UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE BIOCIÊNCIAS

Alex Marcel Moreira Dias

# Estudo da heterogeneidade genética da surdez por sequenciamento de nova geração

# Study of genetic heterogeneity of deafness by next-generation sequencing

São Paulo

2019

Alex Marcel Moreira Dias

# Estudo da heterogeneidade genética da surdez por sequenciamento de nova geração

# Study of genetic heterogeneity of deafness by next-generation sequencing

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo, para a obtenção do Título de Mestre em Aconselhamento Genético e Genômica Humana, na Área de Biologia/Genética.

Orientadora: Profa. Dra. Regina Célia Mingroni Netto

Exemplar revisado – o original encontra-se no Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo

São Paulo
2019

Dias, Alex Marcel Moreira

Estudo da heterogeneidade genética da surdez por sequenciamento de nova geração / Alex Marcel Moreira Dias; orientadora Regina Célia Mingroni Netto. São Paulo, 2018.

109 páginas.

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

1. Perda auditiva. 2. Surdez hereditária. 3. Surdez sindrômica. 4. Surdez não-sindrômica. 5. Sequenciamento de nova geração

*Ao meu pai Adilson e à minha mãe Sidneia,*

*Pelo amor incondicional,*

“Quem tem discernimento está sempre
ansioso por saber mais, mas o insensato
se alimenta de modismos e coisas fúteis.”
(Provérbios 15.14 – A Mensagem)

## AGRADECIMENTOS

À minha orientadora, Profª. Dra. Regina Célia Mingroni Netto, pela oportunidade de ser seu aluno de mestrado, pelas contribuições e conselhos valiosos, e por ser referência no ensino de genética desde minha graduação.

Aos demais professores do programa de Mestrado Profissional em Aconselhamento Genético e Genômica Humana, pelo acolhimento, conhecimento transmitido e pelas experiências compartilhadas ao longo dos estágios em ambulatórios.

À Profª. Dra. Mayana Zatz, pela referência profissional e pela coordenação do projeto CEPID.

A todas as famílias que participaram desse estudo. Aos centros de pesquisa e aos profissionais que encaminharam pacientes para o serviço de aconselhamento genético do Instituto de Biociências.

Aos colegas de curso, pela companhia, amizade e parceria.

À Erika Harumi Takamoto de Camargo, por não medir esforços para o bom andamento das atividades do curso e pelo auxílio prestado sempre que necessário.

Aos funcionários do Laboratório de Genética Humana - Paulo Rogério, Maraísa Sebastião, Maria Raimunda (Mara), Tereza Balester e Maria de Fátima, pelo auxílio nas atividades técnicas, e a todos os demais funcionários do Instituto de Biociências.

Aos funcionários do Centro de Pesquisas sobre o Genoma Humano e Células-Tronco, pelo auxílio nas corridas de sequenciamento, e especialmente à Dra. Marília Scliar, pelo auxílio com as análises de bioinformática.

Ao aluno Humberto Vicente Cezar Marcolino, por ter compartilhado comigo o conhecimento a respeito das etapas por ele realizadas. Ao Dr. Yuri Moreira, pelo auxílio prestado no preparo das bibliotecas de DNA.

Aos colegas do Laboratório de Genética Humana: André Bueno, Camila Martins, Larissa Antunes, Leandro Alves, Dra. Lilian Kimura, Uirá Souto Melo, Vinícius Borges e William Torres, pela companhia e pelas ideias compartilhadas.

A meus pais, pelo apoio incondicional, pelo amor com que me tratam e por terem se esforçado tanto para investirem na minha educação. Aos meus familiares pelas orações e carinho. Aos meus sobrinhos Ana Lyssah e Daniel, por fazerem minha vida mais alegre e cheia de esperança.

Ao Dr. Ciro Dresch Martinhago, pela oportunidade que me ofereceu de ingressar na genética humana, pelo incentivo à minha formação, pela confiança em meu trabalho e

pelos conhecimentos a mim transmitidos. À toda a equipe do laboratório Chromosome Medicina Genômica pela torcida, compreensão e pelo apoio. Às amigas Natália Ciglione, Paula Queiroz e Gislaine Santos, pela paciência, pelas conversas e por toda a ajuda prestada ao longo desse período.

À Kalina Renata Naomi Endo, pelo companheirismo ao longo de tantos anos como colega de trabalho e por ser minha grande amiga. Por valorizar meu potencial, pelos conselhos e ideias fundamentais para meu crescimento pessoal e profissional.

A todos os meus amigos, pelo apoio e paciência. Ao Lucio, por me inspirar a buscar crescimento. Em especial aos amigos Felipe Maneta e Jamir Júnior, pelo incentivo irrestrito e apoio constante ao meu desejo de realizar o mestrado.

À FAPESP, pelo apoio financeiro.

# Índice

RESUMO ..... 10
ABSTRACT ..... 12
**1. Introdução** ..... 14
1.1 Caracterização clínica, etiológica e populacional da surdez ..... 14
1.2 Genética da surdez ..... 16
1.3 Técnicas de sequenciamento de DNA para estudo de variantes associadas a doenças 22
1.4 O sequenciamento de nova geração aplicado ao estudo molecular da surdez ..... 25
1.5 Aconselhamento genético nos casos de surdez ..... 28
**2. Objetivos** ..... 31
**3. Material e Métodos** ..... 31
3.1 Casuística ..... 31
3.2 Aspectos éticos ..... 33
3.3 Aconselhamento genético ..... 33
3.4 Responsáveis pelas etapas desse estudo ..... 33
3.5 Análises moleculares ..... 34
3.5.1 Extração do DNA ..... 34
3.5.2 Triagem de mutações frequentes que causam surdez hereditária ..... 34
3.5.3 Desenho do painel multigênico para NGS ..... 35
3.5.4 Preparo das bibliotecas de DNA ..... 38
3.5.5 Análise bioinformática ..... 41
3.5.6 Repetição da corrida de sequenciamento ..... 43
3.5.7 Confirmação das variantes e análise de segregação por sequenciamento de Sanger . 44
3.5.8 Classificação final das variantes ..... 44
**4. Resultados e Discussão** ..... 45
4.1 Probandos com suspeita de síndrome de Waardenburg (SW) ..... 45
4.2 Probandos com suspeita de síndrome de Usher (SU) ..... 50
4.3 Probandos com suspeita de surdez não-sindrômica autossômica dominante ..... 54
4.4 Probandos com suspeita de surdez não-sindrômica autossômica recessiva ..... 57
4.5 Probandos com suspeita de surdez não-sindrômica com mais de um mecanismo de transmissão genética possível ..... 64
4.6 Análise da casuística completa ..... 70
**5. Conclusões** ..... 74
**6. Referências Bibliográficas** ..... 76
**7. Anexos** ..... 88
Anexo A – Cópia das fichas de anamnese utilizada na consulta de aconselhamento genético dos pacientes. ..... 88
Anexo B – Termos de consentimento livre e esclarecido ..... 95

Anexo C – Heredogramas dos casos em que foi possível analisar familiares para investigação da segregação das variantes..... 99

Anexo D – Manuscrito do artigo em que serão publicados os dados referentes à investigação realizada na família do probando 84 ..... 103

# RESUMO

Surdez e perda auditiva são termos utilizados para designar distúrbios da audição, o tipo de deficiência sensorial mais frequente em humanos e decorrente de alterações genéticas em cerca de 50% dos casos. A heterogeneidade de lócus, de alelos e de manifestações fenotípicas na surdez é impressionante. O lócus DFNB1, que contém os genes *GJB2* e *GJB6*, é responsável por cerca de 40% dos casos de surdez não-sindrômica de origem genética, porém, variantes patogênicas em cerca de 150 genes são descritas como causa de surdez, que pode ser sindrômica ou não-sindrômica. Por permitirem o sequenciamento simultâneo de diversos genes em uma mesma análise, as técnicas de sequenciamento de nova geração têm sido empregadas para o diagnóstico molecular de condições geneticamente heterogêneas, incluindo a surdez. O objetivo desse estudo foi contribuir para o estudo da heterogeneidade genética da surdez por meio do sequenciamento de nova geração de um painel com 99 genes relacionados à perda auditiva. Indivíduos não aparentados de 91 famílias brasileiras, com provável causa genética de surdez, foram avaliados com o intuito de identificar as causas moleculares da surdez, detectar novas variantes e promover aconselhamento genético das famílias participantes do estudo. Variantes provavelmente causais foram detectadas em 41 dos 91 probandos analisados (45,1%), dos quais 34 (37,4%) apresentaram variantes patogênicas ou provavelmente patogênicas. Nos outros 7 casos, foram detectadas variantes de efeito desconhecido com alto elevado potencial de explicar a perda auditiva dos probandos. As taxas de detecção nos casos de provável surdez sindrômica foram de 44,4% no grupo com suspeita de síndrome de Waardenburg (4 de 9 casos) e de 61,5% no grupo com suspeita de síndrome de Usher (8 de 13 casos). Nos casos de surdez não-sindrômica, as taxas de detecção foram de 53,9% no grupo com provável surdez autossômica dominante, 35,1% no grupo com provável surdez autossômica recessiva e de 45,0 % no grupo com mais de um mecanismo de herança possível. Das 43 variantes classificadas como patogênicas ou provavelmente patogênicas detectadas nesse estudo, 15 nunca haviam sido descritas. Contribuições científicas importantes foram obtidas com a identificação de uma nova variante de perda de função no gene *CEACAM16* como causa de surdez não-sindrômica autossômica recessiva e com a confirmação de uma variante no gene *MYO3A* como causa de surdez não-sindrômica autossômica dominante, recém-descrita em famílias brasileiras. Os resultados obtidos permitiram concluir que o sequenciamento de nova geração de

paineis multigênicos é uma estratégia eficaz para o estudo da heterogeneidade genética da surdez, contribuindo para a detecção de novas variantes, ampliando o conhecimento científico a respeito dos genes analisados, e para o aconselhamento genético dos indivíduos estudados e seus familiares.

## ABSTRACT

Deafness and hearing loss are terms used to describe hearing disorders, the most common type of sensory impairment in humans, which occurs due to genetic alterations in about 50% of cases. The heterogeneity of locus, alleles and phenotypic manifestations of deafness is striking. The DFNB1 locus, which contains the genes *GJB2* and *GJB6*, is responsible for about 40% of cases of non-syndromic genetic hearing loss, but pathogenic variants in near 150 genes are described as causing deafness, which may be syndromic or non-syndromic. By allowing the simultaneous sequencing of several genes in the same analysis, next-generation sequencing techniques have been employed for the molecular diagnosis of genetically heterogeneous conditions, including deafness. The aim of this study was to contribute to the study of the genetic heterogeneity of deafness employing the next-generation sequencing of a panel with 99 genes related to hearing loss. Individuals from 91 unrelated Brazilian families, with a probable genetic cause for deafness, were evaluated with the purpose of identifying the molecular causes of deafness, to detect new variants and to provide genetic counseling to0 the families enrolled in the study. Probably causal variants were detected in 41 of the 91 probands analyzed (45.1%), of which 34 (37.4%) had pathogenic or likely pathogenic variants. In the other 7 cases, variants of unknown significance with high potential to explain the hearing loss were detected. Detection rates in cases of probable syndromic deafness were 44.4% in the group with suspected Waardenburg syndrome (4 of 9 cases) and 61.5% in the group with suspected Usher syndrome (8 of 13 cases). In cases of non-syndromic deafness, detection rates were 53.9% in the group with probable autosomal dominant inheritance, 35.1% in the group with probable autosomal recessive inheritance and 45.0% in the group with more than one possible mechanism of inheritance. Among the 43 variants classified as pathogenic or probably pathogenic detected in this study, 15 had never been described. Important scientific contributions were obtained such as the identification of a novel loss-of-function variant in the *CEACAM16* gene as causing autosomal recessive non-syndromic deafness and the confirmation of a recently described variant in the *MYO3A* gene as causing autosomal dominant non-syndromic deafness in Brazilian families. The results obtained allowed us to conclude that next-generation sequencing of multigenic panels is an effective strategy for the study of the genetic heterogeneity of deafness, contributing to the detection of new variants, expanding

scientific knowledge about the genes analyzed, and also to the genetic counseling of the individuals studied and their relatives.

# 1. Introdução

## 1.1 Caracterização clínica, etiológica e populacional da surdez

Percepção sonora é o papel fundamental das estruturas que fazem parte do sistema auditivo. As ondas sonoras que se movimentam no ar são conduzidas pela orelha externa até as estruturas internas do aparelho auditivo, onde células especializadas transformam a energia mecânica em estímulos nervosos enviados ao cérebro pelo nervo auditivo (Raviv, Dror, & Avraham, 2010)

Os termos “perda auditiva” e “deficiência auditiva” são comumente utilizados para designar limiares de audição considerados maiores que os normais, que acarretam prejuízo na capacidade auditiva. O termo “surdez” costuma ser associado a perdas graves e profundas (Smith, Hildebrand, & Van Camp, 2010). Nessa dissertação os termos serão utilizados de maneira intercambiável para se referir a qualquer prejuízo detectável na capacidade auditiva, independentemente do grau.

A audição é crítica para o desenvolvimento da fala e da linguagem, bem como para a comunicação e o aprendizado. Indivíduos afetados pela surdez estão sujeitos a impactos em sua qualidade de vida, incluindo distúrbios emocionais decorrentes das sensações de solidão, isolamento e frustração (WHO, 2018)

As perdas auditivas constituem um tipo de deficiência sensorial muito comum em humanos. Em 2012, a Organização Mundial da Saúde publicou relatório no qual se estimou em 360 milhões - pouco mais de 5,3% da população mundial - o número de indivíduos afetados por esta condição, dos quais 32 milhões eram crianças (WHO, 2017). Em países desenvolvidos, estima-se que entre 1 e 2 a cada 1.000 nascidos vivos apresentem perda auditiva detectável (Morton & Nance, 2006). No Brasil, tem sido difícil obter estimativas populacionais precisas a respeito da incidência de surdez, mas o censo de 2010 do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE) apontou que cerca de 5,1% dos indivíduos da população brasileira têm algum grau de deficiência auditiva. Em um estudo que avaliou resultados da triagem auditiva neonatal na cidade de São Paulo (Manzoni, Ferreira, Almeida, & Tedesco, 2016), foi descrito que a estimativa de surdez ao nascimento na cidade foi a mesma encontrada em países desenvolvidos – entre 1 e 2 a cada 1.000 nascidos vivos.

Existem diferentes critérios para classificar as manifestações clínicas da surdez. Quanto aos tipos, pode ser: condutiva, quando decorrente de anormalidades estruturais na orelha externa ou ossículos da orelha média; neurossensorial ou sensorioneural, quando

decorrente de disfunções de estruturas sensoriais internas do aparelho auditivo ou decorrente de disfunções do sistema nervoso; mista, quando há uma combinação de características condutivas e neurossensoriais. Quanto à idade de manifestação dos sintomas, é classificada como pré-lingual, quando se manifesta antes do desenvolvimento da fala, e como pós-lingual, quando depois. Pode ser unilateral, bilateral, simétrica ou assimétrica. Quanto à evolução, pode ser estacionária ou progressiva (Alford et al., 2014; Smith et al., 2010).

Os limiares auditivos são medidos em decibéis (dB). O limiar igual a 0 dB representa o nível no qual um indivíduo normal escuta um determinado som em um teste auditivo em 50% das vezes. Existem pequenas diferenças entre os sistemas de classificação de gravidade da surdez descritos por diferentes autores. O sistema proposto por Clark (1981) é comumente utilizado, inclusive adotado como referência pela *American Speech-Language-Hearing Association*, e delimita as seguintes categorias: perdas leves com limiares entre 16 e 40dB; perdas moderadas com limiares entre 41 e 55dB; perdas moderadamente graves com limiares entre 56 e 70 dB; perdas graves com limiares entre 71 e 90dB e perdas profundas com limiares iguais ou superiores a 91dB.

A surdez tem etiologia muito heterogênea, pode ser causada por fatores ambientais, genéticos ou uma combinação de ambos. Em recém-nascidos e crianças, a maioria dos casos de surdez congênita e que se manifesta posteriormente são decorrentes de doenças infecciosas, como a toxoplasmose, rubéola, citomegalovírus e herpes no período pré-natal, e, principalmente, pela meningite no período pós-natal (Smith, Bale, & White, 2005; Smith et al., 2010). Prematuridade e certas condições no período neonatal, como a hiperbilirrubinemia, por exemplo, aumentam o risco de manifestação da surdez (Smith et al., 2005).

A incidência de surdez por doenças infecciosas em países desenvolvidos tem caído graças aos programas de imunização e progressos no cuidado neonatal. Atualmente, a infecção congênita por citomegalovírus (CMV) é a causa mais comum de surdez adquirida em neonatos neses países (Goderis et al., 2014). Nos Estados Unidos, estima-se que a infecção congênita por CMV atinja cerca de 40.000 nascidos vivos por ano. Cerca de 90% dos recém-nascidos infectados não apresenta sinais clínicos detectáveis ao nascimento, porém, em aproximadamente 2,5% deles, verifica-se a surdez ao nascimento e, uma vez que a surdez decorrente da infecção por CMV apresenta evolução progressiva, até 10% dos infectados apresenta surdez ao longo da infância (Dollard, Grosse, & Ross, 2007; Morton & Nance, 2006; Yamamoto et al., 2011).

A manifestação clínica da surdez em adultos decorre frequentemente de fatores ambientais, sobretudo associada aos efeitos do envelhecimento e da exposição ao ruído (Smith, Hildebrand, & Van Camp, 2010). Há evidências de que fatores genéticos interfiram tanto na gravidade como na idade de aparecimento dos quadros de surdez em adultos, indicando uma complexa interação entre fatores ambientais e genéticos que ainda não foi totalmente esclarecida (Yamasoba et al., 2013). Outra importante causa de surdez adquirida é a ototoxicidade medicamentosa, que pode decorrer da predisposição presente em indivíduos que apresentam determinadas mutações no gene mitocondrial *MT-RNR1*, das quais a mutação m.1555A>G é a mais comum (Estivill et al., 1998). A surdez causada pelo uso de medicamentos ototóxicos nos indivíduos portadores de mutações neste gene costuma ser bilateral, de grave a profunda, e normalmente manifesta-se em poucos dias após a administração de antibióticos aminoglicosídeos, como estreptomicina, gentamicina e canamicina, mesmo quando utilizados em doses baixas (Prezant et al., 1993).

Nos países desenvolvidos, pelo menos 50% dos casos de surdez congênita decorre de alterações genéticas (Morton & Nance, 2006). Esta proporção foi estimada entre 60 e 70% por Raviv, Dror e Avraham (2010) e há estimativas nas quais se considera que as causas genéticas correspondam a até 80% dos casos de surdez congênita nesses países (Smith, Hildebrand, & Van Camp, 2010). Nos países em desenvolvimento, uma grande parcela dos casos de surdez ainda é decorrente de doenças infecciosas, o que eleva a incidência de surdez congênita nestes países para até 6 a cada 1.000 nascidos vivos (Olusanya, 2012). No Brasil, foi estimado no fim da década de 90 que, 16% dos casos são decorrentes de causas genéticas (Braga, Otto, & Spinelli, 1999), panorama que provavelmente já deve ter sido alterado em virtude de melhorias no cuidado à saude da população.

### 1.2 Genética da surdez

A heterogeneidade genética dos quadros de surdez é impressionante, expressa tanto no número de lócus envolvidos (heterogeneidade gênica), quanto no número de mutações em um mesmo gene associadas aos quadros de surdez (heterogeneidade alélica) quanto aos diferentes efeitos fenotípicos que mutações em um mesmo gene podem causar (pleiotropia). Todos estes fatores evidenciam a complexidade do sistema auditivo, formado por diversos tipos celulares e estruturas, e demonstram sua elevada sensibilidade a perturbações (Shearer, Hildebrand, Sloan, & Smith, 2011).

Mutações diferentes em um mesmo gene podem causar surdez com mecanismos diferentes de herança genética e até mesmo formas sindrômicas e não-sindrômicas. O gene *MYO7A* (OMIM#276903), por exemplo, tem mutações descritas associadas a quadros de surdez autossômica dominante, surdez autossômica recessiva e síndrome de Usher. A expressividade das mutações também é variável, pois fenótipos diferentes podem ser observados entre indivíduos afetados por uma mesma mutação, inclusive em uma mesma família.

Cerca de 30% dos casos genéticos de surdez pré-lingual são sindrômicos, nos quais a surdez se manifesta associada a outras características clínicas distintivas, como malformações na orelha externa, muitas vezes combinadas a alterações em outros órgãos e sistemas (Smith, Hildebrand, & Van Camp, 2010). Mais de 400 síndromes que apresentam a surdez como sintoma já foram descritas (Der Kaloustian, And, & Smith, 2014) e 47 genes já foram associados a diferentes quadros de surdez sindrômica, de acordo com o portal *Hereditary Hearing Loss Homepage* (Van Camp & Smith, 2018), acessado em julho de 2018. A tabela 1, modificada de estudo publicado por Morton e Nance (2006) apresenta um resumo dos tipos de surdez sindrômica de maior frequência relativa entre surdos e suas principais características.

