattenhofer M et al. Insertion of beta-satellite repeats identifies a transmembrane protease causing both congenital and childhood onset autosomal recessive deafness (2001). *Nat Genet*, 27:59-63.
- Sebat J, Lakshmi B, Troge J et al. Large-scale copy number polymorphism in the human genome (2004). *Science*, 305:525-28.
- Selicorni A, Guerneri S, Ratti A, Pizzuti A. Cytogenetic mapping of a novel locus for type II Waardenburg syndrome (2002). *Hum Genet*, 110:64-67.
- Seviour KB, Hatamochi A, Stewart IA et al. Mitochondrial A7445G mutation in two pedigrees with palmoplantar keratoderma and deafness (1998). *Am J Med Genet*, 75:179-85.

- Shabbir MI, Ahmed ZM, Khan SY et al. Mutations of human TMHS cause recessively inherited non-syndromic hearing loss (2006). *J Med Genet*, 43:634-40.
- Shaffer LG, Bejjani BA. A cytogeneticist's perspective on genomic microarrays (2004). *Hum Reprod Update*, 10:221-26.
- Shaffer LG, Bejjani BA, Torchia B, Kirkpatrick S, Coppinger J, Ballif BC. The identification of microdeletion syndromes and other chromosome abnormalities: cytogenetic methods of the past, new technologies for the future (2007). *Am J Med Genet C Semin Med Genet*, 145C:335-45.
- Shahin H, Walsh T, Sobe T et al. Mutations in a novel isoform of TRIOBP that encodes a filamentous-actin binding protein are responsible for DFNB28 recessive nonsyndromic hearing loss (2006). *Am J Hum Genet*, 78:144-52.
- Shaikh RS, Ramzan K, Nazli S et al. A new locus for nonsyndromic deafness DFNB51 maps to chromosome 11p13-p12 (2005). *Am J Med Genet A*, 138:392-95.
- Sharp AJ. Emerging themes and new challenges in defining the role of structural variation in human disease (2009). *Hum Mutat*, 30:135-44.
- Shaw-Smith C, Pittman AM, Willatt L et al. Microdeletion encompassing MAPT at chromosome 17q21.3 is associated with developmental delay and learning disability (2006). *Nat Genet*, 38:1032-37.
- Shaw-Smith C, Redon R, Rickman L et al. Microarray based comparative genomic hybridisation (array-CGH) detects submicroscopic chromosomal deletions and duplications in patients with learning disability/mental retardation and dysmorphic features (2004). *J Med Genet*, 41:241-48.
- Shinawi M, Shao L, Jeng LJ et al. Low-level mosaicism of trisomy 14: phenotypic and molecular characterization (2008). *Am J Med Genet A*, 146A:1395-405.
- Siemering K, Manji SS, Hutchison WM, Du SD, Phelan D, Dahl HH. Detection of mutations in genes associated with hearing loss using a microarray-based approach (2006). *J Mol Diagn*, 8:483-89.
- Singleton AB, Farrer M, Johnson J et al. alpha-Synuclein locus triplication causes Parkinson's disease (2003). *Science*, 302:841.
- Slater HR, Bailey DK, Ren H et al. Analysis of SNP content of 82 common copy-number polymorphisms from the Database of Genomic Variations (2006). *Am J Hum Genet*, 78:730-731.

- Smith RJ, Pelias MZ, Daiger SP, Keats B, Kimberling W, Hejtmancik JF. Clinical variability and genetic heterogeneity within the Acadian Usher population (1992). *Am J Med Genet*, 43:964-69.
- Snoeckx RL, Kremer H, Ensink RJ et al. A novel locus for autosomal dominant non-syndromic hearing loss, DFNA31, maps to chromosome 6p21.3 (2004). *J Med Genet*, 41:11-13.
- Solinas-Toldo S, Lampel S, Stilgenbauer S et al. Matrix-based comparative genomic hybridization: biochips to screen for genomic imbalances (1997). *Genes Chromosomes Cancer*, 20:399-407.
- Stohler R, Kucharski E, Farrow E et al. A case of de novo partial tetrasomy of distal 6p and review of the literature (2007). *Am J Med Genet A*, 143A:1978-83.
- Sue CM, Tanji K, Hadjigeorgiou G et al. Maternally inherited hearing loss in a large kindred with a novel T7511C mutation in the mitochondrial DNA tRNA(Ser(UCN)) gene (1999). *Neurology*, 52:1905-8.
- Tamagawa Y, Kitamura K, Ishida T et al. A gene for a dominant form of non-syndromic sensorineural deafness (DFNA11) maps within the region containing the DFNB2 recessive deafness gene (1996). *Hum Mol Genet*, 5:849-52.
- Tariq A, Santos RL, Khan MN et al. Localization of a novel autosomal recessive nonsyndromic hearing impairment locus DFNB65 to chromosome 20q13.2-q13.32 (2006). *J Mol Med*, 84:484-90.
- Tassabehji M, Newton VE, Leverton K et al. PAX3 gene structure and mutations: close analogies between Waardenburg syndrome and the Splotch mouse (1994). *Hum Mol Genet*, 3:1069-74.
- Tassabehji M, Read AP, Newton VE et al. Waardenburg's syndrome patients have mutations in the human homologue of the Pax-3 paired box gene ((1992). *Nature*, 355:635-36.
- Tekin M, Duman T, Bogoclu G et al. Frequency of mtDNA A1555G and A7445G mutations among children with prelingual deafness in Turkey (2003). *Eur J Pediatr*, 162:154-58.
- Tekin M, Ozturkmen AH, Fitoz S et al. Homozygous FGF3 mutations result in congenital deafness with inner ear agenesis, microtia, and microdontia (2008). *Clin Genet*, 73:554-65.
- Tessa A, Giannotti A, Tieri L, Vilarinho L, Marotta G, Santorelli FM. Maternally inherited deafness associated with a T1095C mutation in the mDNA (2001). *Eur J Hum Genet*, 9:147-49.

- Thirlwall AS, Brown DJ, McMillan PM, Barker SE, Lesperance MM. Phenotypic characterization of hereditary hearing impairment linked to DFNA25 (2003). *Arch Otolaryngol Head Neck Surg*, 129:830-835.
- Thyagarajan D, Bressman S, Bruno C et al. A novel mitochondrial 12SrRNA point mutation in parkinsonism, deafness, and neuropathy (2000). *Ann Neurol*, 48:730-736.
- Tiranti V, Chariot P, Carella F et al. Maternally inherited hearing loss, ataxia and myoclonus associated with a novel point mutation in mitochondrial tRNA^{Ser}(UCN) gene (1995). *Hum Mol Genet*, 4:1421-27.
- Tjio H, Levan A. The chromosome numbers of man (1956). *Hereditas*, 42:1-6.
- Tlili A, Mannikko M, Charfedine I et al. A novel autosomal recessive non-syndromic deafness locus, DFNB66, maps to chromosome 6p21.2-22.3 in a large Tunisian consanguineous family (2005). *Hum Hered*, 60:123-28.
- Tlili A, Masmoudi S, Dhouib H et al. Localization of a novel autosomal recessive non-syndromic hearing impairment locus DFNB63 to chromosome 11q13.3-q13.4 (2007). *Ann Hum Genet*, 71:271-75.
- Tranebjaerg L, Jensen PK, Van GM et al. Neuronal cell death in the visual cortex is a prominent feature of the X-linked recessive mitochondrial deafness-dystonia syndrome caused by mutations in the TIMM8a gene (2001). *Ophthalmic Genet*, 22:207-23.
- Tranebjaerg L, Schwartz C, Eriksen H et al. A new X linked recessive deafness syndrome with blindness, dystonia, fractures, and mental deficiency is linked to Xq22 (1995). *J Med Genet*, 32:257-63.
- Trask BJ. Human cytogenetics: 46 chromosomes, 46 years and counting (2002). *Nat Rev Genet*, 3:769-78.
- Tuzun E, Sharp AJ, Bailey JA et al. Fine-scale structural variation of the human genome (2005). *Nat Genet*, 37:727-32.
- Tyson C, McGillivray B, Chijiwa C, Rajcan-Separovic E. Elucidation of a cryptic interstitial 7q31.3 deletion in a patient with a language disorder and mild mental retardation by array-CGH (2004). *Am J Med Genet A*, 129A:254-60.
- Tyson J, Bellman S, Newton V et al. Mapping of DFN2 to Xq22 (1996). *Hum Mol Genet*, 5:2055-60.
- Tyson J, Tranebjaerg L, Bellman S et al. Isk and KvLQT1: mutation in either of the two subunits of the slow component of the delayed rectifier potassium channel can cause Jervell and Lange-Nielsen syndrome (1997). *Hum Mol Genet*, 6:2179-85.