A Síndrome de Waardenburg (SW) é uma condição genética de expressão altamente variável, caracterizada principalmente por perda auditiva pré-lingual não progressiva em graus variáveis, acompanhada de anormalidades na pigmentação da pele, cabelo ou íris, com incidência estimada em 1/42.000 (Kochhar, Hildebrand, & Smith, 2007; Read & Newton, 1997). Existem 4 tipos descritos, classificados de acordo com características clínicas adicionais, que são defeitos craniofaciais no caso do tipo 1, defeitos craniofaciais e de membros no tipo 3, e doença de Hirschsprung (megacólon congênito) no tipo 4, também chamado de Síndrome de Shah-Waardenburg. O tipo 2 não costuma apresentar características adicionais além da perda auditiva. (Read & Newton, 1997)

A heterogeneidade genética nos casos de SW é marcante. A maioria dos casos de SW do tipo 1 e tipo 3 decorre de variantes patogênicas em heterozigose no gene *PAX3*, com padrão de transmissão autossômico dominante (Pingault et al., 2010). Recentemente houve descrição de um caso de SW tipo 1 provavelmente causado por uma variante patogênica em homozigose no gene *EDNRB* (Morimoto et al., 2018). Cerca de 30% dos casos de SW tipo 2 são causadas por variantes patogênicas em heterozigose nos genes *MITF* e *SOX10* (Pingault et al., 2010). Recentemente, foram identificadas em portadores

de SW tipo 2, variantes em heterozigose no gene *EDNRB*, para o qual foi estimado que pode ser responsável por até cerca de 6% dos casos de SW tipo 2 (Issa et al., 2017) . Houve também a descrição de uma variante provavelmente patogênica no gene *KITLG*, até então não associado à SW, em uma família com SW tipo 2 (Zazo Seco et al., 2015). Variantes patogênicas em heterozigose no gene *SOX10* transmitidas com padrão autossômico dominante de herança são responsáveis por até 50% dos casos de SW tipo 4 (Pingault et al., 2010), porém herança autossômica recessiva também é descrita decorrente de alterações em homozigose ou heterozigose composta nos genes *EDNRB* e *EDN3* (Song et al., 2016).

Síndrome de Usher é o termo utilizado para designar um grupo de doenças hereditárias autossômicas recessivas caracterizadas por perda auditiva neurossensorial, com ou sem disfunção vestibular, associada a retinose pigmentar, processo de degeneração da retina que acarreta grave deficiência visual progressiva (Millán et al., 2011; Yan & Liu, 2010). Conforme revisto por Gettelfinger e Dahl (2018), a incidência da síndrome, historicamente estimada em 4,4/100.000, pode representar um valor subestimado, uma vez que Kimberling et al. (2010) estimaram a incidência da síndrome em 1/6.000. A despeito da grande variabilidade de manifestações clínicas, é possível distinguir 3 subtipos: tipo 1, caracterizado por perda auditiva congênita grave ou profunda, frequentemente associada a disfunção vestibular, e retinose pigmentar de início pré-púbere; tipo 2, que é caracterizado por perda auditiva congênita moderada e retinose pigmentar sem acometimento vestibular; tipo 3, mais raro, caracterizado por perda auditiva progressiva, retinose pigmentar com variabilidade no acometimento vestibular e na idade de manifestação da retinose pigmentar (Gettelfinger & Dahl, 2018; Kimberling et al., 2010; Millán et al., 2011; Yan & Liu, 2010). Pelo menos 11 genes já foram associados à síndrome de Usher, mas até 80% dos casos é decorrente de alterações patogênicas nos genes *USH1B* e *USH2A* (Pennings et al., 2002).

Tabela 1. Principais características das síndromes de maior frequência relativa entre surdos

| Condição | Características clínicas principais | Principal mecanismo de herança | Frequência relativa entre surdos | Número de genes descritos* |
|---|---|---|---|---|
| **Síndrome de Pendred** | Perda auditiva neurossensorial, malformações cocleares, alta probabilidade de aqueduto vestibular alargado. Acometimento da tireóide. | AR | 4-10% | 3 |
| **Síndrome de Usher** | Perda auditiva sensorial com sintomas vestibulares e retinose pigmentar - 3 tipos clínicos descritos. | AR | 4-6% | 11 |
| **Síndrome de Waardenburg** | Perda auditiva neurossensorial unilateral ou bilateral; Distúrbios pigmentares de pele, íris e cabelo. Dismorfismos faciais. Espinha bífida e doença de Hirschusprung ocasionais - 4 tipos clínicos descritos. | AD ou AR | 1-4% | 7 |
| **Síndrome brânquio-otorrenal (BOR)** | Perda auditiva (diversos tipos); malformações auriculares; fístulas branquiais; anomalias renais. | AD | 2% | 3 |
| **Síndrome de Alport** | Hematúria com falência renal progressiva; perda auditiva progressiva de início tardio; lenticone anterior e manchas maculares. | XL ou AR | 1% | 3 |
| **Síndrome de Treacher-Collins** | Perda auditiva condutiva com malformação de ossículos, microtia e fenda palatina; micrognatia; olhos inclinados para baixo; coloboma. | AD | 1% | 3 |

Legenda: AR - autossômica recessiva; AD - autossômica dominante; XL - ligada ao cromossomo X; *Fonte: *Hereditary Hearing Loss Homepage* (acessado em 17 de julho de 2018)

As formas de surdez hereditária não-sindrômica correspondem a cerca de 70% dos casos genéticos. O padrão de herança autossômico recessivo é o mais comum, encontrado em cerca de 80% dos casos, seguido por aproximadamente 20% de casos com padrão de herança autossômico dominante, e por casos de herança ligada ao X e mitocondrial representados por uma parcela menor, de 2% a 3% do total (Brownstein, Bhonker, & Avraham, 2012; Smith et al., 2005).

Os lócus gênicos associados aos quadros de surdez não-sindrômica são tradicionalmente denominados na literatura pela sigla DFN (do inglês *DeaFNess*) seguida por uma letra que indica o padrão de herança, sendo chamados de DFNA os lócus autossômicos dominantes, DFNB os lócus autossômicos recessivos e DFNX os lócus ligados ao cromossomo X, de acordo com recomendações do *HUGO Gene Nomenclature*

*Committee* (Yates et al., 2017). O portal *Hereditary Hearing Loss Homepage* (Van Camp & Smith, 2018), acessado em julho de 2018, descreve o número de lócus e genes já descritos associados aos quadros de surdez hereditária não-sindrômica: 70 lócus, com um total de 68 genes com padrão de herança autossômica recessiva; 32 lócus, com um total de 33 genes com padrão de herança autossômica dominante; 5 lócus e 5 genes com padrão de herança ligada ao cromossomo X. Além destes genes nucleares, os genes mitocondriais *MT-RNR1* e *MT-TS1* também estão associados a formas de surdez hereditária não-sindrômica, conforme revisto por Usami & Nishio (2004).

O primeiro lócus identificado como responsável pela surdez não-sindrômica autossômica recessiva foi o DFNB1, mapeado na região cromossômica 13q11-q12 (Guilford et al., 1994). Nele, encontram-se o gene *GJB2*, que codifica a proteína conexina 26, composta por 226 aminoácidos (Kiang, Jin, Tu, & Lin, 1997) e o gene *GJB6*, que codifica a proteína conexina 30, composta por 261 aminoácidos (Grifa et al., 1999). As conexinas são proteínas transmembrânicas que se hexamerizam para formar estruturas chamadas de conexons, responsáveis pela formação de canais em junções celulares comunicantes do tipo *gap*. Estes canais podem ser homotípicos, quando formados por dois conexons idênticos, ou heterotípicos, quando formados por conexons diferentes, e ambas as formas permitem a difusão de pequenas moléculas entre as células, o que permite regulação e controle do conteúdo celular (Bruzzone, White, & Paul, 1996).

Junções comunicantes do tipo *gap* são abundantes em diversas estruturas da cóclea. As conexinas 26 e 30 são predominantes nas formações das junções neste órgão, no qual se acredita que exerçam importante função na reciclagem dos íons potássio, etapa essencial durante os processos auditivos de transdução dos sinais mecânicos em sensoriais. Por isso, foi previsto que a disrupção destes processos de reciclagem esteja associada aos quadros de surdez decorrentes de mutações nos genes *GJB2* e *GJB6* (Zhao, Kikuchi, Ngezahayo, & White, 2006), embora se saiba atualmente que alterações nos genes que codificam as conexinas contribuem para outros processos de desenvolvimento da cóclea que causam perda auditiva quando comprometidos (Wingard & Zhao, 2015).

A despeito da enorme heterogeneidade genética da surdez, tem sido observado que mutações no lócus DFNB1 são responsáveis por até 50% dos casos de surdez não-sindrômica genética recessiva em muitas populações (Oliveira et al., 2004; Zelante et al., 1997). A grande maioria dos indivíduos com surdez decorrente de alterações no lócus DFNB1 apresenta mutações no gene *GJB2* em homozigose ou heterozigose composta, sendo a mutação c.35delG/p.Gly12Valfs a mais frequentemente encontrada em diversos

grupos populacionais, inclusive na população brasileira (Batissoco et al., 2009; Oliveira et al., 2004, 2007). Além desta mutação, quase 300 variantes patogênicas já foram descritas no gene *GJB2*, de acordo com o portal *Deafness Variation Database* (The Molecular Otolaryngology and Renal Research Laboratories), acessado em julho de 2108. A surdez causada por alterações patogênicas no gene *GJB2* apresenta elevada variabilidade fenotípica, mas geralmente é do tipo neurossensorial, congênita, bilateral e não progressiva, com gravidade que varia de leve a profunda (Smith & Van Camp, 2014).

Dentre os indivíduos com surdez associada ao lócus DFNB1, de 10% a até 50% apresentam somente uma mutação recessiva no gene *GJB2*, o que sugere que a surdez nestes indivíduos decorra de alterações no gene *GJB2* associadas com alterações em outros genes ou em regiões regulatórias. A pesquisa molecular do lócus DFNB1 em indivíduos surdos com mutações ditas monoalélicas no gene *GJB2* revelou a presença de deleções que incluem o gene *GJB6*, ou parte dele. Combinadas com mutações em heterozigose na região codificante do gene *GJB2*, essas alterações sugeriram possível herança digênica, devido a uma interação entre os produtos gênicos destes dois genes. Por outro lado, postulou-se a existência de um elemento regulatório que interfere na expressão do gene *GJB2* e que seria perdido com as deleções que acontecem em regiões próximas deste lócus (Del Castillo et al., 2005). Evidências a favor de um elemento regulatório em *cis* foram obtidas com a identificação de deleções em regiões próximas aos genes *GJB2* e *GJB6*, mas que não os incluem, em indivíduos afetados por perda auditiva com mutação patogênica em heterozigose no gene *GJB2* no outro alelo (Tayoun et al., 2016; Wilch et al., 2010). Nem todos os casos de surdez em indivíduos com mutações monoalélicas no gene *GJB2* podem ser explicados por deleções no lócus DFNB1, o que não permite concluir se a surdez destes indivíduos ocorre por outra causa não estabelecida ou se é decorrente da alteração no gene *GJB2* em conjunto com outra alteração genética ainda não identificada ou por mera coincidência.

Por conta da importância do lócus DFNB1 como causa de quadros de surdez não-sindrômica, é comum que a pesquisa de mutações neste lócus seja a primeira etapa do diagnóstico molecular, procedimento inclusive sugerido pelo *American College of Medical Genetics and Genomics* (ACMG) (Alford et al., 2014). Caso não seja encontrada a causa genética após esta primeira triagem, a busca pelas mutações causais é um processo desafiador, para o qual diversas estratégias de estudo molecular podem ser utilizadas de acordo com os objetivos e a disponibilidade de recursos.

### 1.3 Técnicas de sequenciamento de DNA para estudo de variantes associadas a doenças

O desenvolvimento das técnicas de sequenciamento de DNA a partir do método de Sanger (1977) e a implementação da reação em cadeia da polimerase (PCR), 6 anos depois, revolucionaram os estudos de genética molecular. Graças ao advento destas técnicas foi possível, em 2001, que os responsáveis pelo Projeto do Genoma Humano publicassem o primeiro rascunho da sequência do genoma humano (Lander et al., 2001).

A técnica de sequenciamento Sanger é considerada o padrão ouro para diagnósticos genéticos baseados em sequenciamento de DNA e tem contribuído significativamente para os testes moleculares diagnósticos de diversas condições genéticas. Quando há necessidade de validação de dados gerados pelas técnicas modernas de sequenciamento, é recomendada a confirmação pela metodologia de Sanger (Rehm et al., 2013), ressaltando sua alta especificidade e importância. Entretanto, para a análise de múltiplos genes ou genes muito grandes, é um procedimento muito trabalhoso e de alto custo, uma vez que só é possível gerar sequências de tamanho máximo de cerca de 1kb por reação.

Até o início dos anos 2000, a identificação de lócus genéticos associados a doenças era realizada principalmente por estudos de ligação utilizando-se marcadores moleculares como microssatélites ou polimorfismos de base única (SNPs), seguidos de sequenciamento de numerosos genes candidatos pela metodologia de Sanger. Era necessário o estudo de grande número de indivíduos de uma mesma família, o que gerava impacto no tempo e no custo dos testes, e, em muitos casos, com resultados inconclusivos, como revisto por Brownstein et al., (2012).

Ao longo das últimas duas décadas, um intenso aprimoramento das tecnologias de sequenciamento de DNA tem permitido a geração de maiores volumes de sequências a custos e prazos cada vez menores, proporcionando maior fluidez à pesquisa e aos diagnósticos moleculares. O sequenciamento massivo paralelo, também chamado de sequenciamento de nova geração (NGS, do inglês *Next Generation Sequencing*), é uma das técnicas que tem contribuído significativamente para este processo. As diversas plataformas que utilizam esta tecnologia diferem entre si por questões técnicas quanto ao preparo das reações e análise dos dados, mas compartilham algumas características: a possibilidade de geração simultânea de um grande número de sequências (paralelização), alta cobertura das regiões sequenciadas e a geração de milhões de leituras (fragmentos

sequenciados) de tamanho relativamente pequeno que são alinhadas por sistemas computacionais (Shearer et al., 2011).

Para realizar análises de sequências em qualquer plataforma de sequenciamento de nova geração, é necessário criar uma biblioteca de DNA, ou seja, uma coleção de fragmentos a serem sequenciados, cuja preparação costuma ter em comum as seguintes etapas: fragmentação do DNA genômico, ligação de adaptadores aos fragmentos de DNA, amplificação clonal dos fragmentos e o sequenciamento propriamente dito. A análise e o armazenamento do grande volume de dados gerados pelo sequenciamento requerem um potente suporte computacional, com ferramentas de bioinformática para o tratamento dos dados, bem como a utilização de bancos de dados específicos de variação genética para a interpretação dos resultados. Normalmente, após o sequenciamento, as etapas de bioinformática seguidas são: o mapeamento das leituras e alinhamento ao genoma de referência, filtragem das leituras de acordo com sua qualidade, identificação de variantes e anotação de variantes. Cada uma delas é igualmente importante para o sucesso final da análise (Tucker, Marra, & Friedman, 2009).

O sequenciamento de nova geração permite sequenciar o genoma humano completo em poucas horas ou dias, de acordo com o protocolo utilizado, mas esta análise do genoma em larga escala ainda não é comum no diagnóstico genético. Características intrínsecas das moléculas de DNA dificultam o sequenciamento uniforme de todas as regiões, o que aumenta o número de leituras necessárias para a detecção acurada de variantes, elevando os custos da técnica. Além disso, a interpretação das variantes encontradas ao longo de toda a sequência, sobretudo nas regiões não codificantes, para as quais não se tem muita informação disponível, ainda é um processo complexo e dispendioso (Best et al., 2018; Gao & Dai, 2014). Uma alternativa interessante ao estudo do genoma completo é o sequenciamento após enriquecimento genômico e captura, que permite restringir o número de regiões a serem analisadas.

Diferentes estratégias podem ser adotadas para a captura das regiões genômicas de interesse. É possível realizar este processo por reações de PCR multiplex com diversos oligonucleotídeos das regiões de interesse em um único ensaio, por exemplo, ou utilizar sondas que se hibridizam às regiões de interesse em lâminas ou em solução (Mamanova et al., 2010).

As técnicas de enriquecimento genômico e captura seguidas de sequenciamento de nova geração têm sido frequentemente utilizadas para o sequenciamento do exoma. Uma vez que há maior conhecimento a respeito das variantes presentes nos exons e

prediz-se que cerca de 85% das mutações patogênicas encontram-se em regiões codificantes e sítios de *splicing*, o sequenciamento do exoma tem sido frequentemente empregado para a pesquisa e o diagnóstico molecular, com taxas de detecção de variantes patogênicas ou provavelmente patogênicas em torno de 25% a 30% quando empregado em amostras de pacientes para os quais se suspeita de doença de causa genética não determinada (Fitzgerald et al., 2015; Shearer et al., 2011; Wu et al., 2013). Outra possibilidade de estratégia de enriquecimento genômico e captura é a análise de painéis. Por delimitar a preparação de bibliotecas e análise de dados a um grupo restrito de genes, que pode ser planejado de acordo com os objetivos, os custos e prazos para finalização são reduzidos em relação ao sequenciamento completo do exoma e do genoma humano. Além disso, é comum que análises de painéis apresentem maior especificidade quando comparadas a análises mais abrangentes, uma vez que a distribuição das leituras costuma ser mais uniforme entre as regiões analisadas e os parâmetros da corrida de sequenciamento podem ser ajustados para permitir maior cobertura das regiões selecionadas para estudo. A necessidade de atualização constante da lista dos genes de interesse, entretanto, é uma limitação da análise de painéis, uma vez que para determinadas condições, como surdez, por exemplo, ainda há diversos lócus conhecidos para os quais ainda não se tem informação sobre qual o gene responsável pelo fenótipo (Shearer et al., 2011) e certamente há mais lócus e genes ainda a ser descobertos.

Atualmente, as técnicas de sequenciamento de nova geração, em combinação com outras técnicas moleculares ou não, têm contribuído significativamente para a descoberta de novos genes e novas mutações associadas a diferentes quadros clínicos, mesmo em famílias pequenas ou até em casos isolados. Entretanto, a classificação das variantes encontradas por estas técnicas é um processo desafiador e de fundamental importância para os diagnósticos moleculares. A classificação das variantes deve ser realizada de maneira objetiva, sistemática, idealmente baseada em evidências, além de ser reprodutível, para evitar o viés de análise dos profissionais envolvidos. No esforço de reduzir as discrepâncias recorrentes na classificação de variantes, o ACMG publicou em 2015 (Richards et al., 2015) um sistema com diversas recomendações que permitem a classificação de cada variante em 5 categorias, quanto ao seu significado clínico: patogênicas, provavelmente patogênicas, variantes de efeito desconhecido (VUS), provavelmente benignas e benignas. Embora existam críticas e refinamentos ao sistema proposto por parte de alguns autores (Nykamp et al., 2017) e ainda não haja consenso em alguns casos (Pepin et al., 2016), este documento do ACMG foi um passo importante para

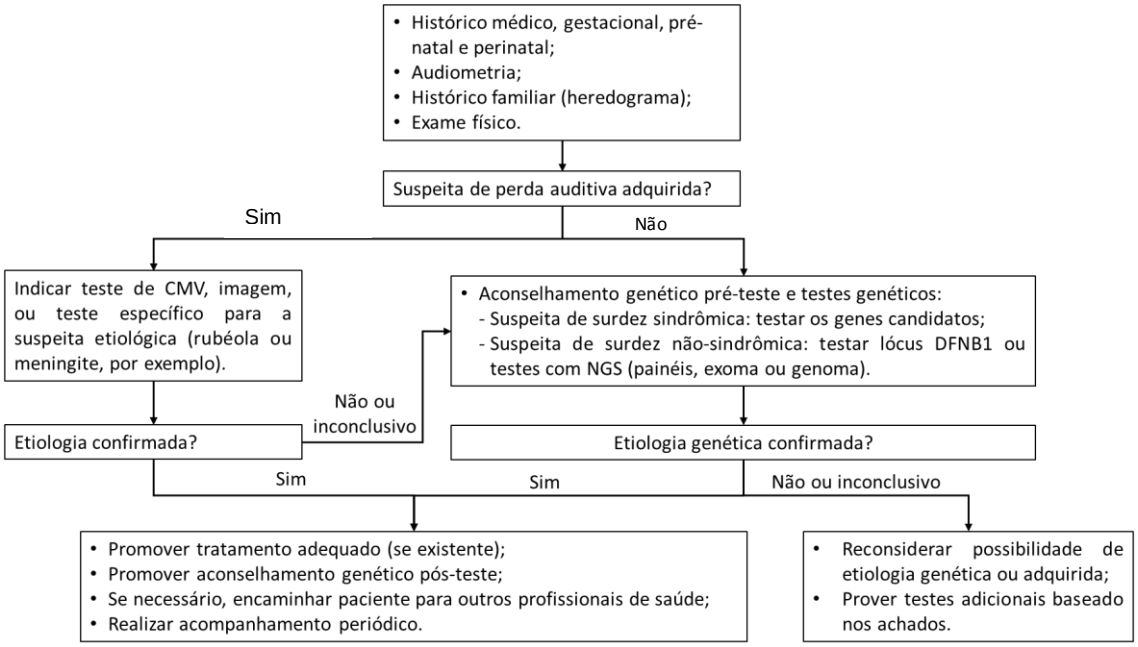
o estabelecimento de uma linguagem comum na classificação clínica de variantes, utilizado atualmente como referência para a elaboração de laudos contendo resultados de análises moleculares em diversos centros de diagnóstico molecular.

### 1.4 O sequenciamento de nova geração aplicado ao estudo molecular da surdez

Historicamente, os testes diagnósticos para surdez eram realizados por meio de genotipagem de mutações específicas, sequenciamento de genes únicos ou conjuntos pequenos de genes, muitas vezes de maneira seriada. Esta estratégia é mais eficaz nos casos em que, de acordo com as manifestações clínicas, há um gene candidato com maior probabilidade de ser causa, como por exemplo nos casos de síndrome de Pendred (gene *SLC26A4*) ou síndrome de Waardenburg tipo I (*PAX3*) e tipo II (*MITF* e *SOX10*) (Alford et al., 2014). Em casos sindrômicos em que não há um gene candidato definido ou em casos de surdez não-sindrômica após a triagem dos lócus DFNB1, há centenas de genes dentre os quais se pode encontrar a causa do distúrbio, o que torna inviável a estratégia de pesquisar cada gene individualmente ou em conjuntos pequenos. As técnicas de sequenciamento de nova geração têm sido de grande utilidade nesses casos, uma vez que permitem a pesquisa simultânea de dezenas e até centenas de genes relacionados a surdez em uma única análise.

As diretrizes para a avaliação molecular da perda auditiva publicadas pelo ACMG sugerem o estudo molecular por meio das técnicas de NGS após triagem do lócus DFNB1 com resultado normal, seja por sequenciamento de painéis de múltiplos genes relacionados à perda auditiva, ou por meio do sequenciamento do exoma ou até mesmo do genoma completo (Alford et al., 2014), conforme apresentado na figura 1.

Figura 1. Estratégias para a avaliação da perda auditiva propostas pelo ACMG.




Fonte: adaptado de Alford et al., 2014

Considerando a enorme heterogeneidade genética da surdez, optar pelo sequenciamento do exoma é uma alternativa eficiente, pois é possível analisar todos os genes já descritos como causa de surdez e, caso novos genes sejam descritos, os dados podem ser reanalisados de maneira a contemplar a lista atualizada de genes. Além disso, o sequenciamento do exoma pode ser realizado após estudos de ligação e associação, para analisar os genes da região candidata. Foi a combinação destas técnicas que permitiu, por exemplo, a descoberta de mutações nos genes *GSPM2* (Walsh et al., 2010) e *KITLG* (Zazo Seco et al., 2015), responsáveis por surdez sindrômica. De fato, o sequenciamento do exoma tem contribuído grandemente ao estudo molecular da surdez. Até 2010, cerca de 60 genes relacionados a surdez não-sindrômica eram conhecidos. Entre 2010 e 2014, estudos que empregaram o sequenciamento do exoma por NGS permitiram a descoberta de 21 novos genes causando surdez não-sindrômica (Atik, Bademci, Diaz-Horta, Blanton, & Tekin, 2015).

Ao optar pelo sequenciamento completo do genoma ou do exoma para a pesquisa molecular da surdez, é importante lembrar que, dependendo da plataforma e do método de preparo de bibliotecas escolhido, variações no número de cópias (CNVs) ou deleções e inserções de éxons podem não ser detectadas, e como já citado anteriormente, a cobertura pode não ser uniforme ao longo de todas as regiões genômicas analisadas e, portanto, testes adicionais podem ser necessários. Além da complexidade da análise do grande volume de dados gerados, é importante considerar o custo do sequenciamento do

genoma e do exoma, que ainda são relativamente altos em relação a outras análises menos abrangentes. Além disso, o sequenciamento do exoma tem uma particularidade ética importante, pois o ACMG recomenda que, além das variantes encontradas nos genes diretamente relevantes para a patologia em estudo, variantes patogênicas eventualmente encontradas em um conjunto específico de 59 genes selecionados, denominadas em conjunto de achados incidentais, também sejam reportadas compulsoriamente (Green et al., 2013). Isso implica também em aconselhamento genético para orientação sobre o impacto das eventuais variantes encontradas, que não terão relação com o quadro de surdez.

A análise de painéis multigênicos para o estudo da surdez tem sido adotada por diversos grupos, com importante crescimento na taxa de diagnóstico independentemente de padrão de herança genética ou etnia (Shearer & Smith, 2015). Pesquisadores do Laboratório de Pesquisa Molecular de Otoloaringologia e do Rim da Universidade de Iowa publicaram em 2010 a primeira descrição de um painel multigênico para a pesquisa molecular de surdez, denominado OtoSCOPE (do inglês *otologic sequence capture of pathogenic exons*) (Shearer et al., 2010). Inicialmente, o teste analisava 54 genes relacionados à surdez, porém, à medida em que novos genes têm sido descritos, o painel tem sido atualizado periodicamente. No maior estudo já publicado até o momento em que houve utilização do OtoSCOPE, foram analisadas amostras de 1119 pacientes com perda auditiva, das quais 408 foram preparadas com a versão 4 do painel, em que foram pesquisados 66 genes; as outras 711 amostras foram preparadas com a versão 5 do painel, que contempla 89 genes causais de surdez. Neste estudo foi possível identificar a causa da surdez em 440 casos (39%), com a identificação de variantes patogênicas em 49 genes (Sloan-Heggen et al., 2016). No início de 2018, o painel já estava em sua versão 7, contemplando cerca de 150 genes de surdez (Booth et al., 2018). Atualmente, o painel está em sua versão 8 e analisa 152 genes, permitindo a pesquisa tanto de variantes de sequência, como nucleotídeos únicos, pequenas deleções e inserções bem como a detecção de variações no número de cópias (https://morl.lab.uiowa.edu/clinical-diagnostics/deafness-otoscope/otoscope-genetic-testing).

Pesquisadores alemães da Universidade de Würzburg publicaram resultados de testes com painéis em que analisaram de 80 a 129 genes associados a surdez em que foi possível encontrar a causa genética da perda auditiva em 12 de 23 probandos (52%) (Vona et al., 2014).

Em uma revisão de 15 estudos que empregaram a análise de paineis por sequenciamento de nova geração para a pesquisa molecular da surdez, Smith e Shearer (2015) reportaram taxas de detecção que variaram entre 10% e 83%, com valor médio de 41%. A variação das porcentagens da taxa de detecção pode ser explicada pelas diferentes estratégias de seleção dos probandos e pela variação no número de genes analisado por cada painel.

Assim como para qualquer condição genética, a padronização da interpretação de variantes encontradas nos testes genéticos para surdez é essencial para obter diagnósticos precisos. Considerando o elevado número de variantes encontradas com as técnicas de NGS, é importante que as variantes encontradas sejam adequadamente classificadas quanto ao seu efeito clínico, para que a relação genótipo-fenótipo e o diagnóstico molecular sejam acurados. Para auxiliar os profissionais envolvidos nesta tarefa, diversos pesquisadores de centros especializados em genética da surdez submeteram um manuscrito (Oza et al., 2018) no qual é sugerida a adaptação dos critérios da ACMG previamente descritos para interpretação de variantes (Richards et al., 2015) especificamente para o contexto da genética da surdez. Esta publicação recomenda a remoção de quatro regras de classificação de variantes previamente descritas e especifica a aplicação de outras 21 regras de acordo com particularidades dos genes envolvidos na surdez, com o objetivo de padronizar a orientação aos pacientes submetidos a testes genéticos para esta condição.

### 1.5 Aconselhamento genético nos casos de surdez

Conforme revisto por Pina-Neto (2008), a definição clássica de Aconselhamento Genético foi proposta inicialmente por Fraser (1974) e referendada pela Associação Americana de Genética Humana (ASHG) em 1975 e o descreve como “o processo de comunicação que cuida dos problemas humanos associados à ocorrência ou recorrência de uma doença genética em uma família”. Em uma publicação que sugere revisão do conceito de aconselhamento genético, Resta et al.(2006) o definem como “o processo de prover informações que auxiliem indivíduos a entender os aspectos médicos, psicológicos e as implicações familiares associadas à ocorrência de doenças genéticas”. Este processo idealmente integra as seguintes etapas:

a) Interpretação do histórico médico e familiar para avaliação dos riscos de ocorrência e recorrência;

b) Informações a respeito do mecanismo de herança, testes genéticos, condutas e pesquisa;
c) Aconselhamento que permita ao consulente tomar decisões informadas a respeito dos riscos da condição.

O processo de aconselhamento genético nos casos de surdez reflete a complexidade genética desta condição. Por conta da enorme heterogeneidade genética da surdez, nem sempre os testes chegam a um resultado conclusivo, portanto, é necessário que o paciente esteja informado quanto às limitações da realização de testes moleculares e dos seus resultados (Smith, Hildebrand, & Van Camp, 2010).

A surdez afeta uma habilidade essencial para qualquer processo de aconselhamento genético: a comunicação. Para reduzir os eventuais efeitos desta limitação nas consultas, os profissionais incumbidos do aconselhamento genético de surdos podem necessitar utilizar recursos como a linguagem de sinais e videofones, por exemplo (Baldwin, Boudreault, Fox, Sinsheimer, & Palmer, 2012). Quando o consulente surdo necessita que algum familiar o acompanhe apenas para suprir a dificuldade de comunicação, e não por escolha própria, sua autonomia e individualidade não são preservadas, o que vai contra princípios básicos do processo de aconselhamento genético como proposto (Fraser, 1974). No entanto, essa tem sido uma alternativa frequente quando não há no aparato de saúde condições ideais para atendimento dos surdos.

O profissional responsável pelo aconselhamento genético deve ter a consciência de que a percepção sobre a surdez pode ser diferente entre os indivíduos. Uma parcela da população surda se considera como uma comunidade cultural distinta com atitudes, linguagem e comportamentos específicos (Arnos, 2003). Este grupo não considera a surdez como deficiência, mas como um aspecto da diversidade humana que é importante para sua cultura, e por isso podem apresentar postura contrária a tratamentos e a procedimentos que impeçam a transmissão da surdez para as gerações seguintes, pelo receio de que as técnicas genéticas levem a uma redução significante da comunidade surda (Lane, 2005; Middleton, Hewison, & Mueller, 1998). Esta particularidade da percepção da condição genética amplia o debate ético em torno da realização de testes genéticos pré-natais e pré-implantacionais (PGTs) para surdez. O PGT é definido pelo Glossário Internacional de Infertilidade e Fertilidade (Zegers-Hochschild et al., 2017) como um teste realizado para detectar anormalidades genéticas, e referindo-se especificamente ao teste genético pré-implantacional para condições monogênicas (PGT-M), a definição o trata como um teste para defeitos gênicos. Usualmente o PGT é

realizado para selecionar embriões livres de tais condições, porém, já houve casos em que casais surdos procuraram centros de reprodução com o desejo de selecionar embriões com a mesma alteração genética causal da surdez, já que não a consideram uma doença genética, o que abre espaço para o debate a respeito dos aspectos éticos e jurídicos dos procedimentos genéticos pré-implantacionais para surdez e até mesmo para as definições de deficiência (Camporesi, 2010; Emery, Middleton, & Turner, 2010).

Por outro lado, diversos estudos descrevem que uma parcela dos indivíduos surdos relatam uma melhora na compreensão sobre sua condição e até sobre sua identidade cultural após obterem informação adequada a respeito do resultado de testes genéticos que indicam a causa da surdez (Burton, Withrow, Arnos, Kalfoglou, & Pandya, 2006). A descoberta de mutações que causam o distúrbio costuma ter impacto positivo aos consulentes (Withrow et al., 2009), pois permite tanto ao probando quanto a seus familiares, sob aconselhamento genético adequado, obterem informações sobre o prognóstico da condição detectada, quando conhecido, e auxiliam no planejamento familiar, no qual podem ser considerados os mecanismos genéticos de transmissão da surdez, bem como as estimativas dos riscos de recorrência. Além disso, o diagnóstico molecular traz conforto às famílias no que diz respeito a finalizar a busca pela causa do problema, evitando que testes invasivos e por vezes, dispendiosos, sejam realizados sem necessidade (Arnos, 2003).

Para que o aconselhamento genético nos casos de surdez seja realizado de maneira sensível às particularidades da percepção de surdos sobre sua condição, termos neutros podem ser utilizados ao longo do processo, como por exemplo: “chance” ao invés de “risco”, “surdos ou ouvintes” ao invés de “afetados ou normais”, além de evitar usar os termos “deficiência” ou “patologia” (Baldwin et al., 2012).

A descoberta dos genes e processos biológicos relacionados à manifestação do fenótipo é também o ponto inicial para a pesquisa de eventuais opções de tratamento para reduzir a progressão ou prevenir a manifestação da surdez (Hildebrand et al., 2008). Nos casos de identificação de variantes genéticas mitocondriais que causam predisposição à surdez por ototoxicidade medicamentosa, por exemplo, é possível reduzir a probabilidade ou retardar a manifestação do fenótipo abolindo o uso de medicamentos de risco (Nance, 2003).

A detecção de genes e mutações nos casos de surdez sindrômica tem como benefícios adicionais o potencial de identificar outras condições associadas, permitindo a atenção especializada dos profissionais de saúde aos possíveis órgãos e sistemas afetados

(Schein & Miller, 2008). A síndrome de Usher provê um exemplo importante neste caso, uma vez que crianças afetadas por esta condição não costumam manifestar sintomas da visão durante a primeira década de vida, mimetizando uma condição não-sindrômica. A descoberta de mutação responsável pelo quadro sindrômico, neste caso, permite atenção especializada aos problemas visuais que podem ocorrer ao longo do desenvolvimento.

## 2. Objetivos

O objetivo desta investigação foi contribuir ao estudo da heterogeneidade genética da surdez. Para isso, uma amostra de pacientes com perda auditiva atendidos no serviço de aconselhamento genético do Laboratório de Genética Humana (LGH) do Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo (IBUSP) foi investigada por meio do sequenciamento de nova geração.

Os objetivos específicos do projeto são:

a) Identificar as causas moleculares da surdez por meio do sequenciamento de nova geração de painel multi-gênico;
b) Avaliar a eficácia do painel de genes em identificar as causas genéticas da surdez em uma amostra brasileira;
c) Identificar novas mutações potencialmente patogênicas em genes já associados à surdez;
d) Promover o aconselhamento genético das famílias investigadas por meio da disponibilização dos resultados dos testes genéticos realizados.

## 3. Material e Métodos

### 3.1 Casuística

As amostras de DNA utilizadas neste estudo são provenientes de indivíduos portadores de distúrbios auditivos e familiares atendidos pelo Laboratório de Genética Humana (LGH) do Departamento de Genética e Biologia Evolutiva do Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo (IBUSP), avaliados desde o ano 2000 pelo serviço de aconselhamento genético do laboratório, realizado no Centro de Estudos sobre o Genoma Humano e Células Tronco (CEGH-CEL). Diversos serviços encaminharam pacientes para atendimento do LGH, dentre eles, a Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (FMUSP), o serviço de aconselhamento genético da Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP), a Divisão de Educação e Reabilitação

dos Distúrbios da Comunicação (DERDIC) da PUC São Paulo, entre outros. Atualmente, o ambulatório dedicado a indivíduos com perda auditiva já conta com cerca de 900 famílias atendidas, cujas amostras estão disponíveis para pesquisa.

Para este estudo, foram utilizadas amostras de 91 probandos com perda auditiva para os quais se suspeitou de causa genética do distúrbio após aplicação de ficha de anamnese específica (Anexo A) em consulta inicial de aconselhamento genético, que teve por objetivo levantar e registrar informações clínicas e genealógicas importantes e identificar a etiologia do distúrbio. Todas as amostras selecionadas foram submetidas a exames moleculares de triagem conforme rotina do LGH (descritos no item 3.5.2). Foram selecionadas para este estudo apenas amostras com resultados normais nesses testes de triagem e, portanto, com a causa da perda auditiva não caracterizada do ponto de vista dos testes moleculares. As amostras foram classificadas de acordo com as seguintes hipóteses diagnósticas e critérios de seleção:

a) surdez sindrômica - síndrome de Waardenburg: probandos de 9 genealogias com um ou mais indivíduos que apresentavam ao menos perda auditiva e alterações pigmentares no cabelo, olhos ou pele, sugerindo o diagnóstico clínico da síndrome.
b) surdez sindrômica - síndrome de Usher: probandos de 13 genealogias com um ou mais indivíduos que apresentavam perda auditiva e retinose pigmentar;
c) surdez não-sindrômica autossômica dominante: probandos de 12 genealogias em que a surdez se manifestou por pelo menos duas gerações consecutivas e nas quais foi identificada transmissão por meio de indivíduo(s) do sexo masculino;
d) surdez não-sindrômica autossômica recessiva: probandos de 20 genealogias com mais de um indivíduo surdo em uma irmandade cujos pais são ouvintes e de 17 genealogias em que indivíduos surdos são filhos de pais ouvintes consanguíneos;
e) surdez não-sindrômica com mais de um padrão de herança possível:

– autossômica dominante ou mitocondrial: probandos de 17 genealogias em que a surdez se manifestou por pelo menos duas gerações consecutivas, porém, não foi identificada transmissão por indivíduo(s) do sexo masculino;
– recessivo ligado ao X ou autossômico recessivo: um probando de uma genealogia que atende aos mesmos critérios para herança autossômica recessiva, porém, com dois afetados do sexo masculino na irmandade;

– autossômica dominante, autossômica recessiva ou mitocondrial: um probando de uma genealogia em que pais surdos tiveram um descendente também surdo;
– autossômica dominante, dominante ligada ao X ou mitocondrial: um probando de uma genealogia em que um indivíduo afetado tem pai, mãe e um meio-irmão materno afetados.

Para validação da técnica de sequenciamento de nova geração, foi incluída uma amostra de controle positivo cujo diagnóstico molecular já havia sido estabelecido por sequenciamento pelo método de Sanger pelos testes de triagem de rotina do LGH.

### 3.2 Aspectos éticos

O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa - Seres Humanos (Parecer 1.133.416 - 23/06/2015) do Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo, sem necessidade de apreciação pela Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP). As amostras foram coletadas mediante assinatura de termo de consentimento livre esclarecido (Anexo B)

### 3.3 Aconselhamento genético

Indivíduos de todas as famílias participantes foram atendidos pela Profa. Dra. Regina Célia Mingroni Netto, em sua maioria, ou por geneticistas colaboradores. Casos que necessitaram de exame clínico por causa da presença de possíveis sinais sindrômicos foram avaliados também pelo Prof. Dr. Paulo Alberto Otto ou pelo Prof. Dr. Fernando Kok. Após a primeira consulta de aconselhamento genético e realização dos exames de triagem, os pacientes foram convocados para uma nova consulta na qual receberam um relatório com o resultado dos testes de triagem. Além disso, foram orientados sobre o provável mecanismo de herança e o risco de recorrência da perda auditiva em sua família. Para os casos em que foi possível identificar a causa do distúrbio após as análises que fizeram parte desse estudo, um segundo relatório foi redigido com informações detalhadas sobre a(s) variante(s) detectadas e os pacientes foram reconvocados para uma nova sessão de aconselhamento genético.

### 3.4 Responsáveis pelas etapas desse estudo

O aluno Humberto Vicente Cezar Marcolino, sob orientação da professora Regina Célia Mingroni Netto, iniciou no ano de 2014 o projeto de mestrado acadêmico

com o título “Sequenciamento de Nova Geração aplicado ao estudo da heterogeneidade genética na surdez”. Ele contribuiu com as etapas de seleção de genes e desenho do painel, foi o responsável pela construção das bibliotecas de DNA para sequenciamento de nova geração, além de ter realizado as análises preliminares de cobertura, filtragem e interpretação das variantes. No entanto, solicitou a interrupção de seu programa de mestrado. Por este motivo, foi dada a mim responsabilidade de dar continuidade este projeto de pesquisa como parte dos requisitos para obtenção do título de mestre no programa de mestrado profissional em Aconselhamento Genético e Genômica Humana do IBUSP. A partir de então, foram realizadas as seguintes etapas:

a) revisão da bibliografia;
b) revisão da metodologia empregada;
c) reanálise dos dados de sequenciamento de nova geração;
d) análises de segregação - revisão dos resultados de sequenciamento de Sanger já realizados e execução das análises pendentes.
e) Avaliação e classificação das variantes candidatas a explicar os quadros, de acordo com critérios do ACMG.

### 3.5 Análises moleculares

#### 3.5.1 Extração do DNA

Diferentes metodologias de extração de DNA foram empregadas, de acordo com o protocolo de rotina utilizado na época da coleta, incluindo técnicas clássicas de extração por fenol e clorofórmio, uso dos sistemas automatizados de extração como o Autopure LS ou QIASimphony - ambos da QIAGEN (Hilden, Alemanha) e *kit*s comerciais de extração de DNA, como por exemplo o *kit* Genomic DNA Isolation - Invitrogen (Calsbad, Califórnia).

#### 3.5.2 Triagem de mutações frequentes que causam surdez hereditária

Nas amostras de todos os probandos havia sido realizada uma etapa prévia de triagem molecular, conforme rotina do LGH, que consistiu dos seguintes testes:

a) Teste das mutações c.35delG / Gly12Valfs e c.del167T / p.Leu56fs no gene *GJB2* - realizada por PCR seguida de digestão do DNA com as enzimas de restrição *BstN* I (Wilcox et al., 2000) e *Pst* I (Zelante et al., 1997), respectivamente, ou por sequenciamento Sanger de toda a região codificante do gene;

b) Teste das deleções Δ(*GJB6*-D13S1830) e Δ(*GJB6*-D13S1854) no gene da conexina 30 (*GJB6*), detectáveis após PCR específica para essas deleções (Del Castillo et al., 2005);

c) Teste da mutação m.1555A>G no gene da subunidade 12S do ribossomo (*MT-RNR1*), detectável após PCR seguida de digestão do DNA com a enzima de restrição *Hae* III (Estivill et al., 1998).

Algumas amostras haviam sido também incluídas em outros projetos de pesquisa do LGH nos quais genes adicionais foram analisados completamante por sequenciamento de Sanger, como por exemplo, os genes *GJB2*, *SLC26A4*, *OTOF*, *PAX3*, entre outros, porém, em nenhum dos casos selecionados havia sido identificada a mutação causal da perda auditiva.

### 3.5.3 Desenho do painel multigênico para NGS

Com a ferramenta SureDesign (Agilent Technologies - disponível em: https://earray.chem.agilent.com/suredesign/) foi desenvolvido um painel multigênico de captura e enriquecimento para sequenciamento de nova geração que contemplou 99 genes, dos quais 93 são descritos como responsáveis por surdez não-sindrômica e sindrômica, conforme descrição no portal *Hereditary Hearing Loss Homepage* e o banco de dados *Online Mendelian Inheritance in Man* (OMIM) e outros 6 são genes candidatos identificados pelo LGH, após estudos de ligação e sequenciamento, como provavelmente causais de surdez quando mutados. O desenho do painel foi feito para cobrir idealmente todos os éxons dos genes escolhidos, incluindo 10 pares de base adjacentes a suas extremidades, para permitir também a análise dos sítios de recomposição (*splicing*). Para o gene *STRC* foi definido que as sondas deveriam capturar 50 pares de bases além das extremidades dos éxons para evitar a captura de sequências do pseudogene, que possui introns diferentes do gene. O desenho do painel permitiu que 80 dos 99 genes selecionados tivessem 100% das bases nas regiões de interesse contempladas, com apenas 2 genes apresentando porcentagem de cobertura das bases de interesse inferior a 90%. A tabela 2 apresenta a lista completa de genes selecionados com as respectivas justificativas para inclusão, além da porcentagem das bases das regiões de interesse de cada gene contempladas pelo desenho do painel.