- Uhrig S, Schuffenhauer S, Fauth C et al. Multiplex-FISH for pre- and postnatal diagnostic applications (1999). *Am J Hum Genet*, 65:448-62.
- Vahava O, Morell R, Lynch ED et al. Mutation in transcription factor POU4F3 associated with inherited progressive hearing loss in humans (1998). *Science*, 279:1950-1954.
- Van Camp G., Kunst H, Flothmann K et al. A gene for autosomal dominant hearing impairment (DFNA14) maps to a region on chromosome 4p16.3 that does not overlap the DFNA6 locus (1999). *J Med Genet*, 36:532-36.
- Van Camp G, Coucke P, Balemans W et al. Localization of a gene for non-syndromic hearing loss (DFNA5) to chromosome 7p15 (1995). *Hum Mol Genet*, 4:2159-63.
- Van Camp G, Snoeckx RL, Hilgert N et al. A new autosomal recessive form of Stickler syndrome is caused by a mutation in the COL9A1 gene (2006). *Am J Hum Genet*, 79:449-57.
- van den Ouweland JM, Lemkes HH, Ruitenbeek W et al. Mutation in mitochondrial tRNA(Leu)(UUR) gene in a large pedigree with maternally transmitted type II diabetes mellitus and deafness (1992). *Nat Genet*, 1:368-71.
- Van Laer L, Huizing EH, Verstreken M et al. Nonsyndromic hearing impairment is associated with a mutation in DFNA5 (1998). *Nat Genet*, 20:194-97.
- van Wijk E, Krieger E, Kemperman MH et al. A mutation in the gamma actin 1 (ACTG1) gene causes autosomal dominant hearing loss (DFNA20/26) (2003). *J Med Genet*, 40:879-84.
- Verhoeven K, Ensink RJ, Tiranti V et al. Hearing impairment and neurological dysfunction associated with a mutation in the mitochondrial tRNA^{Ser}(UCN) gene (1999). *Eur J Hum Genet*, 7:45-51.
- Verhoeven K, Van CG, Govaerts PJ et al. A gene for autosomal dominant nonsyndromic hearing loss (DFNA12) maps to chromosome 11q22-24 (1997). *Am J Hum Genet*, 60:1168-73.
- Verhoeven K, Van LL, Kirschhofer K et al. Mutations in the human alpha-tectorin gene cause autosomal dominant non-syndromic hearing impairment (1998). *Nat Genet*, 19:60-62.
- Verpy E, Leibovici M, Zwaenepoel I et al. A defect in harmonin, a PDZ domain-containing protein expressed in the inner ear sensory hair cells, underlies Usher syndrome type 1C (2000). *Nat Genet*, 26:51-55.

- Verpy E, Masmoudi S, Zwaenepoel I et al. Mutations in a new gene encoding a protein of the hair bundle cause non-syndromic deafness at the DFNB16 locus (2001). *Nat Genet*, 29:345-49.
- Veske A, Oehlmann R, Younus F et al. Autosomal recessive non-syndromic deafness locus (DFNB8) maps on chromosome 21q22 in a large consanguineous kindred from Pakistan (1996). *Hum Mol Genet*, 5:165-68.
- Vialettes BH, Paquis-Flucklinger V, Pelissier JF et al. Phenotypic expression of diabetes secondary to a T14709C mutation of mitochondrial DNA. Comparison with MIDD syndrome (A3243G mutation): a case report (1997). *Diabetes Care*, 20:1731-37.
- Vikkula M, Mariman EC, Lui VC et al. Autosomal dominant and recessive osteochondrodysplasias associated with the COL11A2 locus (1995). *Cell*, 80:431-37.
- Vissers LE, de Vries BB, Osoegawa K et al. Array-based comparative genomic hybridization for the genomewide detection of submicroscopic chromosomal abnormalities (2003). *Am J Hum Genet*, 73:1261-70.
- Vissers LE, van Ravenswaaij CM, Admiraal R et al. Mutations in a new member of the chromodomain gene family cause CHARGE syndrome (2004). *Nat Genet*, 36:955-57.
- Vollrath MA, Kwan KY, Corey DP. The micromachinery of mechanotransduction in hair cells (2007). *Annu Rev Neurosci*, 30:339-65.
- Vore AP, Chang EH, Hoppe JE et al. Deletion of and novel missense mutation in POU3F4 in 2 families segregating X-linked nonsyndromic deafness (2005). *Arch Otolaryngol Head Neck Surg*, 131:1057-63.
- Wagenstaller J, Spranger S, Lorenz-Depiereux B et al. Copy-number variations measured by single-nucleotide-polymorphism oligonucleotide arrays in patients with mental retardation (2007). *Am J Hum Genet*, 81:768-79.
- Wain LV, Pedroso I, Landers JE et al. The role of copy number variation in susceptibility to amyotrophic lateral sclerosis: genome-wide association study and comparison with published loci (2009). *PLoS One*, 4:e8175.
- Wajid M, Abbasi AA, Ansar M et al. DFNB39, a recessive form of sensorineural hearing impairment, maps to chromosome 7q11.22-q21.12 (2003). *Eur J Hum Genet*, 11:812-15.
- Walsh T, Walsh V, Vreugde S et al. From flies' eyes to our ears: mutations in a human class III myosin cause progressive nonsyndromic hearing loss DFNB30 (2002). *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99:7518-23.