**Tabela 2** – Lista de genes selecionados para o painel, justificativas para inclusão e porcentagem de cobertura das regiões alvo.

| Gene | Posição cromossômica | Justificativa para inclusão* | Cobertura das regiões alvo |
|---|---|---|---|
| *ACTG1* | chr17:79477706-79479390 | DFNA20/26 | 99,59% |
| *CABP2* | chr11:67286600-67290807 | DFNB93 | 100% |
| *CCDC50* | chr3:191047454-191109559 | DFNA44 | 100% |
| *CDH23* | chr10:73199579-73575045 | DFNB12 / Síndrome de Usher | 100% |
| *CEACAM16* | chr19:45202482-45213788 | Surdez AD | 100% |
| *CIB2* | chr15:78397643-78423567 | DFNB48 | 100% |
| *CLDN14* | chr21:37833264-37834003 | DFNB29 | 100% |
| *CLRN1* | chr3:150644629-150690505 | Síndrome de Usher | 100% |
| *CNRIP1* | chr2:68511550-68546542 | Candidato LGH | 100% |
| *COCH* | chr14:31344135-31359007 | DFNA9 | 100% |
| *COL11A2* | chr6:33131445-33160027 | DFNA13/DFNB53 | 98,89% |
| *COL4A6* | chrX:107386927-107682611 | DFNX6 | 97,78% |
| *CRYM* | chr16:21270092-21289582 | DFNA40 | 100% |
| *DIABLO* | chr12:122692918-122710571 | DFNA64 | 100% |
| *DIAPH1* | chr5:140896408-140998491 | DFNA1 | 99,36% |
| *DIAPH3* | chr13:60240708-60737910 | Surdez AD | 100% |
| *DNMT1* | chr19:10244333-10305585 | Candidato LGH | 99,72% |
| *DSPP* | chr4:88532051-88537730 | DFNA39* | 59,63% |
| *EDN3* | chr20:57875858-57899524 | Síndrome de Waardenburg | 100% |
| *EDNRB* | chr13:78470567-78493760 | Síndrome de Waardenburg | 100% |
| *ELMOD3* | chr2:85584312-85618095 | DFNB88 | 100% |
| *ESPN* | chr1:6485006-6521255 | DFNB36 | 99,82% |
| *ESRRB* | chr14:76777248-76967074 | DFNB35 | 98,86% |
| *EYA4* | chr6:133595909-133852374 | DFNA10 | 100% |
| *FOXI1* | chr5:169532952-169535625 | Síndrome de Pendred | 100% |
| *GIPC3* | chr19:3585586-3590198 | DFNB15/72/95 | 100% |
| *GJB2* | chr13:20763030-20763730 | DFNA3A/DFNB1A | 100% |
| *GJB3* | chr1:35250354-35251186 | DFNA2B | 100% |
| *GJB6* | chr13:20796824-20797629 | DFNA3B/DFNB1B | 100% |

continua

continuação

| Gene | Posição cromossômica | Justificativa para inclusão* | Cobertura das regiões alvo |
|---|---|---|---|
| *GPR98* | chr5:89825289-90459727 | Síndrome de Usher | 100% |
| *GPSM2* | chr1:109428135-109472572 | DFNB82 | 100% |
| *GRHL2* | chr8:102504988-102678941 | DFNA28 | 100% |
| *GRXCR1* | chr4:42895274-43032567 | DFNB25 | 100% |
| *GRXCR2* | chr5:145239286-145252541 | DFNB101 | 100% |
| *GSDME* | chr7:24738635-24789403 | DFNA5 | 100% |
| *HARS* | chr5:139968970-140070899 | Síndrome de Usher | 96,85% |

| | | | |
|---|---|---|---|
| *HGF* | chr7:81331887-81399297 | DFNB39 | 100% |
| *ILDR1* | chr3:121707057-121740934 | DFNB42 | 100% |
| *KARS* | chr16:75661783-75681547 | DFNB89 | 100% |
| *KCNJ10* | chr1:160011173-160012332 | Síndrome de Pendred | 100% |
| *KCNQ4* | chr1:41249756-41304205 | DFNA2A | 100% |
| *LHFPL5* | chr6:35773438-35787234 | DFNB66/67 | 100% |
| *LOXHD1* | chr18:44057136-44237006 | DFNB77 | 99,72% |
| *LRTOMT* | chr11:71799389-71819981 | DFNB63 | 100% |
| *MARVELD2* | chr5:68715203-68737491 | DFNB49 | 94,38% |
| *MIR96* | chr7:129414522-129414619 | DFNA50 | 100% |
| *MITF* | chr3:69788739-70014409 | Síndrome de Waardenburg | 100% |
| *MSRB3* | chr12:65672539-65857112 | DFNB74 | 100% |
| *MT-RNR1* | chrM:636-1609 | Surdez Mitocondrial | 100% |
| *MT-TS1* | chrM:7435-7523 | Surdez Mitocondrial | 100% |
| *MYH14* | chr19:50713613-50813151 | DFNA4 | 100% |
| *MYH9* | chr22:36678285-36745291 | DFNA17 | 97,50% |
| *MYO15A* | chr17:18022105-18082194 | DFNB3 | 99,79% |
| *MYO1A* | chr12:57422529-57442117 | DFNA48 | 100% |
| *MYO3A* | chr10:26241030-26501000 | DFNB30 | 100% |
| *MYO6* | chr6:76527255-76624739 | DFNA22/DFNB37 | 100% |
| *MYO7A* | chr11:76841671-76925751 | DFNB2, Síndrome de Usher | 100% |
| *NCOA3* | chr20:46250982-46282171 | Candidato LGH | 100% |
| *OTOA* | chr16:21689826-21771871 | DFNB22 | 100% |
| *OTOF* | chr2:26680898-26781449 | DFNB9 | 100% |
| *OTOGL* | chr12:80603229-80771838 | DFNB84B | 100% |
| *P2RX2* | chr12:133195393-133198568 | DFNA41 | 100% |
| *PAX3* | chr2:223065883-223163344 | Síndrome de Waardenburg | 100% |
| *PCDH15* | chr10:55566329-56424032 | DFNB23 / Síndrome de Usher | 99,66% |
| *PDZD7* | chr10:102768214-102790072 | DFNB57 / Síndrome de Usher | 100% |
| *PJVK* | chr2:179318127-179326011 | DFNB59 | 100% |
| *PLEK* | chr2:68592474-68622958 | Candidato LGH | 100% |
| *PLS1* | chr3:142383070-142430859 | Candidato LGH | 100% |
| *PNPT1* | chr2:55863362-55920968 | DFNB70 | 100% |
| *POU3F4* | chrX:82763323-82764428 | DFNX2 | 100% |
| *POU4F3* | chr5:145718666-145720017 | DFNA15 | 100% |

continua

continuação

| Gene | Posição cromossômica | Justificativa para inclusão* | Cobertura das regiões alvo |
|---|---|---|---|
| *PPP3R1* | chr2:68384583-68483257 | Candidato LGH | 100% |
| *PRPS1* | chrX:106871849-106893272 | DFNX1 | 99,49% |
| *PTPRQ* | chr12:80838116-81072812 | DFNB84 | 94,16% |
| *RDX* | chr11:110050593-110150427 | DFNB24 | 95,96% |
| *SERPINB6* | chr6:2948522-2971392 | DFNB91 | 89,95% |
| *SIX1* | chr14:61112991-61115917 | DFNA23 | 100% |
| *SLC17A8* | chr12:100751160-100813947 | DFNA25 | 100% |

| | | | |
|---|---|---|---|
| *SLC26A4* | chr7:107302077-107355901 | DFNB4, Síndrome de Pendred | 100% |
| *SLC26A5* | chr7:102993327-103061971 | DFNB61 | 100% |
| *SMPX* | chrX:21755671-21772418 | DFNX4 | 100% |
| *SNAI2* | chr8:49831356-49833834 | Síndrome de Waardenburg | 100% |
| *SOX10* | chr22:38367239-38379801 | Síndrome de Waardenburg | 100% |
| *STRC* | chr15:43891820-44010432 | DFNB16 | 100% |
| *TBC1D24* | chr16:2546140-2550969 | DFNA65/DFNB86 | 100% |
| *TECTA* | chr11:120973365-121061525 | DFNA8/12/DFNB21 | 100% |
| *TJP2* | chr9:71789279-71869300 | DFNA51 | 100% |
| *TMC1* | chr9:75242927-75455705 | DFNA36/DFNB7/11 | 98,61% |
| *TMIE* | chr3:46742968-46751188 | DFNB86 | 100% |
| *TMPRSS3* | chr21:43792861-43816261 | DFNB8/10 | 100% |
| *TNC* | chr9:117782825-117853307 | DFNA56 | 100% |
| *TPRN* | chr9:140086554-140095173 | DFNB79 | 100% |
| *TRIOBP* | chr22:38097363-38168779 | DFNB28 | 94,23% |
| *TSPEAR* | chr21:45919656-46131439 | DFNB98 | 100% |
| *USH1C* | chr11:17515869-17565864 | DFNB18, Síndrome de Usher | 100% |
| *USH1G* | chr17:72914158-72919178 | Síndrome de Usher | 100% |
| *USH2A* | chr1:215799113-216595688 | Síndrome de Usher | 100% |
| *WFS1* | chr4:6279173-6304205 | DFNA6/14/38 | 100% |
| *WHRN* | chr9:117165024-117267091 | DFNB31 | 100% |

* Exceto para os genes candidatos do LGH, a fonte consultada para a justificativa foi o portal *Hereditary Hearing Loss Homepage*, acessado em 06 de agosto de 2018 (http://hereditaryhearingloss.org/).

### 3.5.4 Preparo das bibliotecas de DNA

As bibliotecas de DNA foram preparadas de acordo com as instruções do protocolo do *kit* SureSelect$^{QXT}$ Target Enrichment for Illumina Multiplexed Sequencing - Agilent Technologies (Santa Clara, EUA).

Inicialmente, as amostras foram quantificadas com a utilização do aparelho Qubit - Thermo Fisher Scientific (Waltham, EUA), um quantificador colorimétrico de DNA, utilizando os *kits* de quantificação Qubit dsDNA BR Assay (Thermo Fisher Scientific) e Qubit dsDNA High Sensitivity Assay (Thermo Fisher Scientific). Após quantificação, todas as amostras tiveram sua concentração normalizada para 25ng/µl.

A primeira etapa do preparo foi composta pela fragmentação enzimática do DNA e adição de adaptadores às extremidades dos fragmentos gerados. Para isso, foi preparada uma reação de fragmentação para cada amostra, contendo 17µl de SureSelect QXT Buffer, 50ng de DNA e 2µl de SureSelect QTX Enzyme Mix. Essa mistura foi incubada a 45ºC por 10 minutos em um termociclador e a seguir resfriada a 4°C. Para interromper o processo de fragmentação foram adicionados 32µl de 1X SureSelect QXT Stop Solution contendo 25% de etanol em cada tubo, seguida de incubação por 1 minuto

à temperatura ambiente. Em seguida, as bibliotecas foram purificadas utilizando-se partículas magnéticas Agencourt AMPure XP *beads* - Beckman Coulter (Brea, EUA), seguindo as etapas: ligação dos fragmentos de DNA às *beads*; isolamento da mistura de *beads* ligadas aos fragmentos de DNA com uma estante magnética própria para este fim; lavagem das *beads* em etanol 70%; eluição dos fragmentos de DNA purificados em água ultra-pura, livre de nucleases. Para esta primeira purificação foram utilizados 52µl de AMPure XP *beads* e a eluição foi realizada em 11µl de água ultra-pura.

A etapa seguinte consistiu de reparo das extremidades dos fragmentos de DNA e amplificação por PCR. Para isso, em cada reação, foram adicionados 25µl de água ultra-pura, livre de nucleases, 10µl de 5× Herculase II *Reaction Buffer*, 0,5ul de 100mM dNTP Mix, 2.5µl de DMSO, 1µl de SureSelect QXT *Primer Mix*, 1µl de Herculase II Fusion DNA Polymerase e 10µl de biblioteca. As reações foram submetidas a um programa de ciclagem em termociclador com as seguintes etapas: 68°C por 2 minutos, 98ºC por 2 minutos, 8 ciclos a 98ºC por 30 segundos, 57ºC por 30 segundos e 72ºC por 1 minuto, com extensão final de 72ºC por 5 minutos e resfriamento a 4ºC. Em seguida, as bibliotecas foram purificadas novamente utilizando-se 50µl de partículas magnéticas (Agencourt AMPure XP *beads*) e eluídas em 13µl de água ultra-pura livre de nucleases.

Após a amplificação, as bibliotecas foram analisadas em relação às quantidades de DNA e tamanho dos fragmentos gerados no equipamento Bioanalyzer (Agilent Tecnhologies), utilizando-se o *kit* Bioanalyzer DNA 1000 Assay (Agilent Technologies). A concentração das bibliotecas de DNA foi normalizada para que cada biblioteca amplificada apresentasse entre 500 e 750ng/µl de DNA em volume final de 12µl.

Na etapa seguinte ocorreu a hibridização entre as sondas do painel multigênico, (SureSelect XT Custom Capture Library) e os fragmentos de interesse de DNA amplificados da biblioteca em construção. As sondas são sequências de RNA complementares às sequências de DNA de interesse. Foi preparada uma reação com 12µl da biblioteca e 5µl de SureSelect QXT Fast Blocker Mix. Essa mistura foi incubada em um termociclador a 95°C por 5 minutos, e foi mantida a 65ºC por pelo menos 10 minutos. Sem retirar os tubos do termociclador, foram adicionados 13µl de uma mistura preparada previamente, contendo 2µl de 25% RNase Block solution, 2µl de SureSelect XT Custom Capture Library, 6µl de SureSelect QXT Fast Hybridization Buffer e 3µl de água livre de nucleases. Em seguida, as amostras foram submetidas a ciclagem em termo ciclador composta de 60 ciclos a 65ºC por 1 minuto e 37ºC por 3 segundos, e, por fim, foram mantidas a 65ºC por tempo indefinido.

As sondas do painel são biotiniladas, o que permite que elas sejam separadas por afinidade com estreptavidina no processo de enriquecimento das bibliotecas. Para isto, foi realizado o preparo das *beads* de estreptavidina (Dynabeads MyOne Streptavidin T1 – Thermo Fisher Scientific) da seguinte forma: 50µl de Dynabeads MyOne Streptavidin T1 magnetic *beads* (Thermo Fisher Scientific) foram misturadas com 200µl de SureSelect Binding Buffer, por amostra. Depois de 5 minutos na estante magnética, o sobrenadante da solução foi descartado. Esse processo mais 2 vezes e por fim, as *beads* foram ressuspendidas em 200ul de SureSelect Binding Buffer.

A um volume de 30µl de cada biblioteca foram adicionados 200µl de *beads* de estreptavidina preparadas anteriormente. Essa mistura foi incubada por 30 minutos em um agitador a 1800 rotações por minuto. Nessa etapa, o complexo de DNA capturado e sondas se ligou às *beads* de estreptavidina. Após a agitação, o volume total de bibliotecas e *beads* foi transferido para microtubos que foram posicionados na estante magnética por 1 minuto e após este período o sobrenadante foi descartado. O *pellet* de *beads* ligadas aos fragmentos de DNA capturados foi ressuspendido em 200µl de SureSelect Wash Buffer 1, a mistura foi colocada novamente na estante magnética por 1 minuto e após este período o sobrenadante foi descartado. Outra etapa de lavagem do *pellet* foi realizada utilizando-se 200µl de Wash buffer 2 aquecido a 65ºC para ressuspender o *pellet* e a mistura foi incubada a 65ºC por 5 minutos. A solução foi colocada na estante magnética por um minuto e o sobrenadante de cada tubo foi descartado. Esse processo de lavagem com o Wash buffer 2 foi repetido mais duas vezes. Por fim, as *beads* contendo as bibliotecas capturadas foram ressuspendidas em 23µl de água ultra-pura.

Para permitir o sequenciamento simultâneo de diversas amostras, a etapa seguinte consistiu da adição de sequências específicas (índices) às extremidades dos fragmentos de DNA de cada biblioteca. Nesse processo também foi realizada uma nova amplificação das bibliotecas indexadas para potencializar a captação dos sinais obtidos pelo sequenciador. Foram determinadas combinações únicas de pares de oligonucleotídeos indexadores para cada biblioteca. Em 23µl de cada solução de *beads* contendo as bibliotecas capturadas foram adicionados 13,5µl de água ultra-pura, 10µl de 5× Herculase II Reaction Buffer, 0,5µl de 100mM dNTP Mix, 1µl de Herculase II Fusion DNA Polymerase e 1µl de cada par de *primer* indexador específico. Em seguida, as reações foram submetidas a ciclagem em um termociclador com as seguintes etapas: 2 minutos a 98ºC, seguidas de 14 ciclos a 98ºC por 30 segundos, 58ºC por 30 segundos e 72ºC por 1 minuto, seguida de uma extensão final a 72ºC por 5 minutos e, por fim,

mantidas a 4ºC. Em seguida, as soluções foram mantidas na estante magnética por 2 minutos para separar as *beads* de estreptavidina da solução contendo as bibliotecas indexadas, que foram transferidas para um novo tubo. Em seguida, o volume total de cada biblioteca indexada (cerca de 50µl) foi purificado utilizando-se 60µl de partículas magnéticas (Agencourt AMPure XP *beads*) e eluído em 25µl de água ultra-pura livre de nucleases.

As bibliotecas indexadas foram analisadas em relação às quantidades de DNA e tamanho dos fragmentos gerados no equipamento Bioanalyzer (Agilent Tecnhologies), utilizando-se o *kit* Bioanalyzer High Sensitivity (Agilent Technologies). Para obter resultados de quantificação precisos, as bibliotecas também foram quantificadas por PCR em tempo real, com o *kit* QPCR NGS Library Quantification Kit (Agilent Technologies). A seguir, as bibliotecas foram misturadas em proporções equimolares, diluídas para 4nM, e sequenciadas no equipamento MiSeq System - Illumina (San Diego, EUA) - utilizando-se o protocolo do *kit* MiSeq Reagent *Kit* v2, pela equipe do CEGH-CEL responsável pelo sequenciamento de nova geração.

### 3.5.5 Análise bioinformática

As sequências obtidas pelo sequenciador MiSeq (Illumina) foram analisadas por ferramentas bioinformáticas no servidor Linux disponível no CEGH-CEL. O protocolo da análise bioinformática realizado foi realizado inicialmente pelo aluno Humberto Vicente Cezar Marcolino, conforme rotina do CEGH-CEL, baseado no *pipeline* para análise de exomas padronizado pelo Dr. Guilherme Yamamoto (Dantas et al., 2014), e também segundo as práticas recomendadas pelo GATK (Broad Institute), com as seguintes etapas:

a) Alinhamento das leituras no genoma de referência humano hg19, utilizando o *software* Burrows-Wheeler Aligner (disponível em: http://bio-bwa.sourceforge.net/);
b) Eliminação de duplicatas de leituras, determinação de indels locais e realinhamento das leituras baseado nos indels pelo software Picard (Broad Institute – disponível em: http://broadinstitute.github.io/picard/);
c) Recalibração das qualidades das bases com o software GATK (Broad Institute – disponível em: https://software.broadinstitute.org/gatk/);
d) Chamada de variantes (SNPs e Indels) pelo algoritmo HaplotypeCaller do software GATK;

e) Filtragem das variantes pelo software GATK;

Ao final do processo de análise bioinformática descrito, foi gerado um aquivo com extensão .vcf, contendo todas as posições em que a sequência obtida divergiu do genoma de referência, para cada amostra. Para identificar as possíveis variantes causais dos quadros de perda auditiva, foi realizada a anotação das variantes utilizando-se o software Annovar (disponível em annovar.openbioinformatics.org/en/latest/), que adicionou à lista de variantes encontradas, as informações disponíveis em diversos bancos de dados públicos, incluindo anotações específicas para os genes de surdez disponíveis no banco de dados *Deafness Variation Database* (disponível em http://deafnessvariationdatabase.org/).

Para a revisão dos dados obtidos pelo sequenciamento realizada em 2018, a Dra. Marília de Oliveira Scliar repetiu a etapa de anotação das variantes em maio de 2018, de maneira a contemplar as versões atualizadas dos bancos de dados utilizados para anotação.

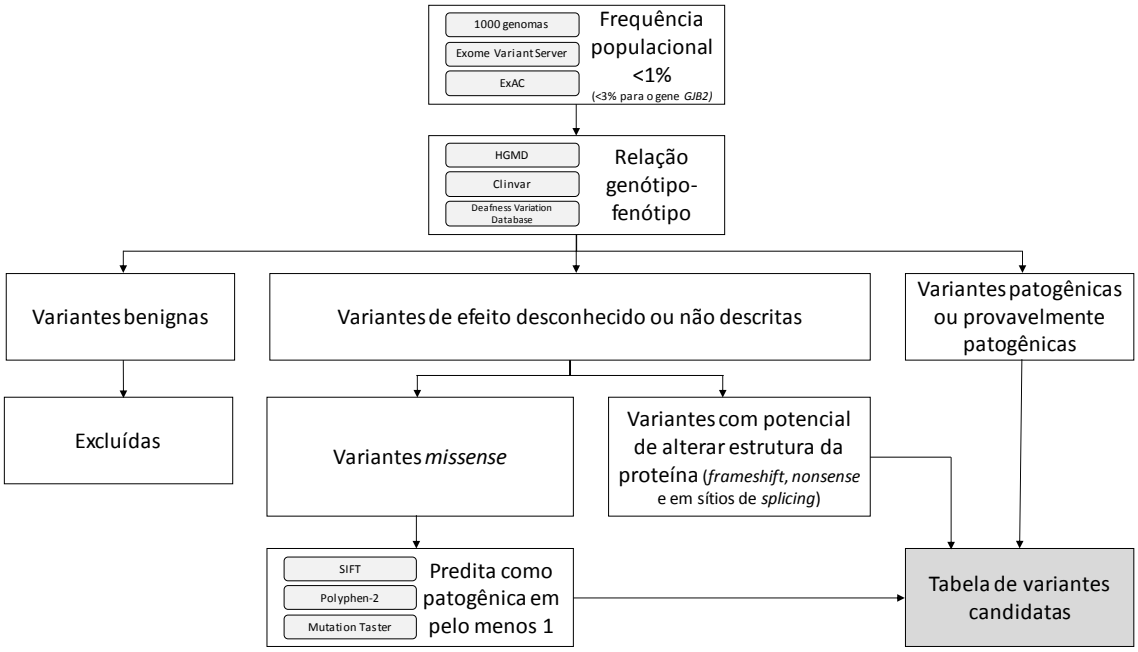
Para cada amostra, as listas de variantes anotadas foram filtradas com base nas informações sobre as variantes disponíveis nos bancos de dados listados na tabela 3 e conforme os critérios exibidos na figura 2.

Tabela 3. Bancos de dados utilizados para a filtragem das variantes

| Tipo de informação | Nome do banco de dados / ferramenta | URL |
|---|---|---|
| Populacional | 1000 Genomes Project | http://browser.1000genomes.org/ |
| | Exome Variant Server | http://evs.gs.washington.edu/EVS/ |
| | Exome Aggregation Consortium (ExAC) | http://exac.broadinstitute.org/ |
| | AbraOM | http://abraom.ib.usp.br/ |
| Relação genótipo - fenótipo | ClinVar | https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/ |
| | Deafness Variation Database | http://deafnessvariationdatabase.org/ |
| Sequência | dbSNP | https://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp |
| | RefSeqGene | https://www.ncbi.nlm.nih.gov/refseq/rsg/ |

| | | |
|---|---|---|
| | NCBI Genome | https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome |
| Preditores de patogenicidade | SIFT | http://sift.jcvi.org/index.php |
| | Polyphen-2 | http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/ |
| | Mutation taster | http://www.mutationtaster.org/ |

**Figura 2.** Critérios para filtragem das variantes




Para cada probando, a tabela de variantes obtida após o processo de filtragem foi analisada em conjunto com os dados levantados na ficha de anamnese e o provável mecanismo de transmissão genética, de maneira a se identificar dentre as variantes filtradas se havia alguma(s) com maior probabilidade de explicar a perda auditiva no probando.

### 3.5.6 Repetição da corrida de sequenciamento

Após o preparo e sequenciamento das bibliotecas, os resultados foram analisados quanto à cobertura média das bases para verificar a necessidade de repetição da corrida de sequenciamento. Foi definido que para todas as amostras que tiveram porcentagem inferior a 90% de bases cobertas pelo menos 10X seria repetida a corrida, caso não fosse encontrada variante provavelmente causal dentre a lista final de variantes filtradas.

### 3.5.7 Confirmação das variantes e análise de segregação por sequenciamento de Sanger

Após verificação das anotações, as variantes consideradas com potencial elevado para explicar os quadros foram investigadas por sequenciamento de Sanger para confirmação e validação. Quando havia material disponível de outros familiares, foi realizada também a análise de segregação das variantes por meio do sequenciamento de Sanger para verificar se a transmissão da variante era condizente com o provável mecanismo de herança genética.

Para isso, foram sintetizados oligonucleotídeos com o auxílio das ferramentas *online* Primer3 (http://primer3.ut.ee/) e ExonPrimer (https://ihg.helmholtz-muenchen.de/cgi-bin/primer/ExonPrimerUCSC.pl?db=hg19&acc=uc003vjd.3) para amplificar regiões dos exons contendo as variantes por meio de PCR. Após a PCR, fez-se a purificação dos amplicons com os reagentes Exonuclease I - Affymetrix (Santa Clara, EUA) e *Shrimp Alkaline Phosphatase* (Affymetrix). Em seguida, foi realizado o sequenciamento com o *kit* BigDye Terminator v3.1(Thermo Fisher Scientific). Por fim, os fragmentos foram submetidos à eletroforese capilar no analisador ABI3730 (Applied Biosystems) e os eletroferogramas com as sequências foram analisados no programa FinchTV - Geospiza (http://www.geospiza.com/Products/finchtv.shtml) e no programa Geneious - Biomatters (https://www.geneious.com).

### 3.5.8 Classificação final das variantes

Os critérios propostos pelo ACMG (Alford et al., 2014) foram adotados para classificação das variantes identificadas como provavelmente causais dos quadros de perda auditiva. Para isso, foram analisadas em conjunto as informações sobre as variantes obtidas na etapa de filtragem e na análise de segregação. Variantes *missense* foram classificadas como descrito por Li e Wang (2017), com o auxílio da ferramenta *online* InterVar (disponível em: http://wintervar.wglab.org), que gera automaticamente a classificação da variante de acordo com os critérios propostos pelo ACMG e permite a inclusão manual dos resultados da análise de segregação. Para os casos em que o significado clínico da variante foi encontrado no banco de dados *Deafness Variation Database*, a classificação descrita nessa fonte foi comparada com a obtida pelos critérios do ACMG e foram considerados concluídos os casos em que as variantes encontradas foram descritas como patogênicas ou provavelmente patogênicas de acordo pelo menos uma das duas opções. Excepcionalmente, foram considerados parcialmente concluídos

sete casos casos em que nenhuma variante patogênica ou provavelmente patogênica foi detectada, mas houve detecção de variantes de efeito desconhecido com frequência inferior a 1% nos bancos de dados populacionais e preditas como patogênicas pelas ferramentas de predição *in silico* consultadas.

## 4. Resultados e Discussão

Serão apresentados primeiramente os resultados obtidos de cada grupo de probandos divididos em função da hipótese diagnóstica e critérios de inclusão, acompanhados da discussão. Ao final desses tópicos, os resultados globais obtidos do painel serão apresentados e discutidos. Os heredogramas dos casos em que foi possível realizar análises de segregação com amostras de familiares encontram-se no anexo C.

### 4.1 Probandos com suspeita de síndrome de Waardenburg (SW)

Nove probandos foram selecionados por apresentarem sinais clínicos sugestivos de SW. Em quatro deles, foram detectadas as variantes provavelmente causais, descritas na tabela  a seguir.

Tabela 4. Descrição das variantes causais ou provavelmente causais encontradas no grupo dos probandos com suspeita de síndrome de Waardenburg

| | Probandos | | | |
|---|---|---|---|---|
| | **31** | **52** | **74** | **88** |
| Cobertura >10X (%) | 58,5 / 97,2 | 78,7/98,7 | 98,3 | 26 |
| Gene | *SOX10* | *PAX3* | *PAX3* | *PAX3* |
| Fenótipo(s) OMIM | *Waardenburg syndrome, type 2E / type 4C* | *Waardenburg syndrome, type 1 / type 3* | *Waardenburg syndrome, type 1 / type 3* | *Waardenburg syndrome, type 1 / type 3* |
| RefSeq | NM_006941 | NM_001127366 | NM_001127366 | NM_001127366 |
| Variante - DNA | c.44_62del | c.142G>C | c.461delG | c.149_160del |
| Variante - Proteína | p.Val15fs | p.Gly48Arg | p.Ser154fs | p.Pro50_Asn54del |
| dbSNP | - | - | - | - |
| Genótipo | Heterozigose | Heterozigose | Heterozigose | Heterozigose |
| 1000 Genomes | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Exome Variant Server | 0 | 0 | 0 | 0 |
| ExAC | 0 | 0 | 0 | 0 |
| ABraOM | 0 | 0 | 0 | 0 |
| ClinVar - classificação | ND | ND | ND | ND |
| Deafness Variation Database - classificação | ND | **Patogênica** | ND | ND |
| SIFT | NA | 0,912 - *Damaging* | NA | NA |
| Polyphen-2 | NA | 0 - *Damaging* | NA | NA |
| Mutation Taster | NA | *Disease causing* | NA | NA |
| Histórico familiar | caso isolado | caso isolado | caso isolado | Pai e irmão gêmeo afetados |
| Análise de segregação | *de novo* | Ausente na mãe - provavelmente *de novo* | *de novo* | NR |
| Critérios - ACMG | PVS1, PM2, PM6 | PM1, PM2, PP3 | PVS1, PM2, PM6 | PM1, PM2, PM4 |
| Classificação - ACMG | **Provavelmente patogênica** | **Provavelmente patogênica** | **Provavelmente patogênica** | **Provavelmente patogênica** |

Legenda: ND - não descrito / NA - não se aplica / NR - não realizada por ausência de material de familiares

Foi possível encontrar a variante causal em quatro dos nove (44,4%) casos em que se suspeitou de síndrome de Waardenburg, conforme dados apresentados na tabela 4. Nos quatro casos foram detectadas variantes em genes tipicamente associados à síndrome de Waardenburg, sendo três delas em heterozigose no gene *PAX3* em probandos com suspeita de tipo 1, o que é compatível com os dados revistos por Pingault et al. (2010), que descreveu que até 90% dos casos de WS1 apresentam mutações neste gene. A variante *missense* c.142G>C / p.Gly48Arg, detectada na amostra do probando 52, apesar de nunca ter sido descrita nos bancos de dados populacionais, é classificada como patogênica pelo banco de dados *Deafness Variant Database*, com base no estudo em que foi descrita pela primeira vez como causal da síndrome de Waardenburg tipo 1 em humanos (Pandya et al., 1996). As outras duas variantes detectadas no gene *PAX3* são pequenas deleções que nunca foram descritas nos bancos de dados consultados e, de acordo com os critérios do ACMG, são consideradas provavelmente patogênicas: a deleção c.461delG / p.Ser154fs, detectada no probando 74 é do tipo *frameshift*, ou seja, altera o quadro de leitura da proteína codificada pelo gene e não foi herdada dos genitores; a variante c.149_160del / p.Pro50_Asn54del, detectada no probando 88, promove a

deleção de 4 aminoácidos na proteína. Na ficha de anamnese do probando 88, foi referido que seu pai também é portador da síndrome de Waardenburg tipo 1, porém, não foi possível obter essa amostra para realizar o teste. É provável que ele seja portador da mesma mutação detectada no probando.

Na amostra do probando 31, foi identificada em heterozigose uma deleção de 19 pares de base (c.44_62del) que altera o quadro de leitura da tradução da proteína codificada pelo gene *SOX10.* Essa mutação nunca foi descrita nos bancos de dados consultados, não foi herdada dos genitores e, de acordo com os critérios do ACMG, é classificada como provavelmente patogênica. Mutações patogênicas em heterozigose no gene *SOX10* estão associadas aos tipos 2 e 4 da síndrome de Waardenburg, conforme revisto por Song et al. (2016). Uma vez que na avaliação clínica não foi referido que o probando apresenta doença de Hirschsprung, a hipótese de apresentar o tipo 4 da síndrome foi descartada. Ao exame clínico houve uma suspeita de que o probando apresentava *distopia canthorum*, caracterizando o tipo 1 da síndrome, devido a hiperterlorismo aparente. Neste caso, este achado clínico não teria correspondência com o achado molecular, uma vez que mutações no gene *SOX10* nunca foram associadas ao tipo 1 da síndrome. Porém, a análise das distâncias intercantais interna e externa mostrou que os resultados das medidas estão dentro dos limites normais. Neste caso, o diagnóstico molecular serviu para confirmação da avaliação clínica, permitindo confirmar que se trata de um caso de WS tipo 2.

Recentemente, os resultados obtidos nas amostras 31, 52 e 88 foram também incluídos na casuística de outro estudo do LGH (Bocángel et al., 2018), no qual foram investigados 49 probandos com diagnóstico clínico de Síndrome de Waardenburg, dos quais 19 tiveram a variante causal detectada.

Não foi possível encontrar variantes causais ou provavelmente causais em cinco dos nove casos analisados. Cobertura média acima de 10X foi obtida para mais de 90% das bases analisadas em quatro destes casos (tabela 5), portanto, não é provável que este parâmetro tenha interferido na ausência de detecção de variantes. Apenas a amostra 67 teve cobertura média acima de 10x inferior a 90%, motivo pelo qual a corrida de sequenciamento foi repetida. Porém, a cobertura obtida na segunda corrida foi ainda menor (32,9%). Ainda assim, não se pode concluir que a ausência de detecção de variante causal ou provavelmente causal nesta amostra seja decorrente da cobertura menor, uma vez que para a amostra do probando 88 foi possível identificar variante causal mesmo com uma cobertura média acima de 10X de apenas 26%.

Tabela 5. Cobertura das amostras com suspeita de síndrome Waardenburg para as quais não foram identificadas variantes causais ou provavelmente causais

| | Proporção de bases com cobertura acima de 10X (%) | |
|---|---|---|
| Código da amostra | Corrida 1 | Corrida 2 |
| 60 | 93,6 | - |
| 61 | 96,2 | - |
| 67 | 82,4 | 32,9 |
| 83 | 98,6 | - |
| 86 | 97,5 | - |

Na etapa de triagem inicial da amostra da probanda 60, foram identificadas duas variantes patogênicas no gene *GJB2*: c.35delG / p.Gly12Valfs e c.167delT p.Leu56Argfs. A análise de segregação revelou que cada uma das variantes foi herdada de um dos genitores e, portanto, estão em heterozigose composta e explicam a perda auditiva da paciente. Porém este gene não está relacionado ao fenótipo da WS, e sim, à perda auditiva não-sindrômica autossômica recessiva tipo 1A. Ainda assim, esta amostra foi incluída neste estudo sob a hipótese de Síndrome de Waardenburg , pois ao exame clínico foi identificado epicanto interno bilateral, o que causou impressão de telecanto e poderia caracterizar *distopia canthorum*. A probanda não exibia nenhuma alteração conspícua de pigmentação da pele ou cabelos, embora a coloração azul intensa dos olhos da paciente tenha chamado a atenção na avaliação. Sabe-se que a Síndrome de Waardenburg apresenta variável expressividade de manifestações clínicas (Milunsky, 1993; Song et al., 2016; Tamayo et al., 2008). No entanto, a análise dos genes causativos da WS neste probando não apresentou variantes patogênicas, tornando o genótipo no gene *GJB2* a explicação mais plausível para o quadro apresentado.

A análise dos resultados do probando 61 (dados não exibidos na tabela 4) revela o quão dinâmico é o processo de classificação de variantes. Nessa amostra foi identificada em heterozigose a variante c.2738C>T / p.Ala913Val no gene *TJP2*, associado à surdez não-sindrômica de herança autossômica dominante (Walsh, Pierce, et al., 2010), o que poderia ser compatível com o quadro, já que ao exame clínico, as características clínicas de síndrome de Waardenburg nesta paciente eram discretas (perda auditiva bilateral e mancha despigmentada na pele). Em fevereiro de 2015, quando foi feita a primeira análise dos resultados, esta variante era descrita como provavelmente patogênica de acordo com o banco de dados *Deafness Variant Database*, porém, na revisão dos resultados realizada

em agosto de 2018, foi verificado que, atualmente, esse banco de dados descreve esta variante como de efeito desconhecido, tal qual a classificação da variante obtida ao se aplicarem os critérios da ACMG. Além disso, esta variante também foi identificada na amostra do pai da paciente, que é ouvinte, portanto, neste caso, a perda auditiva provavelmente não tem relação com a variante encontrada nesta amostra.

A amostra do probando 83 foi incluída neste estudo sob a hipótese causativa de síndrome de Waardenburg tipo 4, uma vez que na consulta inicial de avaliação genética foram detectadas alterações pigmentares discretas e foi referida a suspeita de doença de Hirschsprung, condição para a qual foram solicitados exames comprobatórios. Tais exames não foram realizados. Uma vez que não se detectou a variante causativa do quadro neste probando, é possível que a perda auditiva presente neste probando esteja associada a outra síndrome cujos genes causais não foram incluídos neste estudo. Em janeiro de 2018 foi realizado nesta amostra o exame de CGH-*array* 60k, com resolução de 500Mb, que também não identificou variações de números de cópias clinicamente relevantes.

Embora a casuística de probandos com suspeita de SW neste estudo tenha sido pequena, a taxa de ausência de detecção de 55,55% (5 de 9 amostras) está de acordo os dados revistos por Pingault et al.(2010), em que foi descrito que cerca de 50% dos casos permanecem sem diagnóstico, e também com o outro estudo do LGH que analisou 49 probandos portadores de SW, em que não foi possível identificar a variante causal em 61,2% dos casos (19/49) (Bocángel et al., 2018). Estas taxas de não detecção podem indicar a presença de variantes em regiões não-codificantes e a possibilidade de que outros genes ainda não descritos sejam responsáveis pelos quadros de SW quando mutados, o que foi visto ser possível após a primeira descrição de uma mutação patogênica no gene *KITLG*, em um caso de síndrome de Waardenburg tipo 2 (Zazo Seco et al., 2015).

É importante considerar que a metodologia aplicada nesse estudo não permite a detecção de grandes deleções e inserções nos genes analisados e que este mecanismo já foi descrito como responsável por 6% dos casos em um estudo que analisou 48 pacientes com SW tipos 1 e 3 (Milunsky, Maher, Ito, & Milunsky, 2007) e por 12,2% dos casos no outro estudo recente realizado pelo LGH (Bocángel et al., 2018). Nesse estudo, a amostra do probando 86 também foi submetida à análise de MLPA (*Multiplex Ligation Probe-dependent Amplification*) por meio do kit SALSA P186-B1, que tem sondas que cobrem os genes *MITF*, *PAX3* e *SOX10*, porém, não foram detectadas variantes de números de cópias (CNVs) que explicassem a perda auditiva neste caso. A análise por MLPA pode

contribuir para a identificação de variantes nos casos em que não houve identificação da variante causal após as análises de NGS.

As amostras dos probandos para os quais não se detectaram variantes causais estão em avaliação para inclusão em um novo projeto do LGH, no qual é prevista a realização de *array*-CGH de alta resolução e sequenciamento completo do exoma para identificação das variantes causais.

### 4.2 Probandos com suspeita de síndrome de Usher (SU)

Foi possível encontrar as variantes causais em oito dos treze (61,5%) casos em que se suspeitou de síndrome de Usher, conforme dados apresentados na tabela 6. Em três destes casos a variante causal foi encontrada em homozigose e nos outros cinco casos, foram detectadas duas variantes, provavelmente em heterozigose composta.

As variantes c.433C>T / p.Gln145Ter no gene *USH1G* e c.9345_9346del / p.Pro3116Hisfs no gene *USH2A*, detectadas em homozigose, respectivamente, nos probandos 46 e 64, são classificadas como patogênicas enquanto a variante c.1880delT / p.Leu627fs no gene *CDH23*, detectada em homozigose no probando 68, é classificada como provavelmente patogênica. A frequência dessas variantes é muito baixa ou nem descrita nos bancos de dados populacionais, nos três casos foi verificado que, como esperado, o probando é filho de pais consanguíneos, primos em primeiro grau. Esses três achados ressaltam a importância da consanguinidade como fator de risco nessas famílias estudadas, com importantes implicações no aconselhamento genético dos indivíduos.