- Wang A, Liang Y, Fridell RA et al. Association of unconventional myosin MYO15 mutations with human nonsyndromic deafness DFNB3 (1998). *Science*, 280:1447-51.
- Wang QJ, Li QZ, Rao SQ et al. AUNX1, a novel locus responsible for X linked recessive auditory and peripheral neuropathy, maps to Xq23-27.3 (2006). *J Med Genet*, 43:e33.
- Wang QJ, Lu CY, Li N et al. Y-linked inheritance of non-syndromic hearing impairment in a large Chinese family (2004). *J Med Genet*, 41:e80.
- Warner LE, Hilz MJ, Appel SH et al. Clinical phenotypes of different MPZ (P0) mutations may include Charcot-Marie-Tooth type 1B, Dejerine-Sottas, and congenital hypomyelination (1996). *Neuron*, 17:451-60.
- Waryah AM, Rehman A, Ahmed ZM et al. DFNB74, a novel autosomal recessive nonsyndromic hearing impairment locus on chromosome 12q14.2-q15 (2009). *Clin Genet*, 76:270-275.
- Wayne S, Der K, V, Schloss M et al. Localization of the Usher syndrome type ID gene (Ush1D) to chromosome 10 (1996). *Hum Mol Genet*, 5:1689-92.
- Wayne S, Robertson NG, Declau F et al. Mutations in the transcriptional activator EYA4 cause late-onset deafness at the DFNA10 locus (2001). *Hum Mol Genet*, 10:195-200.
- Weil D, Blanchard S, Kaplan J et al. Defective myosin VIIA gene responsible for Usher syndrome type 1B (1995). *Nature*, 374:60-61.
- Weil D, El-Amraoui A, Masmoudi S et al. Usher syndrome type I G (USH1G) is caused by mutations in the gene encoding SANS, a protein that associates with the USH1C protein, harmonin (2003). *Hum Mol Genet*, 12:463-71.
- Weil D, Kussel P, Blanchard S et al. The autosomal recessive isolated deafness, DFNB2, and the Usher 1B syndrome are allelic defects of the myosin-VIIA gene (1997). *Nat Genet*, 16:191-93.
- Weston MD, Lujendijk MW, Humphrey KD, Moller C, Kimberling WJ. Mutations in the VLGR1 gene implicate G-protein signaling in the pathogenesis of Usher syndrome type II (2004). *Am J Hum Genet*, 74:357-66.
- Wilcox ER, Burton QL, Naz S et al. Mutations in the gene encoding tight junction claudin-14 cause autosomal recessive deafness DFNB29 (2001). *Cell*, 104:165-72.
- Williams SR, Mullegama SV, Rosenfeld JA et al. Haploinsufficiency of MBD5 associated with a syndrome involving microcephaly, intellectual disabilities, severe speech impairment, and seizures (2009). *Eur J Hum Genet*.

- Winship IM, Babaya M, Ramesar RS. X-linked ocular albinism and sensorineural deafness: linkage to Xp22.3 (1993). *Genomics*, 18:444-45.
- Wu YL, Yang Y, Chung EK et al. Phenotypes, genotypes and disease susceptibility associated with gene copy number variations: complement C4 CNVs in European American healthy subjects and those with systemic lupus erythematosus (2008). *Cytogenet Genome Res*, 123:131-41.
- Xia J, Deng H, Feng Y et al. A novel locus for autosomal dominant nonsyndromic hearing loss identified at 5q31.1-32 in a Chinese pedigree (2002). *J Hum Genet*, 47:635-40.
- Xia JH, Liu CY, Tang BS et al. Mutations in the gene encoding gap junction protein beta-3 associated with autosomal dominant hearing impairment (1998). *Nat Genet*, 20:370-373.
- Xiao S, Yu C, Chou X et al. Dentinogenesis imperfecta 1 with or without progressive hearing loss is associated with distinct mutations in DSPP (2001). *Nat Genet*, 27:201-4.
- Yafai Y, Lange J, Wiedemann P, Reichenbach A, Eichler W. Pigment epithelium-derived factor acts as an opponent of growth-stimulatory factors in retinal glial-endothelial cell interactions (2007). *Glia*, 55:642-51.
- Yan D, Ke X, Blanton SH et al. A novel locus for autosomal dominant non-syndromic deafness, DFNA53, maps to chromosome 14q11.2-q12 (2006). *J Med Genet*, 43:170-174.
- Yang T, Vidarsson H, Rodrigo-Blomqvist S, Rosengren SS, Enerback S, Smith RJ. Transcriptional control of SLC26A4 is involved in Pendred syndrome and nonsyndromic enlargement of vestibular aqueduct (DFNB4) (2007a). *Am J Hum Genet*, 80:1055-63.
- Yang Y, Chung EK, Wu YL et al. Gene copy-number variation and associated polymorphisms of complement component C4 in human systemic lupus erythematosus (SLE): low copy number is a risk factor for and high copy number is a protective factor against SLE susceptibility in European Americans (2007b). *Am J Hum Genet*, 80:1037-54.
- Yasunaga S, Grati M, Cohen-Salmon M et al. A mutation in OTOF, encoding otoferlin, a FER-1-like protein, causes DFNB9, a nonsyndromic form of deafness (1999). *Nat Genet*, 21:363-69.
- Young TL, Ives E, Lynch E et al. Non-syndromic progressive hearing loss DFNA38 is caused by heterozygous missense mutation in the Wolfram syndrome gene WFS1 (2001). *Hum Mol Genet*, 10:2509-14.

- Yuan H, Qian Y, Xu Y et al. Cosegregation of the G7444A mutation in the mitochondrial COI/tRNA(Ser(UCN)) genes with the 12S rRNA A1555G mutation in a Chinese family with aminoglycoside-induced and nonsyndromic hearing loss (2005). *Am J Med Genet A*, 138A:133-40.
- Zhao E, Li Y, Fu X et al. Cloning and expression of human GTDC1 gene (glycosyltransferase-like domain containing 1) from human fetal library (2004a). *DNA Cell Biol*, 23:183-87.
- Zhao H, Li R, Wang Q et al. Maternally inherited aminoglycoside-induced and nonsyndromic deafness is associated with the novel C1494T mutation in the mitochondrial 12S rRNA gene in a large Chinese family (2004b). *Am J Hum Genet*, 74:139-52.
- Zheng J, Shen W, He DZ, Long KB, Madison LD, Dallos P. Prestin is the motor protein of cochlear outer hair cells (2000). *Nature*, 405:149-55.
- Zhu M, Yang T, Wei S et al. Mutations in the gamma-actin gene (ACTG1) are associated with dominant progressive deafness (DFNA20/26) (2003). *Am J Hum Genet*, 73:1082-91.
- Zwaenepoel I, Mustapha M, Leibovici M et al. Otoancorin, an inner ear protein restricted to the interface between the apical surface of sensory epithelia and their overlying acellular gels, is defective in autosomal recessive deafness DFNB22 (2002). *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99:6240-6245.

ANEXOS

Anexo 1 – Ofício e protocolo de aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE BIOCIÊNCIAS

OF.CEP/IB/003/2008

São Paulo, 13 de fevereiro de 2008.

Prezada Senhora

Dirijo-me a V. Sa. para informar que o Comitê de Ética em Pesquisa deste Instituto, em reunião realizada em 28 de agosto de 2007, **APROVOU** o Projeto de Pesquisa “Surdez sindrômica: dos cromossomos aos genes” de sua responsabilidade (**Protocolo nº 069/2007**), conforme cópia do Parecer em anexo.

Lembramos que deverão ser apresentados relatórios anual e final, conforme modelo anexo.

Atenciosamente.

A handwritten signature in black ink, reading "Maria Rita dos Santos e Passos Bueno".

Profa. Dra. Maria Rita dos Santos e Passos Bueno

Coordenadora do Comitê de Ética em Pesquisa – Seres Humanos
IBUSP

CC. Profa. Dra. Carla Rosemberg

Ilma. Sra.