Tabela 6. Descrição das variantes causais ou provavelmente causais encontradas no grupo dos probandos com suspeita de síndrome de Usher

| | Probandos | | | | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | **46** | **51** | | **64** | **68** | **78** | | **82** | | **89** | | **90** | |
| Cobertura >10X (%) | 42,6 | 97,1 | | 70,2 | 80,3 | 97,9 | | 98,6 | | 87,3 | | 93,9 | |
| Gene | *USH1G* | *CDH23* | | *USH2A* | *CDH23* | *USH2A* | | *USH2A* | | *USH2A* | | *CDH23* | |
| Fenótipo OMIM | Síndrome de Usher tipo 1 G | Síndrome de Usher tipo 1D | | Síndrome de Usher tipo 2A | Síndrome de Usher tipo 1D | Síndrome de Usher tipo 2A | | Síndrome de Usher tipo 2A | | Síndrome de Usher tipo 2A | | Síndrome de Usher tipo 1D | |
| RefSeq | NM_001282489 | NM_022124 | | NM_206933 | NM_001171933 | NM_206933 | | NM_206933 | | NM_206933 | | NM_022124 | |
| DNA | c.433C>T | c.3579+2T>C | c.6065-9G>A | c.9345_9346del | c.1880delT | c.13217T>C | c.12100G>T | c.4714C>T | c.2299delG | c.2073C>A | c.851A>G | c.6049G>A | c.7900C>T |
| Proteína | p.Gln145Ter | ? | ? | p.Pro3116Hisfs | p.Leu627fs | p.Leu4406Pro | p.Glu4034Ter | p.Leu1572Phe | p.Glu767Serfs | p.Cys691Ter | p.Glu284Gly | p.Gly2017Ser | p.Glu2634Ter |
| dbSNP | rs773231689 | rs1385831846 | rs367928692 | rs536593247 | ND | rs745693690 | ND | rs111033333 | rs80338903 | ND | rs762869685 | rs183431253 | ND |
| Genótipo | Homozigose | Heterozigose | Heterozigose | Homozigose | Homozigose | Heterozigose | Heterozigose | Heterozigose | Heterozigose | Heterozigose | Heterozigose | Heterozigose | Heterozigose |
| 1000 Genomes | 0 | 0 | 0 | 0,000998403 | 0 | 0 | 0 | 0,000399361 | 0 | 0 | 0 | 0,000199681 | 0 |
| Exome Variant Server | 0 | 0 | 0,00008 | 0,003 | 0 | 0 | 0 | 0,0011 | 0,001 | 0 | 0 | 0,0008 | 0 |
| ExAC | 0,00004255 | 0 | 0,0001 | 0,00006589 | 0 | 0,00002 | 0 | 0,0008 | 0,0008 | 0 | 0,000008786 | 0,00005358 | 0 |
| ABraOM | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| ClinVar - classificação | ND | ND | Patogênica | Provavelmente patogênica | ND | ND | ND | Conflitante: benigna / provavelmente benigna / provavelmente patogênica | Patogênica | ND | ND | Provavelmente patogênica | ND |
| Deafness Variation Database - classificação | Efeito desconhecido | ND | **Patogênica** | **Patogênica** | ND | **Provavelmente patogênica** | ND | Efeito desconhecido | **Patogênica** | **Patogênica** | Efeito desconhecido | **Patogênica** | ND |
| SIFT | NA | NA | NA | NA | NA | 0,175 - *Tolerated* | NA | 0,175 - *Tolerated* | NA | NA | 0,008 - *Damaging* | - | NA |
| Polyphen-2 | NA | NA | NA | NA | NA | 0,927 - *Possibly Damaging* | NA | 0,927 - *Possibly Damaging* | NA | NA | 0,997 - *Damaging* | 1,0 - *Damaging* | NA |
| Mutation Taster | *Disease causing* | *Disease causing* | NA | NA | NA | *Polymporphism* | *Disease causing* | *Polymporphism* | *Disease causing* | *Disease causing* | *Disease causing* | *Disease causing* | *Disease causing* |
| Histórico familiar | Pais consanguíneos, 1 irmão provavelmente afetado | Pais consanguíneos, caso isolado | | Pais consanguíneos, 1 irmão afetado | Pais consanguíneos, caso isolado | 3 irmãos afetados | | caso isolado | | caso isolado | | caso isolado | |
| Análise de segregação | NR | NR | NR | Herdada da mãe, presente em homozigose no irmão afetado | Em heterozigose nos pais | NR | NR | NR | NR | NR | NR | NR | NR |
| Critérios - ACMG | PVS1, PM2, PP3 | PVS1, PM2, PP3 | PVS1, PM2, PP3 | PVS1, PM2, PP3 | PVS1, PM2 | PM1, PM2 | PVS1, PM2, PM3 | PM1, PM2, PP3, | PVS1,PM2 | PVS1, PM2, PM3, | PM1, PM2, PP3, | PM1, PM2, PM3, PP5 | PVS1, PM2, PP3 |
| Classificação - ACMG | **Patogênica** | **Patogênica** | **Patogênica** | **Patogênica** | **Provavelmente patogênica** | **Efeito desconhecido *** | **Patogênica** | **Efeito desconhecido *** | **Patogênica** | **Patogênica** | **Efeito desconhecido *** | **Provavelmente patogênica** | **Patogênica** |

Legenda: ND - não descrito / NA - não se aplica / NR - não realizada por ausência de familiares

*Se as duas variantes encontradas estiverem em alelos diferentes (em *trans*), a variante de efeito desconhecido passa a ser classificada como provavelmente patogênica

Foram detectadas variantes no gene *USH2A* em quatro dos oito casos para os quais foi possível detectar variantes provavelmente causais. Variantes patogênicas nesse gene estão associadas ao tipo 2 da síndrome de Usher, o mais frequente, responsável por cerca de metade dos casos de SU reportados (Rosenberg, Haim, Hauch, & Parving, 1997). Nas amostras dos probandos 78, 82 e 89, foram detectadas duas variantes em heterozigose, porém, não foi possível realizar análise de segregação em nenhum dos três casos, devido à ausência de material dos genitores, o que impactou na classificação das variantes. Em cada um destes probandos foi identificada uma variante *missense* de efeito desconhecido em combinação com outra variante que causa perda de função (duas variantes *nonsense* e uma *frameshift*). Essas três variantes são consideradas patogênicas de acordo com os critérios do ACMG, sendo duas delas também consideradas patogênicas, e uma delas considerada provavelmente patogênica de acordo com o banco de dados *Deafness Variant Database*. A maioria das variantes patogênicas identificadas no gene *USH2A* são do tipo *nonsense* ou *frameshift*, sendo a variante c.2299delG / p.Glu767Serfs, encontrada no probando 82, a mais comum delas (Aller et al., 2004). Se houvesse sido obtida a confirmação de que as variantes detectadas nestes três probandos se encontram em alelos diferentes (em *trans*), as três variantes *missense* de efeito desconhecido teriam sua classificação alterada para provavelmente patogênicas. Como não foram encontradas outras variantes que pudessem explicar a condição sindrômica nestes probandos, estes três casos foram considerados parcialmente concluídos, com a ressalva de que seria importante confirmar a origem das alterações detectadas. É importante também notar que a variante c.4714C>T / p.Leu1572Phe, detectada na amostra do probando 82, tem classificações conflitantes no banco de dados Clinvar, que variam desde benigna até provavelmente patogênica. Portanto, recomenda-se cautela para classificar a variante como causal do quadro mesmo após análise de segregação.

As variantes detectadas no gene *CDH23* nas amostras dos probandos 51 e 90 estão de acordo com a descrição de que os casos de SU decorrentes de variantes nesse gene ocorrem por mutações de perda de função, ou pela combinação de mutações de perda de função com mutações do tipo *missense*, enquanto os casos não-sindrômicos ocorrem tipicamente por mutações do tipo *missense* (Astuto et al., 2002). No caso do probando 51 foram detectadas duas variantes que alteram os sítios de *splicing* e no probando 90 foi detectada uma nova variante sem sentido (*nonsense)* associada a uma variante *missense* já descrita como patogênica e associada ao tipo 1D da síndrome de Usher. Nos dois casos não foi possível realizar a análise de segregação para confirmar se as variantes estão em

alelos diferentes, porém, como o fenótipo descrito para esse gene é compatível ao verificado nos pacientes, provavelmente a condição sindrômica nesses pacientes decorre das variantes que foram detectadas no nosso estudo.

Não foi possível encontrar variantes provavelmente causais em cinco dos 13 casos analisados (38,5%), mesmo tendo sido obtida porcentagem de bases com cobertura acima de 10x acima de 90% nos cinco casos (Tabela 7). Em um estudo que pesquisou 10 genes associados à síndrome de Usher em 32 pacientes sem causa genética definida, Aparisi et al., (2014) identificaram variantes patogênicas em 22 dos casos utilizando uma estratégia de NGS que, além de detectar alterações na sequência (substituições e pequenas inserções e deleções), também permitiu a detecção de variação do número de cópias (CNVs) nos genes analisados. Dos 22 casos reportados com detecção de variantes nesse estudo citado, 4 apresentaram CNVs patogênicas, portanto, a taxa de detecção considerando-se apenas as amostras para as quais não foram detectadas CNVS foi de 56,3%, similar aos 61,5% encontrados em nossa casuística. Vale ressaltar, portanto, que para os casos em que não foram detectadas variantes explicativas dos quadros, recomenda-se a análise de CNVs dos genes relacionados à SU.

Tabela 7. Cobertura das amostras com suspeita de síndrome de Usher para as quais não foram identificadas variantes causais ou provavelmente causais

| | Proporção de bases com cobertura acima de 10X (%) |
|---|---|
| Código da amostra | Corrida 1 |
| 2 | 98,3 |
| 5 | 97,3 |
| 15 | 93,2 |
| 54 | 97,2 |
| 81 | 98,1 |

Na amostra do probando 54 foi encontrada a variante patogênica c.1214delA / p.Asn405fs em heterozigose no gene *USH2A* (dados não exibidos na tabela 6), sem identificação de uma segunda variante causal nas regiões codificantes desse gene. Em outros estudos moleculares de pacientes com síndrome de Usher, é reportado que uma parcela dos pacientes apresenta apenas uma variante patogênica em um dos genes causais, sobretudo no gene *USH2A* (Aparisi et al., 2014; Besnard et al., 2014). A amostra do probando 54 foi incluída em outro estudo do LGH, no qual estão em análise os resultados de sequenciamento completo do exoma de outros dois indivíduos da família (um afetado

pela SU e outro afetado apenas por perda auditiva) e também regiões promotoras e outras regiões não codificantes do gene *USH2A*, à procura de outras variantes que possam explicar a segregação da SU nessa família.

Não se pode descartar a presença de variantes em outras regiões não estudadas por este teste, uma vez que variantes intrônicas no gene *USH2A*, por exemplo, já foram associadas a casos raros de síndrome de Usher (Vaché et al., 2012). Também não se pode descartar que outros genes ainda não identificados possam estar associados à SU, o que poderia ser verificado com a aplicação do sequenciamento completo do exoma ou do genoma.

### 4.3 Probandos com suspeita de surdez não-sindrômica autossômica dominante

Foi possível encontrar variantes provavelmente patogênicas ou patogênicas em quatro dos doze (33,3%) dos casos em que se suspeitou de surdez não-sindrômica autossômica dominante, conforme dados apresentados na tabela 8. Em três casos, também apresentados na tabela 8, foram detectadas variantes classificadas como de efeito desconhecido nunca descritas nos bancos de dados populacionais e preditas como patogênicas nas ferramentas de predição *in silico* consultadas. Caso se confirme a patogenicidade das variantes nesses três casos, a taxa de detecção para esse grupo de probandos passa a ser de 58,3%. Em seis desses sete casos (85,7%), a variante encontrada foi do tipo *missense*, o que está de acordo com os dados reportados por Sloan-Heggen et al., (2016). Nesse estudo de 1119 probandos com perda auditiva dos quais 141 tinham histórico familiar com o mecanismo autossômico dominante de transmissão, foi descrita, para este grupo específico, taxa de detecção de 50% com predomínio de variantes do tipo *missense*, vistas em 85% dos casos em que variantes causais foram detectadas.

Todas as sete variantes consideradas provavelmente causais apresentadas na tabela 8 nunca foram descritas em nenhum dos bancos de dados populacionais consultados. Apenas as variantes detectadas nos probandos 50 e 71 têm descrição da relação fenótipo-genótipo nos bancos de dados Clinvar e *Deafness Variation Database*, nos quais são apontadas como patogênicas, embora, aplicando-se os critérios do ACMG, a classificação obtida é a de que são provavelmente patogênicas.

Tabela 8. Descrição das variantes causais ou provavelmente causais encontradas no grupo dos probandos com suspeita de surdez não-sindrômica autossômica dominante

| | Probandos | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | **23** | **25** | **34** | **37** | **41** | **50** | **71** |
| Cobertura >10X (%) | 95,9 | 97,5 | 95,9 | 96,0 | 79,4 | 72,9 / 97,9 | 73,6 |
| Gene | *KCNQ4* | *MYO7A* | *MYO3A* | *TMC1* | *EYA4* | *GSDME* (*DFNA5*) | *TMC1* |
| Fenótipo OMIM | Surdez autossômica dominante 2A | Surdez autossômica dominante 11 | Surdez autossômica recessiva 30 | Surdez autossômica dominante 36 | Surdez autossômica dominante 10 | Surdez autossômica dominante 5 | Surdez autossômica dominante 8/12 |
| RefSeq | NM_004700 | NM_00260 | NM_017433 | NM_138691 | NM_004100 | NM_004403 | NM_138691 |
| DNA | c.845C>A | c.1970G>T | c.2090T>G | c.1754G>A | c.1822G>C | c.991-15_991-13delTTC | c.1714G>C |
| Proteína | p.Tyr282Lys | p.Arg657Leu | p.Leu697Trp | p.Gly585Asp | p.Glu608Gln | ? | p.Asp572His |
| dbSNP | ND | ND | ND | ND | ND | rs727505273 | rs121908072 |
| Genótipo | Heterozigose | Heterozigose | Heterozigose | Heterozigose | Heterozigose | Heterozigose | Heterozigose |
| 1000 Genomes | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Exome Variant Server | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| ExAC | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| ABraOM | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| ClinVar - classificação | ND | ND | ND | ND | ND | Patogênica | Patogênica |
| Deafness Variation Database - classificação | ND | ND | ND | ND | Efeito desconhecido | **Patogênica** | **Patogênica** |
| SIFT | 0,001-*Damaging* | 0,001-*Damaging* | 0-*Damaging* | 0,001-*Damaging* | 0,01-*Damaging* | NA | 0,022-*Damaging* |
| Polyphen-2 | 0,997-*Damaging* | 0,899-*Damaging* | 1,0-*Damaging* | 0,999-*Damaging* | 1,0-*Damaging* | NA | 1,0-*Damaging* |
| Mutation Taster | *Disease causing* | *Disease causing* | *Disease causing* | *Disease causing* | *Disease causing* | NA | *Disease causing* |
| Histórico familiar | Pai, irmão, tia, paterna, tio paterno e 4 primos afetados | Pai afetado | Pai, irmãos e sobrinho afetados | 2 irmãos e sobrinha afetados | Pai e irmão afetados | Pai, avó paterna, 2 tios paternos e 8 primos afetados | Mãe, irmão, 2 tios e 3 primos afetados |
| Análise de segregação | NR | NR | Herdada do pai afetado, presente nos outros afetados | Presente nos irmãos e sobrinha afetados | NR | NR | Herdada da mãe afetada e presente no irmão afetado |
| Critérios - ACMG | PM1, PM2, PP3 | PM1, PM2, PM5, PP3 | PS3, PM1, PM2, PP1, PP3 | PM2, PP1, PP3 | PM1, PM2, PP3 | PVS1, PM2 | PM2, PM5, PP1, PP3, PP5 |
| Classificação - ACMG | Efeito desconhecido | **Provavelmente patogênica** | **Patogênica**[1] | Efeito desconhecido | Efeito desconhecido | **Provavelmente patogênica** | **Provavelmente patogênica** |

Legenda: ND - não descrito / NA - não se aplica / NR - não realizada por ausência de material de familiares

[1]Classificação com base nos dados obtidos por este e outros estudos do LGH - checar discussão do caso

O probando 34 apresentou a variante c.2090T>G / p.Leu697Trp em heterozigose no gene *MYO3A*, que é associado à surdez autossômica recessiva e raramente descrito como alterado em famílias com perda auditiva de herança autossômica dominante. A variante encontrada no probando havia sido previamente identificada em duas famílias brasileiras com perda auditiva com segregação compatível ao modelo autossômico dominante e o fato de que mutação dominante no gene *MYO3A* havia sido descrita somente uma vez anteriormente (Grati et al., 2016) motivou um estudo colaborativo entre a equipe do LGH e equipes de pesquisadores nos Estados Unidos (NIHCD - Instituto Nacional de Saúde voltado para distúrbios da comunicação e da Universidade Estadual da Pensilvânia). Nesse estudo colaborativo, os pesquisadores dos Estados Unidos demonstraram em testes funcionais que a proteína MYO3A com a alteração p.Leu697Trp apresenta redução na sua atividade ATPase e aumenta sua afinidade por actina, e que a combinação da proteína alterada com a proteína selvagem interfere nos processos dos quais ela participa, essenciais para a mecanotransdução dos sinais sonoros. Portanto, a alteração justifica os problemas de audição apresentados pelos pacientes das famílias em que ela está presente e o modelo autossômico dominante de transmissão, nesse caso, é

explicado por conta do efeito dominante negativo demonstrado nos estudos funcionais (Dantas et al., 2018). Essa informação do efeito da variante na proteína e a análise de segregação nas famílias estudadas pelo LGH permitiram a classificação dessa variante como definitivamente patogênica, associada à surdez de herança autossômica dominante, ampliando o espectro de efeitos fenotípicos de alterações no gene *MYO3A*, quando alterado. Uma vez que essa variante foi detectada em três famílias brasileiras, um novo estudo do LGH tem como objetivo triar a presença dessa mutação em outras famílias que apresentam perda auditiva autossômica dominante sem causa definida. Até o momento, a variante já foi encontrada em outras duas famílias, totalizando cinco casos, e nesse estudo do LGH foi incluída também a análise dos haplótipos, determinados por meio da genotipagem dos pacientes em *arrays* de SNPs, para identificar a origem do evento mutacional (Bueno et al., 2018)

A interpretação do significado clínico de variantes do tipo *missense* é desafiadora, sobretudo no caso da perda auditiva autossômica dominante, que costuma apresentar expressividade variável, inclusive entre indivíduos da mesma família, além de penetrância incompleta e manifestação tardia em alguns casos. Esses casos requerem uma análise criteriosa dos dados, para que as correlações entre os achados moleculares e fenotípicos sejam adequadas, conforme revisto por (Vona, Nanda, Hofrichter, Shehata-Dieler, & Haaf (2015) . As variantes detectadas nos probandos 23, 37 e 41 foram classificadas como de efeito desconhecido de acordo com os critérios propostos pelo ACMG. No entanto, esses 3 casos foram considerados parcialmente concluídos, uma vez que não foi detectada nenhuma outra variante com potencial de explicar a perda auditiva nos três casos e cada uma dessas variantes detectadas é extremamente rara, sem descrição nos bancos de dados populacionais, e as três são preditas como patogênicas de acordo com as ferramentas de predição *in silico* consultadas. No caso do probando 37, a variante c.1754G>A / p.Gly585Asp no gene *TMC1* foi detectada em heterozigose no probando e em outros dois indivíduos afetados de sua família, e não foi detectada em um indivíduo ouvinte testado. Nesses três casos, o laudo redigido com a descrição da variante detectada foi incluída a observação de que não é possível afirmar que as variantes são patogênicas e causais da perda auditiva, e foi sugerida a ampliação da investigação em outros indivíduos das famílias.

A variante c.991-15_991-13del no gene *GSDME* (lócus DFNA5), detectada no probando 50, é a única que não é do tipo *missense* dentre as variantes causais detectadas. Essa variante já foi descrita como patogênica pois acarreta na perda do exon 8, gerando

uma proteína truncada não funcional, e já foi detectada como patogênica e associada à perda auditiva apenas em famílias de origem do leste asiático (Booth et al., 2018; Park et al., 2010; Yu et al., 2003). Na ficha de anamnese do probando 50 não há registro de que sua família seja de origem asiática. Portanto, seria interessante realizar uma investigação para identificar a origem do evento mutacional que levou à presença dessa variante na família estudada.

Tabela 9. Cobertura das amostras com suspeita de surdez não-sindrômica autossômica dominante para as quais não foram identificadas variantes causais ou provavelmente causais

| | Proporção de bases com cobertura acima de 10X (%) |
|---|---|
| Código da amostra | Corrida 1 |
| 13 | 88,8 |
| 30 | 95,7 |
| 43 | 97,6 |
| 76 | 96,7 |
| 80 | 96,6 |

Não foi possível detectar a variante causal em cinco dos doze casos (41,7), mesmo tendo sido obtida porcentagem de bases com cobertura acima de 10x acima de 95% em quatro desses casos (Tabela 9). A amostra 13 apresentou 88,8% de bases com cobertura acima de 10x, preenchendo os critérios adotados para repetição da corrida de sequenciamento, porém, não foi possível realizar a repetição da corrida.

### 4.4 Probandos com suspeita de surdez não-sindrômica autossômica recessiva

Foi possível encontrar a variante causal ou provavelmente causal em 12 dos 37 (32,4%) casos em que se suspeitou de surdez não-sindrômica autossômica recessiva, conforme dados apresentados na tabela 10. Em um caso, também exibido na tabela 10, foi encontrada uma variante de efeito desconhecido considerada com potencial elevado de explicar a perda auditiva do probando. No estudo realizado por Sloan-Heggen et al., (2016), em que foram utilizados paineis com 66 e 89 genes que causam surdez, a taxa de detecção de variantes no grupo dos 226 probandos com surdez autossômica recessiva foi de 41%. Em um estudo de 160 famílias com suspeita de surdez não-sindrômica recessiva

utilizando sequenciamento completo do exoma, Bademci et al., (2016) encontraram variantes causais em 90 famílias (56%).

A variante causal foi encontrada em homozigose em oito probandos, dos quais cinco são filhos de casais consanguíneos. Foram detectadas duas variantes em heterozigose em quatro casos, dos quais foi possível confirmar a heterozigose composta em dois probandos, por meio da análise de segregação.

Variantes patogênicas no gene *GJB2*, das quais a mutação c.35delG / p.Gly12Valfs é a mais comum, são a causa predominante de perda auditiva congênita não sindrômica recessiva em diversas populações (Kenneson, Van Naarden Braun, & Boyle, 2002). Nas amostras dos probandos 7, 28, 36 e 39, foram detectadas variantes no gene *GJB2*, consideradas patogênicas pelo banco de dados *Deafness Variation Database*, que explicam a perda auditiva nos quatro casos. Para essas quatro amostras, o sequenciamento de toda a região codificante do gene *GJB2* havia sido realizado previamente como parte da triagem de mutações mais frequentes que causam perda auditiva, porém, houve falha na identificação das variantes na análise do sequenciamento dos probandos 7, 28, 36 e 39.

Tabela 10. Descrição das variantes causais ou provavelmente causais encontradas no grupo dos probandos com suspeita de surdez não-sindrômica autossômica recessiva

| | Probandos | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | **3** | **7** | | **8** | **28** | **33** | **36** | **39** | **42** | |
| Cobertura >10X (%) | 97,8 | 98,1 | | 97,7 | 95,9 | 97,4 | 97,2 | 39,1/95,2 | 97,8 | |
| Gene | *CLDN14* | *GJB2* | | *MYO7A* | *GJB2* | *SIX1* | *GJB2* | *GJB2* | *OTOF* | |
| Fenótipo OMIM | Surdez autossômica 29 | Surdez autossômica recessiva 1A | | Surdez autossômica recessiva 2 | Surdez autossômica recessiva 1A | Branchiootic syndrome 3 | Surdez autossômica recessiva 1A | Surdez autossômica recessiva 1A | Surdez autossômica recessiva 9 | |
| RefSeq | NM_144492 | NM_004004 | | NM_000260 | NM_004004 | NM_005982 | NM_004004 | NM_004004 | NM_194248 | |
| DNA | c.291C>A | c.101T>C | c.550C>T | c.4489G>C | c.109G>A | c.386A>G | c.101T>C | c.101T>C | c.2891C>A | c.4747C>T |
| Proteína | p.Cys97Ter | p.Met34Thr | p.Arg184Trp | p.Gly1497Arg | p.Val37Ile | p.Tyr129Cys | p.Met34Thr | p.Met34Thr | p.Ala964Glu | p.Arg1583Cys |
| dbSNP | rs767108790 | rs35887622 | rs998045226 | ND | rs72474224 | rs104894478 | rs35887622 | rs35887622 | rs201329629 | rs781688103 |
| Genótipo | Homozigose | Heterozigose | Heterozigose | Homozigose | Homozigose | Heterozigose | Homozigose | Homozigose | Heterozigose | Heterozigose |
| 1000 Genomes | 0 | 0,00599042 | 0 | 0 | 0,0153754 | 0 | 0,00599042 | 0,00599042 | 0 | 0 |
| Exome Variant Server | 0 | 0,0102 | 0 | 0 | 0,0013 | 0 | 0,0102 | 0,0102 | 0 | 0 |
| ExAC | 0,00001678 | 0,0085 | 0 | 0 | 0,0066 | 0 | 0,0085 | 0,0085 | 0 | 0,00002471 |
| ABraOM | 0 | 0,00289 | 0 | 0 | 0,003284 | 0 | 0,00289 | 0,00289 | 0 | 0 |
| ClinVar - classificação | ND | Conflitante - todas as classificações | ND | ND | Conflitante - efeito desconhecido, provavelmente patogênica e patogênica | Patogênica | Conflitante - todas as classificações | Conflitante - todas as classificações | Patogênica | Patogênica |
| Deafness Variation Database - classificação | Efeito desconhecido | **Patogênica** | **Patogênica** | ND | **Patogênica** | **Patogênica** | **Patogênica** | **Patogênica** | **Patogênica** | Efeito desconhecido |
| SIFT | NA | 0-*Damaging* | 0,027-*Damaging* | 0,001-*Damaging* | 0,717-*Tolerated* | 0,001-*Damaging* | 0-*Damaging* | 0-*Damaging* | 0,001-*Damaging* | 0-*Damaging* |
| Polyphen-2 | NA | 0,038-*Benign* | 1,0-*Damaging* | 1,0-*Damaging* | 1,0-*Damaging* | 1,0-*Damaging* | 0,038-*Benign* | 0,038-*Benign* | 0,999-*Damaging* | 1,0-*Damaging* |
| Mutation Taster | *Disease causing* | *Disease causing* | *Disease causing* | *Disease causing* | *Disease causing* | *Disease causing* | *Disease causing* | *Disease causing* | *Disease causing* | *Disease causing* |
| Histórico familiar | Pais consanguíneos, irmão afetado | 3 irmãos e 1 irmã afetada | | Irmã afetada | Pais consanguíneos | Pais consanguíneos | Irmã afetada | Pais consanguíneos | Irmã afetada | |
| Análise de segregação | Presente em heterozigose nos pais e em homozigose no irmão | NR | | Presente em heterozigose nos pais e em homozigose na irmã | Herdada - presente em heterozigose nos pais | NR | NR | Herdada - presente em heterozigose nos pais | NR | |
| Critérios - ACMG | PVS1, PM2, PP1 | PS3, PM1, PP3, PP5, BS1, BS2, BP6 | PM1, PM2, PM5, PP3 | PM1, PM2, PP1, PP3 | PS3, PM1, PP3, PP5 | PS3, PM1, PP3, PP5 | PS3, PM1, PP3, PP5, BS1, BS2, BP6 | PS3, PM1, PP3, PP5, BS1, BS2, BP6 | PM1, PM2, PP3, PP5 | PM1, PM2, PP3, PP5 |
| Classificação - ACMG | **Patogênica** | **Efeito desconhecido** | **Provavelmente patogênica** | **Provavelmente patogênica** | **Provavelmente patogênica** | **Patogênica** | Efeito desconhecido | Efeito desconhecido | **Provavelmente patogênica** | **Provavelmente patogênica** |

Legenda: ND - não descrito / NA - não se aplica / NR - não realizada por ausência de material de familiares

continua

continuação

| | Probandos | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | **57** | **65** | **72** | | **75** | | **84** |
| Cobertura >10X (%) | 64,9 | 97,3 | 97,7 | | 97,7 | | 98,6 |
| Gene | *LHFPL5* | *PTPRQ* | *CDH23* | | *TMC1* | | *CEACAM16* |
| Fenótipo OMIM | Surdez autossômica recessiva 67 | Surdez autossômica recessiva 84A | Surdez autossômica recessiva 12 | | Surdez autossômica recessiva 7 | | Surdez autossômica dominante 4B |
| RefSeq | NM_182548 | NM_001145026 | NM_001171933 | | NM_138691 | | NM_001039213 |
| DNA | c.526C>T | c.473_474insTA | c.1183G>T | c.3820G>A | c.236+1G>A | c.1094G>A | c.436C>T |
| Proteína | p.Arg176Cys | p.Tyr158fs | p.Val395Phe | p.Glu1274Lys | ? | p.Arg365Lys | p.Arg146Ter |
| dbSNP | rs768655651 | ND | rs763721044 | rs775540526 | rs775428246 | ND | ND |
| Genótipo | Homozigose | Homozigose | Heterozigose | Heterozigose | Heterozigose | Heterozigose | Homozigose |
| 1000 Genomes | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Exome Variant Server | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| ExAC | 0,00001649 | 0 | 0,00003538 | 0,0000083 | 0,00001283 | 0 | 0 |
| ABraOM | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| ClinVar - classificação | ND | ND | Patogênica | ND | Patogênica / provavelmente patogênica | ND | ND |
| Deafness Variation Database - classificação | Efeito desconhecido | ND | ND | Efeito desconhecido | **Patogênica** | ND | ND |
| SIFT | 0,001-*Damaging* | NA | 0,001-*Damaging* | NA | NA | 0,003-*Damaging* | NA |
| Polyphen-2 | 1,0-*Damaging* | NA | 1,0-*Damaging* | 1,0-*Damaging* | NA | 0,995-*Damaging* | NA |
| Mutation Taster | *Disease causing* | *Disease causing* | *Disease causing* | *Disease causing* | *Disease causing* | *Disease causing* | *Disease causing* |
| Histórico familiar | Irmã afetada | Pais consanguíneos, 2 irmãs afetadas | Irmã afetada | | Irmã afetada | | Pais consanguíneos, 2 irmãos afetados |
| Análise de segregação | Presente em heterozigose nos pais e em homozigose na irmã | NR | Pais heterozigotos para cada uma das variantes, que estão em heterozigose composta no probando e na irmã. | | Pais heterozigotos para cada uma das variantes, que estão em heterozigose composta no probando e na irmã. | | Presente em heterozigose nos pais e homozigose nos 3 irmãos afetados |
| Critérios - ACMG | PM2, PP1, PP3 | PVS1, PM2 | PM1, PM2, PP1, PP5 | PM1, PM2, PP1, PP3 | PVS1, PM2 | PM2, PM3, PP1, PP3 | PVS1, PM2, PP1 |
| Classificação - ACMG | Efeito desconhecido | **Provavelmente patogênica** | **Provavelmente patogênica** | **Provavelmente patogênica** | **Provavelmente patogênica** | **Provavelmente patogênica** | **Patogênica** |

Legenda: ND - não descrito / NA - não se aplica / NR - não realizada por ausência de material de familiares

A variante c.101T>C / p.Met34Thr no gene *GJB2*, identificada em heterozigose composta no probando 7, e em homozigose nos probandos 36 e 39, tem um histórico controverso de interpretação de seu significado clínico que permanece até hoje, evidenciado, por exemplo, pelos resultados apresentados no banco de dados *Clinvar*, no qual a variante é descrita com todas as classes de patogenicidade, de benigna a patogênica, de acordo com os critérios adotados por cada estudo que resultou em submissão no banco de dados. Trata-se de uma variante relativamente comum, com frequência superior a 1% no banco de dados *Exome Variant Server*, classificada como de efeito desconhecido de acordo com os critérios propostos pelo ACMG. No presente estudo, essa variante foi considerada causal da perda auditiva nos probandos em que foi detectada, uma vez que não foram encontradas outras variantes que pudessem explicar a perda auditiva nos quatro casos e com base na classificação de patogênica, que consta no banco de dados *Deafness Variant Database*, além da existência de estudos que reforçam a hipótese de sua relação com perda auditiva quando em homozigose ou em heterozigose composta, embora notadamente com expressividade variável (Löppönen et al., 2012; Mikstiene et al., 2016). No caso do probando 39, para o qual foi feita a análise de segregação, foi visto que os pais ouvintes apresentam a variante em heterozigose. Ainda assim, os laudos com a descrição dessa variante foram redigidos com a ressalva da controvérsia que envolve a interpretação do seu significado clínico.

O probando 33 foi incluído no grupo de casos com suspeita de surdez não-sindrômica autossômica recessiva pois é filho de pais consanguíneos, primos em primeiro grau, embora tanto na família paterna quanto na família materna existam outros indivíduos afetados por perda auditiva. No probando, foi detectada apenas a variante c.386A>G / p.Tyr129Cys em heterozigose no gene *SIX1*, classificada como patogênica, porém, não associada à surdez não-sindrômica autossômica recessiva, e sim, à síndrome oto-branquial tipo 3 (OMIM#608389), um subtipo específico da síndrome branquio-oto-renal. Na avaliação pré-teste desse probando, realizada por geneticista de colaborador de outro estado, não foi relatado nenhum sinal além da perda auditiva que pudesse sugerir o diagnóstico clínico da condição sindrômica. No entanto, conforme revisto por Smith (2014), o espectro dessa síndrome exibe elevada variabilidade fenotípica, e apresenta como sinal mais frequente a perda auditiva, presente em mais de 90% dos casos, que pode estar combinada a outros sinais como fossetas pré-auriculares, vistas em cerca de 82% dos casos e a outros sinais menos frequentes, como fistúlas ou cistos branquiais (em 50% dos casos) e outras malformações auriculares. Portanto, é possível que não tenha sido

detectada outra alteração fenotípica da síndrome oto-branquial tipo 3 no probando ou até mesmo que ele apresente apenas a perda auditiva. Uma vez que há outros indivíduos na família desse probando afetados por perda auditiva, está indicada a reavaliação clínica e a ampliação do estudo genético para outros indivíduos.

A variante c.526C>T / p.Arg176Cys no gene *LHFPL5*, detectada na mostra do probando 57, é classificada como variante de efeito desconhecido, porém, o caso foi considerado parcialmente concluído uma vez que se trata de uma variante extremamente rara, descrita como provavelmente patogênica pelos preditores *in silico* consultados e não foram encontradas outras variantes que possam explicar a perda auditiva nesse probando. Além disso, a análise de segregação revelou que a variante se encontra em heterozigose nos pais ouvintes e em homozigose na irmã também afetada.

No probando 84, foi identificada em homozigose a variante c.436C>T / p.Arg146Ter no gene *CEACAM16*, para o qual variantes que acarretam ganho de função foram associadas à surdez não sindrômica autossômica dominante (Hofrichter et al., 2015; Wang et al., 2015; Zheng et al., 2011). A variante detectada nesse estudo é extremamente rara, do tipo sem sentido (*nonsense*), localizada no exon 4 do gene, que tem 7 exons (e codifica uma proteína composta por 425 aminoácidos) e leva à interrupção da síntese proteica no resíduo 146. A análise de segregação revelou que essa variante também foi detectada em homozigose em dois irmãos afetados e em heterozigose nos quatro irmãos ouvintes e também nos pais, que apresentam audição normal e são consanguíneos. Portanto, a segregação foi compatível com o padrão autossômico recessivo de transmissão. Essa descoberta motivou a apresentação desses dados em formato de pôster (Dias et al., 2018) na conferência *Molecular Biology of Hearing and Deafness 2018*, realizada entre 16 e 19 de maio de 2018 em Göttingen, Alemanha. Em abril de 2018, foi publicado um estudo (Booth, et al., 2018) no qual foram descritas duas variantes que alteram o *splicing* da proteína codificada pelo gene *CEACAM16* e acarretam perda de função em duas famílias iranianas não aparentadas que apresentam padrão autossômico recessivo de transmissão genética da surdez. O fenótipo nessas famílias é similar ao encontrado na família do probando 84 do presente estudo, que é caracterizado por perda auditiva pós-lingual progressiva, inicialmente afetando altas frequências, com início de manifestação na segunda década de vida. A descrição de que variantes de perda de função no gene *CEACAM16* causam perda auditiva, em combinação com a análise de segregação e dados da frequência da variante detectada no probando 84, permitiram classificar a variante c.436C>T / p.Arg146Ter como patogênica, de acordo com os

critérios do ACMG, e motivaram a submissão dos resultados obtidos para a família do probando 84 para publicação em periódico científico (anexo D), uma vez que os dados obtidos permitiram incluir o gene *CEACAM16* à lista dos genes relacionados a diferentes mecanismos de transmissão genética e forneceram evidência adicional de que variantes nesse gene causam perda auditiva não sindrômica autossômica recessiva.

Não foi possível detectar as variantes causais em 24 dos 37 casos (64,9%), em que se suspeitou de surdez não sindrômica autossômica recessiva. A porcentagem de média de bases com cobertura acima de 10x para essas amostras é apresentada na tabela 11. As amostras dos probandos 63 e 66 apresentaram porcentagem média de bases cobertas acima de 10x inferior ao limite estabelecido de 90%, o que pode ter prejudicado a identificação correta de variantes.

Tabela 11. Cobertura das amostras com suspeita de surdez não-sindrômica autossômica recessiva para as quais não foram identificadas variantes causais ou provavelmente causais

| | Proporção de bases com cobertura acima de 10X (%) | |
|---|---|---|
| Código da amostra | Corrida 1 | Corrida 2 |
| 1 | 98,3 | - |
| 4 | 98,2 | - |
| 5 | 95,1 | - |
| 18 | 65,2 | 96,9 |
| 21 | 54,7 | 97 |
| 22 | 97,0 | - |
| 26 | 96,5 | - |
| 29 | 75,5 | 98,2 |
| 32 | 97,7 | - |
| 40 | 46,6 | 96,1 |
| 44 | 97,1 | - |
| 47 | 97,2 | - |
| 48 | 97,0 | - |
| 45 | 43,1 | 97,2 |
| 55 | 43,4 | 96,3 |
| 56 | 97,0 | - |
| 58 | 97,6 | - |
| 59 | 50,2 | 93,4 |
| 63 | 86,2 | - |
| 66 | 75,9 | 18,0 |
| 69 | 90,0 | - |
| 73 | 50,7 | 96,2 |
| 87 | 98,5 | - |
| 91 | 97,7 | - |

A variante c.101T>C / p.Met34Thr no gene *GJB2* foi detectada em heterozigose nas amostras dos probandos 21 e 26 (dados não exibidos na tabela 10), porém, sem detecção de outra variante patogênica ou provavelmente patogênica no mesmo gene. Como já foi citado, a variante tem classificação controversa, com estudos que sugerem inclusive a hipótese de que cause perda auditiva não-sindrômica autossômica dominante com penetrância e expressividade variáveis (Dória, Fernandes, & Moura, 2016), portanto, são recomendadas análises adicionais dos probandos e familiares, se possível, pois não é possível descartar a possibilidade de que a perda auditiva nesses casos seja explicada por essa variante.

### 4.5 Probandos com suspeita de surdez não-sindrômica com mais de um mecanismo de transmissão genética possível.

Foi possível encontrar variantes classificadas como patogênicas ou provavelmente patogênicas em 6 dos 20 casos (30%) em que se suspeitou de surdez não-sindrômica com mais de um mecanismo de transmissão genética possível, conforme dados da tabela 12. Dados das variantes detectadas nos probandos 11, 19 e 27 também foram incluídos na tabela 12 (totalizando nove casos), uma vez que nesses três casos foram detectadas variantes de efeito desconhecido, porém, com frequência abaixo de 1% nos bancos de dados populacionais e preditas como patogênicas nas ferramentas de predição de patogenicidade consultadas, o que permitiu considerar esses três casos parcialmente concluídos. Além disso, as variantes detectadas nesses três probandos estão em genes associados à surdez não-sindrômica autossômica dominante, o que é compatível com o histórico familiar das 3 famílias nas quais foram encontradas, em que se suspeitou de herança autossômica dominante ou mitocondrial. As variantes detectadas no probando 19 foram detectadas em seu filho, também afetado por perda auditiva, portanto, a hipótese de que uma das variantes detectadas nesse caso seja a causa da perda auditiva em ambos não pode ser descartada. Nos laudos redigidos com a descrição das variantes de efeito desconhecido detectadas foi incluída a ressalva de que elas são uma provável explicação para a perda auditiva, porém, não se pode afirmar com certeza até que se obtenha evidências mais robustas da patogenicidade das variantes encontradas. Se fosse possível no momento confirmar que as variantes de efeito desconhecido são responsáveis pela perda auditiva nesses três casos, a taxa de detecção para esse grupo chegaria a 45%. Estudos funcionais, análise de segregação, e estudos caso-controle podem auxiliar na compreensão do significado clínico das variantes de efeito desconhecido detectadas.

Há poucos dados disponíveis na literatura sobre análise de painéis genéticos em amostras de probandos em que se suspeitou de mais de um mecanismo genético de transmissão, da maneira como foi estabelecido o critério de seleção nesse estudo, o que inviabiliza a comparação direta entre taxas de detecção obtidas. Porém, considerando-se que dos 20 casos incluídos nesse grupo, 17 tinham suspeita de herança autossômica dominante ou mitocondrial, e mutações mitocondriais causais não foram detectadas (os genes *MT-RNR1* e *MT-TS1* foram incluídos no desenho do painel), é possível classificar esse grupo de 17 amostras como de provável herança autossômica dominante, o que permite comparar as taxas de detecção obtidas. Para esse grupo de 17 amostras cuja hipótese diagnóstica *a posteriori* é de surdez autossômica dominante, a taxa de detecção de amostras consideradas patogênicas ou provavelmente patogênicas foi de 29,4% (5 casos), valor muito similar ao obtido no grupo das amostras com hipótese inicial de surdez autossômica dominante, descrito no item 4.3, que foi de 33,33%. Ao incluir os três casos em que variantes de efeito desconhecido com potencial elevado de explicar a perda auditiva foram detectadas, a taxa de detecção obtida para o grupo das 17 amostras passa a ser de 47,1% (6 casos), enquanto no grupo das amostras com hipótese inicial de surdez autossômica dominante, chegou a 58,3% com a inclusão desse tipo de variantes.

A análise combinada de todas as 29 amostras classificadas com provável herança autossômica dominante (considerando as 12 amostras do item 4.3 e as 17 amostras identificadas *a posteriori* nesse item com provável herança autossômica dominante), a taxa de detecção de variantes patogênicas ou provavelmente patogênicas obtida é de 31% (9 casos). Quando se incluem os casos com variantes de efeito desconhecido com potencial elevado de explicar a perda auditiva identificadas, a taxa de detecção chega a 51,7% (15 casos). Em uma revisão que compilou os resultados obtidos por 7 estudos em que sequenciamento de nova geração de paineis foi usado para investigação molecular da perda auditiva, Shearer & Smith (2015) descreveram taxas de detecção que variaram entre 31% e 100% no grupo de probandos com provável herança autossômica dominante.