ANA LÚCIA PEREIRA MONTEIRO CATELANI

Departamento de Genética e Biologia Evolutiva do IBUSP

Cont. do Anexo 1 - Ofício e protocolo de aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO INSTITUTO DE BIOCIÊNCIAS

PARECER CONSUBSTANCIADO DE PROJETO DE PESQUISA

PROTOCOLO CEP-IBUSP – 069/2007

TÍTULO DO PROJETO DE PESQUISA: “Surdez síndrômica: dos cromossomos aos genes”

Folha de Rosto: 139334

Pesquisador Responsável: Ana Lúcia Pereira Monteiro Catelani

Orientadora: Profa. Dra. Carla Rosenberg

Objetivos do projeto de pesquisa: Identificar novos genes associados à surdez. Com este intuito, serão estudados citogeneticamente e molecularmente (array-CGH) pacientes com surdez associada a outras alterações clínicas (surdez síndrômica) e que não tenham causa etiológica ainda identificada.

Justificativa: A pesquisa contém descrição dos propósitos e das hipóteses a serem testadas, assim como os antecedentes científicos e os dados que justificam a pesquisa.

Local da realização do projeto, duração e financiamento: O estudo será desenvolvido no Centro de Estudos do Genoma Humano do Departamento de Genética e Biologia Evolutiva do Instituto de Biociências da USP e Laboratório Fleury, com duração de 4 anos. Contará com financiamento da FAPESP.

Comentários: O Projeto de Pesquisa está detalhado e ordenado em Introdução, Justificativa, Objetivos, Casuística e Métodos, Proposta de Cronograma e Referências bibliográficas. O Laboratório no qual a pesquisadora atua, presta serviço de Aconselhamento Genético para as famílias de afetados há vários anos. Os testes moleculares são realizados em DNA extraído de sangue periférico ou mucosa oral cuja coleta representa risco mínimo para os pacientes. Há anuência da instituição. O projeto se constituirá na Tese de Doutorado da pesquisadora que está matriculada no Programa Biologia/Genética do Departamento de Genética e Biologia Evolutiva – IBUSP. O laboratório conta com a infra-estrutura necessária para o desenvolvimento da pesquisa e para recepção, entrevista e coleta de sangue periférico dos pacientes e familiares. Aos pacientes e familiares serão fornecidos os resultados da pesquisa (positivos ou negativos) e o sigilo e o princípio da confiabilidade foram garantidos. As informações relativas aos sujeitos da pesquisa, pacientes e familiares estão bem delineadas. O Termo de Consentimento Livre e Esclarecido foi apresentado e está bem redigido; há o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido para maiores e menores de 18 anos. Os pacientes com suspeita clínica triados anteriormente serão reconvocados e analisados visando conseguir identificar a etiologia da doença.

Considerações: O projeto apresentado preenche todos os pré-requisitos éticos conforme resolução CNS 196/96. Diante do Exposto, o Comitê de Ética em Pesquisa – Seres Humanos, de acordo com as atribuições definidas na Resolução CNS – 196/96, aprova o projeto de pesquisa proposto. A pesquisadora responsável deverá apresentar, ao CEP, relatórios anual e final.

Situação: Projeto APROVADO.

São Paulo, 28 de agosto de 2007.

Profa. Dra. Maria Rita dos Santos e Passos Bueno
Coordenadora do Comitê de Ética em Pesquisa – Seres Humanos
IBUSP

Anexo 2 – Termo de consentimento livre e esclarecido (menores de 18 anos).

Universidade de São Paulo

Instituto de Biociências

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

(menores de 18 anos)

ESTUDO: “Surdez síndrome: dos cromossomos aos genes”

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.

Este estudo tem por objetivo estudar citogeneticamente e molecularmente (array-CGH) indivíduos que apresentam surdez associada com outras alterações fenotípicas, cujo quadro clínico não permitiu classificar em síndrome conhecida.

Eu, RG,
abaixo assinado(a), concordo de livre e espontânea vontade que meu (minha) filho(a)
..... nascido(a) em ____ / ____ /____, ,
participe do estudo “Surdez síndrome: dos cromossomos aos genes”, e esclareço que
obtive todas informações necessárias.

Estou ciente que:

- I) O estudo se faz necessário para que possam descobrir as possíveis causas da doença denominada “*Surdez sindrômica: dos cromossomos aos genes*”(explicar o que significa os termos científicos).
- II) Serão feitas coletas de sangue para realizar os testes necessários no(a) meu(minha) filho(a);
- III) Essas coletas serão feitas 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;
- IV) Tenho a liberdade de desistir ou interromper a colaboração neste estudo no momento em que desejar, sem necessidade de qualquer explicação;
- V) 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;
- VI) 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;
- 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 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 2007.

Participante:.....

Pesquisador Responsável pelo Projeto:

Dr. RESPONSÁVEL (NOME , ESPECIALIZAÇÃO, NÚMERO DO CRM)

Telefone para contato:

Anexo 3 - Termo de consentimento livre e esclarecido (maiores de 18 anos).

Universidade de São Paulo

Instituto de Biociências

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

(maiores de 18 anos)

ESTUDO: “ Surdez sindrômica: dos cromossomos aos genes”

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.

Este estudo tem por objetivo estudar citogeneticamente e molecularmente (array-CGH) indivíduos que apresentam surdez associada com outras alterações fenotípicas, cujo quadro clínico não permitiu classificar em síndrome conhecida.

Eu,.....,
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 “ ***Surdez sindrômica: dos cromossomos
aos genes***”, e esclareço que obtive todas as informações.

Estou ciente que:

- X) O estudo se faz necessário para que se possam descobrir as possíveis causas da doença denominada “ *Surdez sindrômica: dos cromossomos aos genes*” (explicar o que significam os termos científicos, em linguagem para leigo, ou seja bem simples);
- XI) Serão feitas coletas de sangue para realizar os testes necessários;
- XII) Essa(s) coleta(s) serão feitas apenas para este estudo e em nada influenciará (influenciarão) o meu tratamento; não vai (vão) me curar; não vai (vão) me causar nenhum problema, exceto o pequeno incômodo de dor no momento da coleta (introdução da agulha para retirada do sangue)
- XIII) Tenho a liberdade de desistir ou de interromper a colaboração neste estudo no momento em que desejar, sem necessidade de qualquer explicação;
- XIV) A desistência não causará nenhum prejuízo à minha saúde ou bem estar físico. Não virá interferir no atendimento ou tratamento médico;
- XV) 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;
- XVI) 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.
- XVII) 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 2007.

Participante:.....

Pesquisador Responsável pelo Projeto:

Dr. RESPONSÁVEL (NOME , ESPECIALIZAÇÃO, NÚMERO DO CRM)

Telefone para contato:

Anexo 4 – Anamnese clínico-genética

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

DADOS PESSOAIS:

DATA:-----CASO Nº:-----
NOME:-----
NASC.:-----IDADE:----- SEXO: M() F()
NATURAL: ----- OCUPAÇÃO:-----
ESCOLARIDADE:-----
GRUPO ÉTNICO B() P() N() O()
PAI:-----
IDADE:----- NATURAL:-----
OCUP.:----- ESCOL.:-----
MÃE:-----
IDADE:----- NATURAL:-----
OCUP.:----- ESCOL.:-----
ENDEREÇO:-----

TELEFONE:-----
ORIGEM DO PACIENTE:-----
MOTIVO DA CONSULTA:-----

HISTÓRICO FAMILIAL:

CONSANGUINIDADE PARENTAL: () NÃO () SIM GRAU:-----
OUTROS CASOS DE SURDEZ NA FAMÍLIA: () NÃO () SIM
CASOS DE DOENÇAS GENÉTICAS NA FAMÍLIA: () NÃO () SIM
CONSULENTE JÁ TEVE ABORTOS: () NÃO () SIM

HEREDOGRAMA:

CARACTERIZAÇÃO DO TIPO DE SURDEZ:

- () BILATERAL () UNILATERAL () ?
() ESTACIONÁRIA () PROGRESSIVA () ?
() LEVE (27-40 DB) () MODERADA (40-65 DB) () GRAVE (65-95 DB)
() PROFUNDA (> 95 DB)
() CONDUTIVA () NEUROSSENSORIAL () MISTA () ?
ETIOLOGIA: () CONGÊNITA () PÓS-NATAL IDADE DE INÍCIO:-----
ÉPOCA EM QUE PERCEBERAM O PROBLEMA:-----
ÉPOCA EM QUE FOI FEITO O DIAGNÓSTICO DE SURDEZ:-----
() ZUMBIDO () TONTURA

GESTACÃO:

- () SEM INTERCORRÊNCIAS () COM INTERCORRÊNCIAS
() FEZ PRÉ-NATAL INFECÇÕES MATERNAS: () NÃO () SIM
() CMV () RUBÉOLA () TOXOPLASMOSE () SÍFILIS () HERPES
() OUTRAS DOENÇAS OU SINTOMAS -----
USO DE DROGAS PELA MÃE: () NÃO () SIM QUAIS?:
RAIO X NA GESTACÃO: () NÃO () SIM
OBSERVAÇÕES:-----

PERÍODO PERINATAL:

- () SEM INTERCORRÊNCIAS () COM INTERCORRÊNCIAS
PARTO: () NORMAL () CESÁREA MOTIVO:-----
() FORCEPS
CRONOLOGIA: () TERMO () PRÉ-TERMO () PÓS-TERMO
PESO AO NASCER:----- COMPRIMENTO AO NASCER:-----
BOAS CONDIÇÕES DE VITALIDADE: () NÃO () SIM
() ANOXIA () CIANOSE () ICTERÍCIA
() INCOMPATIBILIDADE DE Rh () FOTOTERAPIA () INCUBADORA
() FEBRE ALTA () DEFEITOS FÍSICOS
SAIU DO HOSPITAL COM A MÃE: () NÃO () SIM
OBSERVAÇÕES: -----

DESENVOLVIMENTO NEUROPSICOMOTOR:

- DNPM: () NORMAL () COM ATRASO
BEBÊ () FIRME () MOLE
SUSTENTOU PESCOÇO: -----
SENTOU COM APOIO: -----
SENTOU SEM APOIO: -----
ENGATINHOU: -----
ANDOU: -----
PRIMEIRAS PALAVRAS: -----

() ANTIBIÓTICOS AMINOGLICOSÍDEOS () USO DE OUTRAS DROGAS
OTOTÓXICAS

() INFECÇÕES DE OUVIDO () DIABETES MELITO

() MENINGITE () SARAMPO () CAXUMBA

() MENINGOENCEFALITES () INFECÇÃO DAS VIAS AÉREAS
SUPERIORES

() EXPOSIÇÃO CONSTANTE A RUÍDOS

OUTRAS DOENÇAS, INTERNAÇÕES, CIRURGIAS: -----

EXAMES REALIZADOS: -----

HIPÓTESE DIAGNÓSTICA:

() HEREDITÁRIA () ADQUIRIDA ()?

() ISOLADA () SINDRÔMICA ()?

PAIS PRETENDEM TER MAIS FILHOS: () NÃO () SIM

FIZERAM () LAQUEADURA () VASECTOMIA

DIAGNÓSTICO: -----

CONDUTA: -----

PUBLICAÇÃO

Short Report

Chromosome imbalances in syndromic hearing loss

Catelani ALPM, Krepischi ACV, Kim CA, Kok F, Otto PA, Auricchio MTBM, Mazzeu JF, Uehara DT, Costa SS, Knijnenburg J, Tabith Jr A, Vianna-Morgante AM, Mingroni-Netto RC, Rosenberg C. Chromosome imbalances in syndromic hearing loss.

Clin Genet 2009; 76: 458–464. © John Wiley & Sons A/S, 2009

The cause of hearing impairment has not been elucidated in a large proportion of patients. We screened by 1-Mb array-based comparative genomic hybridization (aCGH) 29 individuals with syndromic hearing impairment whose clinical features were not typical of known disorders. Rare chromosomal copy number changes were detected in eight patients, four *de novo* imbalances and four inherited from a normal parent. The *de novo* alterations define candidate chromosome segments likely to harbor dosage-sensitive genes related to hearing impairment, namely 1q23.3–q25.2, 2q22q23, 6p25.3 and 11q13.2–q13.4. The rare imbalances also present in normal parents might be casually associated with hearing impairment, but its role as a predisposition gene remains a possibility. Our results show that syndromic deafness is frequently associated with chromosome microimbalances (14–27%), and the use of aCGH for defining disease etiology is recommended.

**ALPM Catelani^{a,b*},
ACV Krepischi^{a,c*}, CA Kim^d, F
Kok^{a,e}, PA Otto^a, MTBM
Auricchio^a, JF Mazzeu^a,
DT Uehara^a, SS Costa^a,
J Knijnenburg^f, A Tabith Jr^g,
AM Vianna-Morgante^a,
RC Mingroni-Netto^a and
C Rosenberg^{a,c}**

^aDepartment of Genetics and Evolutionary Biology, Institute of Biosciences, University of São Paulo, Brazil, ^bFleury Medicine and Health, São Paulo, Brazil, ^cA.C. Camargo Hospital, São Paulo, Brazil, ^dClinical Genetics Unit, Instituto da Criança, Hospital das Clínicas, University of São Paulo, Brazil, ^eDepartment of Neurology, Hospital das Clínicas, University of São Paulo, Brazil, ^fDepartment of Molecular Cell Biology, Leiden University Medical Center, Leiden, The Netherlands, and ^gDivision of Education and Rehabilitation of Communication Disorders (DERDIC) of the Catholic University of São Paulo (PUC-São Paulo), Brazil

*Both authors have contributed equally to this work.

Key words: array-CGH – chromosome imbalance – chromosome rearrangement – hearing loss

Corresponding author:
Carla Rosenberg, PhD,
Departamento de Genética e Biologia Evolutiva, Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, 05422-970 São Paulo, SP, Brazil.
Tel.: 55 11 3091 7591;
fax: 55 11 3091 7553;
e-mail: carlarosenberg@uol.com.br

Received 16 February 2009, revised and accepted for publication 14 July 2009

Profound or severe pre-lingual hearing loss affects about 0.1% of the population, 30% of which is acquired, the remainder being either hereditary (60%) or idiopathic (10%). In the last decade, the identification of many genes associated with hereditary deafness has greatly contributed to the understanding of basic hearing mechanisms (review in Ref. (1)).

Array-based comparative genomic hybridization (aCGH) has proved useful in determining the etiology of idiopathic mental retardation, in which 13–17% of the patients carry *de novo* microdeletions or duplications (2, 3). Characterization of some of these imbalances has led to the identification of novel genes involved in malformation syndromes (4).

We investigated DNA segment copy number changes (CNCs) in individuals with idiopathic syndromic hearing loss, aiming to identify dosage-sensitive genes or chromosome regions involved in their phenotypes. In addition, we evaluated the impact of array-CGH on the diagnosis and genetic counseling of these patients and their families.

Patients and methods

Patients

Patients were referred to the hearing impairment laboratory of the Genetic Counseling Service, Institute of Bioscience, University of São Paulo, by three clinical centers from the State of São Paulo, Brazil, namely: (a) Clinical Genetics Unit, Instituto da Criança, Hospital das Clínicas, University of São Paulo – São Paulo; (b) Division of Education and Rehabilitation of Communication Disorders (DERDIC) of the Catholic University of São Paulo (PUC – São Paulo); (c) Clinical Genetics Unit, Hospital de Reabilitação de Anomalias Craniofaciais, University of São Paulo, Bauru, Brazil.

The 29 patients included in this study were selected for presenting other clinical signs and/or mental retardation, in addition to hearing loss. The children's histories, according to parental or guardian reports, failed to reveal episodes of infections that could explain the etiology of hearing disabilities in these patients, although detailed medical records were not available in every case. Clinical genetic evaluations could not determine the causes of the abnormal phenotypes or classify those individuals with unknown syndromes. Only patients with normal G-banded karyotypes and who were negative for the following frequent hearing impairment mutations were included: 35delG and 167delT (*GJB2* gene), del(*GJB6*-D13S1830),

del(*GJB6*-D13S1854) (*GJB6* gene) and the mitochondrial mutation A1555G (*MTRNR1* gene).

To evaluate the hearing abilities of the patients, the exams described below were used in most cases; however, because patients were referred from different centers, and the protocols are not well established in public health services in Brazil, not every exam was performed in each case. These included tympanometry and acoustic reflex thresholds, tonal and vocal audiometry with conditioning methods according to the patient's age; transiently evoked oto-acoustic emissions (OEA) and their distortion product. Pure tone audiometry was carried out to test for air (250–8000 Hz) and bone conduction (250–4000 Hz). Audiological evaluation by auditory brain stem responses (ABR) was also performed.

The study was approved by the Ethics Committee of the Institute of Bioscience, University of São Paulo, and informed consent was obtained from all patients and/or their legal guardians.

Methods

Screening of frequent deafness-related mutations

Genomic DNA was extracted from peripheral blood samples by standard procedures. The c.35delG mutation was investigated by polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) as described in Ref. (5). The c.167delT mutation was investigated by PCR-RFLP, with the restriction enzyme *Pst*I. The del(*GJB6*-D13S1830) and the del(*GJB6*-D13S1854) mutations in the *GJB6* gene were tested by amplifying the breakpoint-containing fragments as described in Ref. (6). The A1555G mutation in the *MTRNR1* gene was screened according to the protocol described in Ref. (7).

Cytogenetic analysis

Short-term cultures of peripheral blood lymphocytes were performed according to standard procedures. The chromosomes were analyzed after GTG-banding.

Array-CGH

Patients presenting an apparently normal karyotype were investigated by 1-Mb bacterial artificial chromosome (BAC) arrays as previously described (8). Information regarding the array clone set is available at the Wellcome Trust Sanger Institute mapping database site (Ensembl genome browser: <http://www.ensembl.org/>). Some of the rearrangements detected by the 1-Mb array were mapped

at higher resolution using one of the following: (i) 105K (Syndrome Plus from Oxford Gene Technology) or 44K (Agilent Technologies) oligonucleotide microarrays, according to the manufacturer's protocols; (ii) multiplex ligation-dependent probe amplification (MLPA) using customized kits to investigate specific regions, namely 15q15.3 (9) and 6p25.3p25.2.

Fluorescent *in situ* hybridization analysis

All array-CGH imbalances were verified by fluorescent *in situ* hybridization (FISH), performed according to the standard protocols (10, 11) and using the same BAC probes that showed altered ratios on the array. FISH was also used to investigate whether the imbalances were inherited.

Results

The hearing impairment was classified according to the criteria presented by Finsterer and Fellinger (12). One patient presented with conductive and another mixed hearing loss, in both

cases caused by ear malformations. The remaining 27 patients presented with neurosensory hearing loss. Table 1 describes the hearing impairment and summarizes the additional clinical findings of the patients with genomic imbalances. Besides the hearing impairment, almost all patients (seven out of eight) presented with mental retardation and/or developmental delay. Clinical features seen in more than one patient included short stature, epicanthic folds, high palate, cardiac defects, broad thumbs, brachydactyly and clinodactyly. These clinical features are quite common among syndromic individuals carrying chromosomal aberrations, and do not define a more specific phenotype related to hearing impairment.

In the 29 cases screened with aCGH, we detected rare CNCs in eight of them, four being *de novo* (Patients 1, 2, 3, and 4) and four inherited from a normal parent (Patients 5, 6, 7, and 8). In addition to the 1-Mb aCGH performed for all patients followed by FISH analysis in positive cases, oligoarrays were performed for Patients 3 and 7, and MLPA for Patients 3 and 8, to map further their detected rearrangements. Table 2

Table 1. Clinical findings of the patients with genomic imbalances

Patient	Age	Gender	Hearing loss ^a	Clinical findings	Rearrangement
1	8y5m	M	SN, BL, PF	Short stature, optic nerve atrophy, horseshoe kidneys, cryptorchidism, inguinal hernia, brachydactyly, broad thumbs	del(1)(q23.3q25.2)
2	11y9m	M	SN, BL, PF	Mental retardation, short stature, heterochromia iridis, epicanthic folds, broad nose, low-set ears with abnormal lobules, palm hyperkeratosis	dup(2)(q22.2q23.3)
3	6y5m	F	SN, BL, PF	Craniosynostosis, prominent frontal, dental malocclusion, congenital cardiac defect ^b (VSD, ASD, PDA), brachydactyly, clinodactyly (5th fingers), broad thumbs	dup(6)(p25.2p25.3)
4	2y5m	F	SN, BL, MS	Developmental delay, congenital cardiac defect (PDA), small and sparse lower teeth	del(11)(q13.2q13.4)
5	12y6m	M	SN, BL, MD	Mental retardation, short stature, microcephaly, high nasal bridge, epicanthic folds, high and narrow palate, ears with large lobules, discrete <i>pectus excavatum</i> , clinodactyly (5th fingers), <i>pes cavus</i>	dup(2)(q12.3q12.3)
6	2y5m	M	SN, BL, SV(L), MD(R)	Developmental delay, synophrys, slight brachycephaly, persistent volar pads, clinodactyly (5th fingers)	del(4)(q23q24)
7	5y3m	M	SN, BL, MD(L), SV(D)	Developmental delay, hypertelorism, prominent ears, <i>pectus excavatum</i> , shawl scrotum, postaxial polydactyly (5th toe) at left, brachydactyly	del(7)(q31.1q31.1)
8	4y7m	M	SN, BL, PF(L), MD(R)	Developmental delay, high and narrow palate, downslanting palpebral fissures, dysplastic ears, joint hypermobility, syndactyly (fingers 3/4).	del(15)(q15.3q15.3)

^aHearing loss: SN = sensorineural; BL = bilateral; PF = profound; SV = severe; MD = moderate; MS = moderately severe; L = left; R = right.

^bCongenital cardiac defects: VSD = ventricular septal defect; ASD = atrial septal defect; PDA = patent ductus arteriosus.

Genomic imbalances in syndromic deafness

Table 2. Description of the genomic imbalances detected in eight patients with syndromic hearing loss. Genomic positions are given according to Human Genome Building NCBI36.1, HG18

Patient	DECIPHER ID	Rearrangement	Genomic position (Mb) ^a		Minimum Size (Mb)	Inheritance
			Proximal breakpoint	Distal breakpoint		
1	USP00002396	del(1)(q23.3q25.2)	160.19... 161.21	175.27 ...175.56	14.06	<i>de novo</i>
2	USP00248386	dup(2)(q22.2q23.3)	143.67... 144.59	150.78 ...150.86	6.19	<i>de novo</i>
3	USP00001448	dup(6)(p25.2p25.3)	2.98... 2.86	1.26 ...1.32	1.60	<i>de novo</i>
4	USP00002389	del(11)(q13.2q13.4)	67.55... 68.07	70.31 ...70.60	2.24	<i>de novo</i>
5	USP00002394	dup(2)(q12.3q12.3)	107.03... 108.13	108.34 ...108.50	0.21	Maternal
6	USP00002392	del(4)(q23q24)	101.15... 101.51	101.96 ...103.22	0.46	Paternal
7	USP00002391	del(7)(q31.1q31.1)	109.93... 110.06	110.31 ...110.39	0.25	Maternal
8	USP00002390	del(15)(q15.3q15.3)	41.41... 41.68	41.85 ...42.76	0.17	Maternal

First and last clones with abnormal log₂ ratios of the regions with copy number alterations are given.

^aGenomic positions of the minimum (bold) and maximum (non-bold) size of the rearrangement are given.

summarizes the detected chromosome rearrangements and their genomic locations, according to the NCBI 36.3 assembly of the Human Genome. The 1-Mb clones which showed abnormal log ratio intensities are listed under the Cytoview window, 1 Mb set, on the Ensembl database site (Ensembl genome browser: <http://www.ensembl.org/>). The deletion on Patient 7 was refined to ~250 kb using a 44K oligoarray, and was shown to comprise just exons 4 and 5 of the *IMMP2L* gene. Oligoarray data for Patient 3 (Fig. 1) allowed mapping the deletion to a <1.8 Mb segment, and the MLPA test showed that the probe (chromosome 6:1258826 bp) located within the *FOXQ1* single exon was not duplicated, defining the location of the telomeric end of the duplication. In Patient 8, three MLPA probes for the *STRC* gene (chromosome 15: 41682988, 41684880 and 41694012 bp) showed that the heterozygous deletion detected by aCGH encompassed the active copy of this gene, rather than its pseudogene. Figure 1 shows an example of a chromosome imbalance detected by BAC aCGH, and its more detailed mapping by oligoarray. Information on all chromosomally imbalanced patients was deposited in the DECIPHER database (Database of Chromosomal Imbalances and Phenotype in Humans using Ensembl Resources; <http://www.sanger.ac.uk/PostGenomics/decipher/>), and their DECIPHER number is given in Table 2.

Discussion

We investigated 29 patients with idiopathic syndromic deafness by 1-Mb aCGH; in eight of them (27%), rare chromosome imbalances varying in size between 250 kb and 15 Mb were detected. FISH investigation on metaphases from the parents showed that the rearrangements were *de novo* in four patients (Patients 1–4), pointing to chromosome segments likely to harbor

dosage-sensitive genes related to hearing abilities. The deletion in *Patient 1* at 1q23.3q25.2 encompassed ~100 known genes, making it impossible to determine which genes contributed to the phenotype. However, the segment includes the *DFNA7* locus, known to be involved in dominantly inherited, sensorineural non-syndromic hearing impairment (13), which could explain the hearing loss *per se*. *Patient 2* had a duplication stretching between 2q22.2 and 2q23.3. A single duplication overlapping this segment has been reported previously (14), but with no association with hearing impairment at 3 years of age. Although the combination of deafness, mental retardation and heterochromia of irides observed in the patient is suggestive of Waardenburg syndrome (WS), *PAX3*, one of the genes that causes WS, maps 70 Mb away from the duplication and is extremely unlikely to be involved in the phenotype. At least eight microdeletions within or overlapping this segment have been reported (15) associated with phenotypes much more severe than in our patient; phenotypes associated with deletions are frequently more severe than with duplications. It is noteworthy that deafness was not a feature associated with these particular deletions. *Patient 3* carried a <1.8 Mb duplication at 6p25.3p25.2 and presented with profound sensorial deafness and heart defects, which are common features of the 6p25 microdeletion syndrome (16). The genotype–phenotype correlation in patients with these 6p distal deletions indicates the presence of a gene involved in hearing abilities at 6p25 (17, 18). Duplications of this region have also been reported, mainly in association with ocular developmental anomalies and glaucoma (19); however, hearing impairment has not been noticed, except in a patient with a *de novo* partial tetrasomy of 6p25 (20). To investigate if the rearrangement could cause deafness in Patient 3 by

Fig. 1. 6p25.2–p25.3 duplication detected on Patient 3. Array-based comparative genomic hybridization profile of chromosome 6 shows a duplication (arrow and red dots) detected by an 1-Mb array, and underneath further mapping by 105K oligoarrays. The duplicated segment on the oligoarray profile is shown as a bubble due to the superimposition of the graphic displays resulting from dye swap hybridizations. The genes which map to this genomic segment are also depicted.

disrupting or down-regulating a gene on 6p25.3, we further mapped the breakpoint regions using a high-resolution oligoarray and MLPA. The mapping data in Fig. 1 shows that the distal breakpoint

maps in the region between *FOXF2/FOXC1* genes (duplicated) and the proximal segment of *FOXQ1* gene (not duplicated). Because the MLPA probe covers only a part of the single exon of *FOXQ1*,

rearrangement in the remaining portion cannot be excluded. Furthermore, while the *FOXQ1* gene appears not to be duplicated, regulatory elements for the gene have been predicted at genomic position *chromosome 6:1.33 Mb, that is, within the duplicated segment (www.sisred.org/human9/). Alternatively, alteration of *FOXF2* and/or *FOXQ1* expression by the proximity to the breakpoint remains a possibility. *Patient 4* has a deletion at 11q13 and many genes are located in the deleted segment. Importantly, haploinsufficiency of *FGF3* causes the autosomal dominant oto-dental syndrome, which includes sensorineural hearing loss (21). Homozygous mutations in the *FGF3* gene were recently shown to cause autosomal recessive congenital sensorineural deafness, microtia and microdontia (22, 23). Interestingly, although our patient did not present the severe features of the oto-dental syndrome, she did exhibit small and sparse inferior teeth.

Four of our patients (Patients 5–8) inherited a chromosome imbalance from a normal parent. It is possible that some or all of these chromosome rearrangements are causally involved in the phenotype of these patients through mechanisms other than a dominant and fully penetrant mode of inheritance, as showed for Peters-Plus (MIM 261540) (24) and TAR syndromes (25). *Patient 5* had a ≤ 1.5 Mb duplication on 2q12.3, and another patient with profound deafness and a larger duplication fully encompassing that in our patient is documented in the DECIPHER database (Patient LEI00248451), suggesting the presence of a predisposing gene in the overlapping region. *Patient 6* had a deletion at 4q24 and no gene involved in hearing loss has been mapped to this segment. *Patient 7* carried a maternally inherited deletion which was mapped using an oligoarray to a 25–46 kb deletion comprising exons 4 and 5 of the *IMMP2L* gene (inner mitochondrial membrane peptidase 2-like). Mutations of this gene are known to affect mitochondrial function in mice (26). *Patient 8* had a heterozygous deletion in chromosome region 15q15. Although deletion of this segment was described as a normal variant in the Database of Genomic Variants (DGV), it results in loss of the *STRC* gene, known to cause deafness either through homozygous point mutations (27) or deletions (9). The presence of point mutations in the *STRC* gene in the non-deleted allele of Patient 8 is under investigation.

The genetics of deafness is highly heterogeneous and each of the available screening tests detects a small number of alterations. Failure to identify a plausible cause of hearing deficiency greatly impairs genetic counseling in many families.

Importantly, our results show that aCGH can help elucidate the cause of hearing impairment in a significant number of patients, and is currently one of the most efficient tools in defining the etiology of idiopathic syndromic deafness. Our results suggest that aCGH should be incorporated as a routine diagnostic tool in syndromic hearing loss.

Acknowledgements

We thank professionals from DERDIC for audiometric evaluation of patients. We also thank Dr. Nancy Mizue Kokitsu (Hospital de Reabilitação de Anomalias Craniofaciais, Bauru, USP, Brazil) for referring patients. We thank Prof. Peter Pearson for critical review of the manuscript. This work was supported by the Brazilian Agencies FAPESP and CNPq.

Electronic Databases

DGV: Database of Genomic Variants (<http://projects.tcag.ca/variation/>)

DECIPHER database: Database of Chromosomal Imbalances and Phenotype in Humans using Ensembl Resources (<http://www.sanger.ac.uk/PostGenomics/decipher>).

Ensembl genome browser (<http://www.ensembl.org/>)

References

- Petit C. Genes responsible for human hereditary deafness: symphony of a thousand. *Nat Genet* 1996; 14 (4): 385–391.
- Rosenberg C, Knijnenburg J, Bakker E et al. Array-CGH detection of micro rearrangements in mentally retarded individuals: clinical significance of imbalances present both in affected children and normal parents. *J Med Genet* 2006; 43 (2): 180–186.
- Vissers LE, de Vries BB, Osoegawa K et al. Array-based comparative genomic hybridization for the genomewide detection of submicroscopic chromosomal abnormalities. *Am J Hum Genet* 2003; 73 (6): 1261–1270.
- Shaw-Smith C, Pittman AM, Willatt L et al. Microdeletion encompassing MAPT at chromosome 17q21.3 is associated with developmental delay and learning disability. *Nat Genet* 2006; 38 (9): 1032–1037.
- Wilcox ER, Everett LA, Li XC, Lalwani AK, Green ED. The PDS gene, Pendred syndrome and non-syndromic deafness DFNB4. *Adv Otorhinolaryngol* 2000; 56: 145–151.
- del Castillo FJ, Rodriguez-Ballesteros M, Alvarez A et al. A novel deletion involving the connexin-30 gene, del(GJB6-d13s1854), found in trans with mutations in the GJB2 gene (connexin-26) in subjects with DFNB1 non-syndromic hearing impairment. *J Med Genet* 2005; 42 (7): 588–594.
- Estivill X, Govea N, Barcelo E et al. Familial progressive sensorineural deafness is mainly due to the mtDNA A1555G mutation and is enhanced by treatment of aminoglycosides. *Am J Hum Genet* 1998; 62 (1): 27–35.
- Krepisch-Santos AC, Vianna-Morgante AM, Jehee FS et al. Whole-genome array-CGH screening in undiagnosed syndromic patients: old syndromes revisited and new alterations. *Cytogenet Genome Res* 2006; 115 (3–4): 254–261.

9. Knijnenburg J, Lesnik Oberstein SA, Frei K et al. A homozygous deletion of a normal variation locus in a patient with hearing loss from non-consanguineous parents. *J Med Genet* 2009; 46(6): 412–417.
10. Rosenberg C, Blakemore KJ, Kearns WG et al. Analysis of reciprocal translocations by chromosome painting: applications and limitations of the technique. *Am J Hum Genet* 1992; 50 (4): 700–705.
11. Rosenberg C, Borovik CL, Canonaco RS, Sichero LC, Queiroz AP, Vianna-Morgante AM. Identification of a supernumerary marker derived from chromosome 17 using FISH. *Am J Med Genet* 1995; 59 (1): 33–35.
12. Finsterer J, Fellingner J. Nuclear and mitochondrial genes mutated in nonsyndromic impaired hearing. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol* 2005; 69 (5): 621–647.
13. Fagerheim T, Nilssen O, Raeymaekers P et al. Identification of a new locus for autosomal dominant non-syndromic hearing impairment (DFNA7) in a large Norwegian family. *Hum Mol Genet* 1996; 5 (8): 1187–1191.
14. Farrell SA, Sajoo A, Maybury D, Speevak MD. Pure partial trisomy of 2q22–q23 secondary to a paternally inherited direct insertion: a rare duplication. *Clin Genet* 2003; 64(3): 255–257.
15. Jaillard S, Dubourg C, Gerard-Blanluet M et al. 2q23.1 microdeletion identified by array-CGH: an emerging phenotype with Angelman-like features? *J Med Genet* 2008 (In press).
16. Maclean K, Smith J, St HL et al. Axenfeld-Rieger malformation and distinctive facial features: clues to a recognizable 6p25 microdeletion syndrome. *Am J Med Genet A* 2005; 132 (4): 381–385.
17. Gould DB, Jaafar MS, Addison MK et al. Phenotypic and molecular assessment of seven patients with 6p25 deletion syndrome: relevance to ocular dysgenesis and hearing impairment. *BMC Med Genet* 2004; 5: 17.
18. Martinet D, Filges I, Besuchet SN et al. Subtelomeric 6p deletion: clinical and array-CGH characterization in two patients. *Am J Med Genet A* 2008; 146A (16): 2094–2102.
19. Chanda B, sai-Coakwell M, Ye M et al. A novel mechanistic spectrum underlies glaucoma-associated chromosome 6p25 copy number variation. *Hum Mol Genet* 2008; 17 (22): 3446–3458.
20. Stohler R, Kucharski E, Farrow E et al. A case of de novo partial tetrasomy of distal 6p and review of the literature. *Am J Med Genet A* 2007; 143A (17): 1978–1983.
21. Gregory-Evans CY, Moosajee M, Hodges MD, et al. SNP genome scanning localizes oto-dental syndrome to chromosome 11q13 and microdeletions at this locus implicate FGF3 in dental and inner-ear disease and FADD in ocular coloboma. *Hum Mol Genet* 2007; 16 (20): 2482–2493.
22. Alsmadi O, Meyer BF, Alkuraya F et al. Syndromic congenital sensorineural deafness, microtia and microdontia resulting from a novel homoallelic mutation in fibroblast growth factor 3 (FGF3). *Eur J Hum Genet* 2008; 17(1): 14–21.
23. Tekin M, Ozturkmen AH, Fitoz S et al. Homozygous FGF3 mutations result in congenital deafness with inner ear agenesis, microtia, and microdontia. *Clin Genet* 2008; 73 (6): 554–565.
24. Lesnik Oberstein SA, Kriek M, White SJ et al. Peters Plus syndrome is caused by mutations in B3GALT1, a putative glycosyltransferase. *Am J Hum Genet* 2006; 79 (3): 562–566.
25. Klopocki E, Schulze H, Strauss G et al. Complex inheritance pattern resembling autosomal recessive inheritance involving a microdeletion in thrombocytopenia-absent radius syndrome. *Am J Hum Genet* 2007; 80 (2): 232–240.
26. Lu B, Poirier C, Gaspar T et al. A mutation in the inner mitochondrial membrane peptidase 2-like gene (Immp2l) affects mitochondrial function and impairs fertility in mice. *Biol Reprod* 2008; 78 (4): 601–610.
27. Verpy E, Masmoudi S, Zwaenepoel I et al. Mutations in a new gene encoding a protein of the hair bundle cause non-syndromic deafness at the DFNB16 locus. *Nat Genet* 2001; 29 (3): 345–349.