Tabela 12. Descrição das variantes causais ou provavelmente causais encontradas no grupo dos probandos com suspeita de surdez não-sindrômica com mais de um mecanismo de transmissão genética possível

| | Probandos | | | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | **9** | | | **11** | **12** | **14** | **16** | **19** | | **27** | **49** | **70** |
| Hipótese | AD ou Mitocondrial | | | AD ou mitcondrial | AD ou mitocondrial | AD, AR ou mitocondrial | AD ou mitocondrial | AD ou mitocondrial | | AD ou mitocondrial | AD ou mitocondrial | AD ou mitocondrial |
| Cobertura >10X (%) | 98,3 | | | 97,9 | 98,5 | 93,2 | 93,7 | 82,0 | | 98,1 | 31,9 / 68,6 | 97,5 |
| Gene | *CDH23* | | *CCDC50* | *TNC* | *ADGRV1* | *TMPRSS3* | *GSDME* (*DFNA5*) | *GJB6* | *TNC* | *MYH14* | *TECTA* | *P2RX2* |
| Fenótipo OMIM | Surdez autossômica recessiva 12 | | Surdez autossômica dominante 44 | Surdez autossômica dominante 56 | Síndrome de Usher, tipo 2C | Surdez autossômica recessiva 8/10 | Surdez autossômica dominante 5 | Surdez autossômica dominante 3B | Surdez autossômica dominante 56 | Surdez autossômica dominante 4A | Surdez autossômica dominante 8/12 | Surdez autossômica dominante 41 |
| RefSeq | NM_001171933 | | NM_178335 | NM_002160 | NM_032119 | NM_032405 | NM_004403 | NM_001110219 | NM_002160 | NM_024729 | NM_005422 | NM_174873 |
| DNA | c.2968G>A | c.4562A>G | c.227G>A | c.6218G>A | c.12895C>T | c.646C>T | c.991-15_991-13delTTC | c.460T>A | c.3839A>G | C.4886G>T | c.5998delG | c.1133T>C |
| Proteína | p.Asp990Asn | p.Asn1521Ser | p.Arg76His | p.Arg2073Gln | p.Arg4299Ter | p.Arg216Cys | ? | p.Phe154Ile | p.Asp1280Gly | p.Arg1629Lys | p.Gly2000fs | p.Phe378Ser |
| dbSNP | rs771766431 | rs780987516 | rs138443787 | rs764464070 | rs756954694 | rs145913750 | rs727505273 | rs100154027 | ND | rs759824498 | ND | rs143626910 |
| Genótipo | Heterozigose | Heterozigose | Heterozigose | Heterozigose | Homozigose | Homozigose | Heterozigose | Heterozigose | Heterozigose | Heterozigose | Heterozigose | Heterozigose |
| 1000 Genomes | 0 | 0 | 0,000199681 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Exome Variant Server | 0 | 0 | 0,0006 | 0 | 0 | 0,000077 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0,0002 |
| ExAC | 0,00001863 | 0,00001658 | 0,0003 | 0,000008319 | 0,000008291 | 0,000008262 | 0 | 0 | 0 | 0,00006121 | 0 | 0,00004991 |
| ABraOM | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| ClinVar - classificação | ND | ND | ND | ND | ND | ND | Patogênica | ND | ND | ND | ND | ND |
| Deafness Variation Database - classificação | **Patogênica** | **Patogênica** | **Patogênica** | Efeito desconhecido | Efeito desconhecido | **Patogênica** | **Patogênica** | ND | ND | Efeito desconhecido | ND | Efeito desconhecido |
| SIFT | ND | ND | NA | 0-*Damaging* | NA | 0,0-*Damaging* | NA | 0,022-*Damaging* | 0,207-*Tolerated* | 0,001-*Damaging* | NA | 0-*Damaging* |
| Polyphen-2 | 1,0-*Damaging* | 0,865-*Possibly* | NA | 1,0-*Damaging* | NA | 1,0-*Damaging* | NA | 0,986-*Damaging* | 0,993-*Damaging* | 1,0-*Damaging* | NA | 0,999-*Damaging* |
| Mutation Taster | *Disease causing* | *Disease causing* | *Disease causing* | *Disease causing* | *Disease causing* | *Disease causing* | NA | *Disease causing* | *Disease causing* | *Disease causing* | *Disease causing* | *Disease causing* |
| Histórico familiar | Filho único de mãe também afetada | | | Filho único de mãe também afetada | Mãe e 3 tios maternos afetados | Pais consanguíneos, irmão afetado, 3 gerações com afetados | Mãe e irmã afetadas | Filho afetado | | Mãe e pai afetados | Mãe, irmã, sobrinha, sobrinho e filho afetados | Mãe afetada |
| Análise de segregação | Herdadas - heterozigose composta | | Herdada da mãe | NR | NR | NR | NR | Variantes presentes também em heterozigose no filho afetado | | NR | NR | Presente na mãe afetada |
| Critérios - ACMG | PM1, PM2, PP3 | PM1, PM2, PP3 | PM1,BS2 | PM1, PP3 | PVS1, PM2 | PM1, PM2, PP3 | PVS1, PM2 | PM2, PP3 | PM2, PP3 | PM1, PM2, PM6, PP3 | PVS1, PM2 | PM1, PP3 |
| Classificação - ACMG | Efeito desconhecido | Efeito desconhecido | Efeito desconhecido | Efeito desconhecido | **Provavelmente patogênica** | Efeito desconhecido | **Provavelmente patogênica** | Efeito desconhecido | Efeito desconhecido | **Provavelmente patogênica** | **Provavelmente patogênica** | Efeito desconhecido |

Legenda: AD - autossômica dominante / AR - autossômica recessiva / ND - não descrito / NA - não se aplica / NR - não realizada por ausência de material de familiares

O probando 9 foi incluído na casuística desse estudo sob suspeita de surdez autossômica dominante ou mitocondrial, uma vez que sua mãe também é afetada por perda auditiva. No probando foi detectada a variante c.227G>A / p.Arg76His em heterozigose no gene *CCDC50*, associado à surdez autossômica dominante 44 (DFNA44) e foram detectadas também duas variantes no gene *CDH23*, associado à surdez autossômica recessiva 12 (DFNB12). As três variantes detectadas são descritas como patogênicas pelo banco de dados *Deafness Variation Database*. A análise de segregação revelou que a mãe do probando também apresentava a variante patogênica no gene *CCDC50* em heterozigose, e a variante c.2968G>A / p.Asp990Asn no gene *CDH23* em homozigose, provavelmente por conta da consanguinidade relatada em sua família. Portanto, o distúrbio de audição do probando e da sua mãe devem ser o resultado da combinação dos efeitos deletérios da variante encontrada em heterozigose no gene *CCDC50* e das variantes detectadas no gene *CDH23* em heterozigose composta, no caso do probando, e em homozigose, no caso da mãe. Na consulta pré-teste, foi relatado que o pai do probando também apresenta perda auditiva, sem histórico familiar. Uma vez que foi detectada uma variante patogênica no gene *CDH23* em sua amostra, não se pode descartar a presença de uma segunda variante no mesmo gene que explique a perda auditiva no pai e, portanto, o sequenciamento completo do gene poderia ser recomendado.

Na amostra do probando 12 foi detectada a variante *nonsense* c.12895C>T / p.Arg4299Ter em homozigose no gene *ADGRV1*, também conhecido como *GPR98*, associado à síndrome de Usher tipo 2C, condição autossômica recessiva. A hipótese diagnóstica inicial para esse probando foi de distúrbio autossômico dominante ou mitocondrial, uma vez que sua mãe e outros três tios maternos são afetados, embora o probando seja o único afetado de oito irmãos. A variante detectada no gene *ADGRV1* é classificada como de efeito desconhecido pelo banco de dados *Deafness Variation Database*, no entanto, de acordo com os critérios do ACMG é classificada como provavelmente patogênica, uma vez que é extremamente rara e gera um códon de parada de tradução prematuro. Variantes patogênicas no gene *ADGRV1* são descritas como causa de Usher tipo 2C, caracterizada por perda auditiva de moderada a grave, função vestibular normal e retinose pigmentar com início de manifestação a partir da segunda década de vida (Millán et al., 2011), embora no banco de dados *Deafness Variation Database* também existam registros de variantes nesse gene associadas à surdez não-sindrômica. Quando o probando foi avaliado pelo serviço de aconselhamento genético do LGH, não foi referida retinose pigmentar, mas é possível que essa característica clínica

ainda não fosse detectável à época ou ainda não tivesse se manifestado, uma vez que costuma ocorrer durante ou após a puberdade (Millán et al., 2011). Para auxiliar na elucidação do significado clínico da variante detectada, foi recomendado que o probando retornasse para nova avaliação, com ampliação do estudo para outros familiares afetados, já que é possível que outra variante em gene de transmissão autossômica dominante explique a perda auditiva nos outros afetados da família.

Curiosamente, no caso do probando 14, três mecanismos genéticos de transmissão poderiam explicar sua perda auditiva: autossômico dominante, uma vez que há três gerações de afetados, com transmissão por indivíduos do sexo masculino; autossômico recessivo, uma vez que tem um irmão afetado e pais consanguíneos; e até mesmo mitocondrial, pois foi referida provável administração de antibiótico aminoglicosídeo nos primeiros dias de vida. A partir dos resultados obtidos nesse estudo, foi detectada a variante c.646C>T / p.Arg216Cys no gene *TMPRSS3* em homozigose, descrita como patogênica pelo banco de dados *Deafness Variant Database*. Essa variante foi descrita em heterozigose composta como causa de surdez pós-lingual em uma família alemã (Elbracht et al., 2007). Foi referido que esse probando não chegou a desenvolver a fala, portanto, é possível que a alteração detectada em homozigose seja responsável por surdez pré-lingual, como já foi descrito para outras variantes no gene *TMPRSS3* (Weegerink et al., 2011). É possível que a perda auditiva nos outros afetados desta família seja decorrente de outra variante, uma vez que a genealogia sugere provável mecanismo autossômico dominante de herança. Por isso, foi sugerido ampliar o estudo em outros indivíduos afetados.

A análise das variantes detectadas no probando 27 fornece mais um exemplo do quão dinâmica é a classificação das variantes relacionadas à surdez hereditária. Na primeira análise dos dados, realizada em 2015, foram detectadas duas variantes com potencial de explicar a perda auditiva no probando em genes de herança autossômica dominante: a variante c.2985G>C / p.Gln986His no gene *MYH9* era descrita como provavelmente patogênica pelo banco de dados *Deafness Variant Database* e classificada como de efeito desconhecido pelos critérios do ACMG; a variante c.4886G>T / p.Arg1629Lys no gene *MYH14* era classificada como de efeito desconhecido pelo banco de dados *Deafness Variant Database* e classificada como de efeito desconhecido pelos critérios do ACMG. Na revisão dos dados, realizada em 2018, foi verificado que a variante do gene *MYH9* passou a ser considerada como de efeito desconhecido pelo banco de dados *Deafness Variant Database*, e, portanto, a variante com maior probabilidade de

explicar a perda auditiva desse probando é a variante classificada como provavelmente patogênica no gene *MYH14*.

Não foi possível detectar as variantes causais em 11 dos 20 casos (55%), em que se suspeitou de surdez não sindrômica com mais de um mecanismo de herança genética possível.. A porcentagem de média de bases com cobertura acima de 10x para essas amostras é apresentada na tabela 13. As amostras dos probandos 53 e 62 apresentaram porcentagem média de bases cobertas acima de 10x inferior ao limite estabelecido de 90%, o que pode ter prejudicado a identificação de variantes.

Tabela 13. Cobertura das amostras com suspeita de surdez não-sindrômica autossômica recessiva para as quais não foram identificadas variantes causais ou provavelmente causais

| | Proporção de bases com cobertura acima de 10X (%) | |
|---|---|---|
| Código da amostra | Corrida 1 | Corrida 2 |
| 10 | 98,0 | - |
| 17 | 64,9 | 97,7 |
| 20 | 94,3 | - |
| 24 | 98,4 | - |
| 35 | 97,3 | - |
| 38 | 96,1 | - |
| 53 | 6,6 | 66,3 |
| 62 | 73,0 | 18 |
| 77 | 98,0 | - |
| 79 | 98,2 | - |
| 85 | 95,8 | - |

Na amostra do probando 17 (dados não exibidos na tabela 12), foi detectada a variante c.605A>G / p.Tyr202Cys no gene *MYO1A*, que nunca foi descrita em nenhum banco de dados populacional e predita como patogênica pelos três preditores *in silico* consultados, e portanto, poderia explicar a perda auditiva do probando. O gene *MYO1A* (lócus DFNA48) era associado à surdez autossômica dominante (Donaudy et al., 2003) porém, Eisenberger et al., (2014) publicaram um estudo no qual desqualificaram o gene *MYO1A* como causa de surdez, uma vez que a frequência de variantes consideradas patogênicas é superior a 0,1%, não condizente com o modelo autossômico dominante. Além disso, uma variante considerada patogênica foi detectada em homozigose em um indivíduo ouvinte. Atualmente, o gene *MYO1A* não consta no banco de dados *Deafness Variant Database*. Portanto, com base nos dados atuais sobre sua relação com a perda

auditiva, a variante detectada no probando 17 não foi considerada causa da surdez e não houve detecção de nenhuma variante adicional que pudesse explicar a perda auditiva nesse caso.

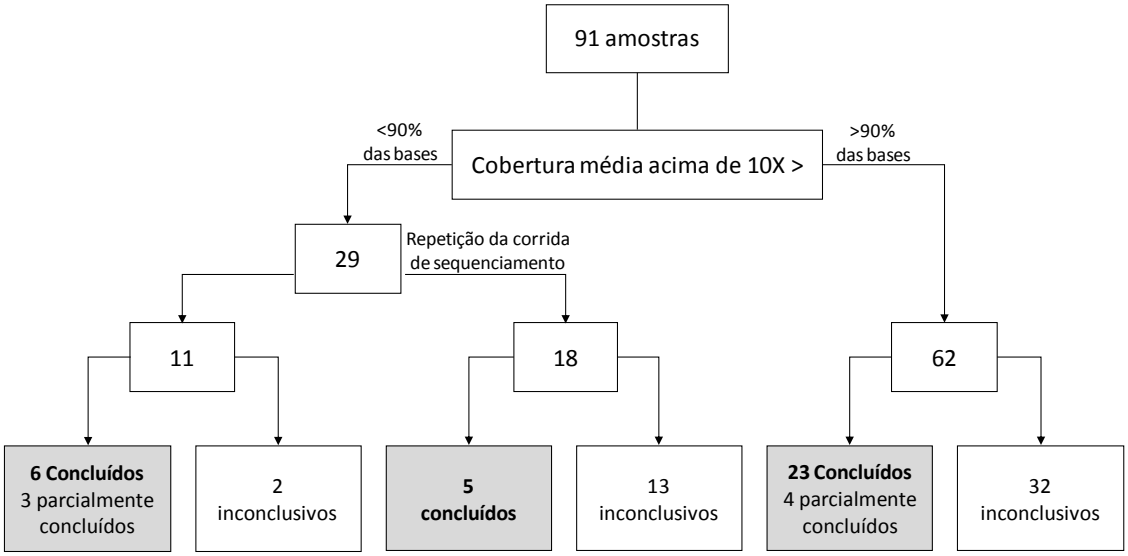
A já citada variante c.101T>C / p.Met34Thr (M34T) no gene *GJB2*, de significado clínico controverso, foi detectada em heterozigose na amostra do probando 53, para o qual se suspeitou de surdez autossômica dominante ou mitocondrial, porém sem outra variante patogênica ou patogênica no mesmo gene. Portanto, provavelmente ela não explica sozinha a perda auditiva do probando. Além disso, o histórico familiar desse probando é compatível com os modelos autossômico dominante ou mitocondrial, o que provavelmente exclui a suspeita de que a perda auditiva seja decorrente de alterações da alteração c.101T>C / p.Met34Ther¸ descrita como responsável por surdez autossômica recessiva.

Na amostra do probando 85, para o qual se suspeitou de surdez autossômica dominante ou mitocondrial, foram detectadas em heterozigose duas variantes classificadas como patogênicas pelos critérios do ACMG: a variante c.895G>A / p.Ala299Thr no gene *TMPRSS3* e a variante c.775C>T / p.Arg259Ter no gene *ILDR1*. Uma vez que ambos os genes são associados à surdez autossômica recessiva, as variantes detectadas não foram consideradas a causa da perda auditiva no probando, embora seja indicada a análise de segregação para descartar a possibilidade de herança autossômica dominante, já que outros genes de surdez são descritos como relacionados a mais de um mecanismo de transmissão.

### 4.6 Análise da casuística completa

Com a metodologia aplicada nesse estudo, foi possível obter cobertura média das regiões sequenciadas de 184,37X. A porcentagem média de bases com cobertura acima de 10x foi de 92,53%. Conforme esquema apresentado na figura 3, foi possível obter índices de cobertura acima de 10X para mais de 90% das bases sequenciadas para 62 amostras. Das 29 amostras que apresentaram índices inferiores a 90% de bases com cobertura mínima de 10X, foi possível encontrar variantes causais em nove delas, sem necessidade de repetição da corrida. Para outras 18 amostras, a corrida de sequenciamento foi repetida, o que permitiu a identificação de variantes em mais cinco casos. Em quatro amostras, os índices de cobertura acima de 10X obtidos foram menores que 90% mesmo após repetição da corrida de sequenciamento, o que pode indicar baixa qualidade das amostras de DNA ou falhas durante o preparo das bibliotecas.

Figura 3. Representação esquemática do fluxo de sequenciamento em função da cobertura e detecção de variantes causais.




**Observação:** os casos com variantes patogênicas ou provavelmente foram considerados concluídos e os casos com variantes de efeito desconhecido com elevado potencial de explicar a perda auditiva foram considerados parcialmente concluídos.

No caso da amostra selecionada como controle positivo, foi obtida cobertura acima de 10X para 95,2% das bases sequenciadas e foi identificada corretamente a variante c.35delG / p.Gly12Valfs em homozigose no gene *GJB2*. A inclusão de apenas um controle positivo é insuficiente para a análise estatística da especificidade do painel, que é recomendada para validação da técnica quando há interesse no uso clínico de testes genéticos (Shearer & Smith, 2015).

Foi possível encontrar variantes classificadas como patogênicas ou provavelmente patogênicas (casos considerados concluídos) em 34 dos 91 probandos investigados (37,4%), conforme dados apresentados na tabela 14. Com a inclusão de sete casos em que foram detectadas variantes de efeito desconhecido que potencialmente explicam a perda auditiva dos probandos, a taxa de detecção chega a 45,1%, totalizando 41 casos. As variantes detectadas nesses 41 probandos estão distribuídas em 33 genes. No gene *GJB2* foram identificadas quatro variantes, no gene *TMC1* foram identificadas três variantes e, em cada um dos genes *CDH23*, *GSDME*, *MYO7A* e *TNC* foram identificadas duas variantes. As outras variantes estão distribuídas em 27 genes. Nenhuma variante causal foi identificada no grupo de seis genes novos considerados candidatos pelo LGH como provavelmente associados à surdez.

Considerando apenas a detecção de variantes descritas como patogênicas ou provavelmente patogênicas, as maiores taxas de detecção foram obtidas nos grupos de

probandos com suspeita de surdez sindrômica. Possivelmente essa diferença reflita a caracterização molecular mais precisa dos genes e variantes que causam as síndromes de Waardenburg e Usher em comparação à caracterização molecular das formas de surdez não-sindrômica, para as quais o número de genes e variantes é muito maior e certamente ainda existem muitos lócus e genes a serem descobertos.

Tabela 14: Taxas de detecção de variantes por hipótese diagnóstica e na amostra global

| Hipótese diagnóstica | Probandos | Casos concluídos | Taxa de detecção (%) |
|---|---|---|---|
| Síndrome de Waardenburg | 9 | 4 | 44,4 |
| Síndrome de Usher | 13 | 8 | 61,5 |
| Surdez não-sindrômica autossômica dominante | 12 | 4/7* | 33,3 / 58,3* |
| Surdez não-sindrômica autossômica recessiva | 37 | 12/13* | 32,4 / 35,1* |
| Surdez não-sindrômica com mais de um mecanismo de transmissão genética possível | 20 | 6/9* | 30,0 / 45,0* |
| Total | 91 | 34/41* | 37,4/ 45,1* |

*Valores obtidos com a inclusão de casos em que foram detectadas variantes de efeito desconhecido que potencialmente explicam a perda auditiva no probando

Em uma criteriosa revisão de 16 estudos em que foi empregado o sequenciamento de nova geração de paineis multigênicos para investigar causas genéticas de perda auditiva, Shearer & Smith, (2015) descreveram taxa de detecção média de 41%, que variou entre 10% e 83%. Os dados obtidos por essa revisão estão apresentados na tabela 15, à qual foram adicionados os dados de outros dois estudos publicados nos anos seguintes, em que foi realizada investigação molecular de perda auditiva em grandes coortes utilizando painéis multigênicos para avaliar 1119 indivíduos de diversas etnias (Sloan-Heggen et al., 2016) e 207 famílias francesas (Baux et al., 2017). Diversos fatores podem explicar as diferenças observadas entre as taxas de detecção, dentre os quais o número de genes analisados, a realização ou não de triagem prévia de algumas mutações antes do sequenciamento de nova geração, os critérios de inclusão de amostras na casuística e os tipos de variantes detectáveis por cada estratégia, já que análises de CNVs não foram incluídas em todos os estudos.

Tabela 15: Taxas de detecção obtidas em estudos que empregaram sequenciamento de nova geração para diagnóstico molecular de perda auditiva hereditária.

| Referência | Número de genes | População | Análise de CNVs | Triagem prévia (lócus DFNB1) | Taxa de detecção global (%) |
|---|---|---|---|---|---|

| | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| (Shearer et al., 2010) | 54 | Caucasianos | Não | Sim | 83 |
| (Brownstein et al., 2011) | 246 | Judeus israelitas e árabes palestinos | Não | Sim | 55 |
| (Baek et al., 2012) | 80 | Coreanos | Não | Sim | 63 |
| (Diaz-Horta et al., 2012) | Exoma | Turcos/Iranianos | Não | Não | 60 |
| (Eppsteiner et al., 2012) | 59 | Multiétnico | Não | Não | 10 |
| (Choi et al., 2013) | 80 | Coreanos | Não | Sim | 60 |
| (Mutai et al., 2013) | 84 | Japoneses | Não | Sim | 47 |
| (Schrauwen et al., 2013) | 34 | Europeus | Não | Sim | 38 |
| (Shearer et al., 2013) | 54/59/66 | Multiétnico | Sim | Sim | 42 |
| (Wu et al., 2013) | 80 | Chineses | Não | Sim | 33 |
| (Yang, Wei, Chai, Li, & Wu, 2013) | 79 | Chineses | Não | Sim | 26 |
| (Gu et al., 2015) | 131 | Chineses | Sim | Sim | 13 |
| (Ji, Lu, Wang, Li, & Lin, 2014) | 80 | Chineses | Sim | Não | 27 |
| (Park et al., 2014) | 204 | Coreanos | Sim | Sim | 24 |
| (Vona et al., 2014) | 80 ou 129 | Europeus | Sim | Sim | 52 |
| (Wei et al., 2014) | 104 | Chineses | Não | Sim | 30 |
| (Sloan-Heggen et al., 2016) | 1119 | Multiétnico | Sim | Parcial | 39 |
| (Baux et al., 2017) | 207 | Franceses | Sim | Sim | 48 |

Adaptado de (A. E. Shearer & Smith, 2015)

Desde o desenho do painel utilizado em nosso estudo, feito no início de 2014, foram descritos pelo menos 35 genes novos como causa de surdez, de acordo com dados disponíveis no banco de dados *Hereditary Hearing Loss Homepage*. Portanto, é possível que variantes presentes nesses 35 genes ou em outros genes ainda não descritos expliquem a perda auditiva dos probandos em que não foi possível concluir o diagnóstico molecular.

Por limitações inerentes à própria técnica, o painel desenhado para esse estudo não incluiu a análise de CNVs em nenhum dos genes investigados, permitindo apenas detecção de variações de nucleotídeo único e pequenas deleções e inserções. As CNVs tem sido descritas como causa frequente de perda auditiva hereditária (Rosenberg et al., 2016), como também evidenciado pelos dados apresentados por Shearer et al., (2014) em que foram identificadas CNVs como causa de perda auditiva em 50 pacientes (18,7%) de uma amostra total de 686 probandos. O mesmo foi evidenciado em outros estudos (Baux et al., 2017; Sloan-Heggen et al., 2016). Como exemplo da importância da análise de CNVs na investigação de perda auditiva, é possível citar o caso do gene *STRC*, para o qual a maioria das mutações que causam surdez envolvem grandes CNVs. No estudo realizado por por Sloan-Heggen et al., (2016) com 1119 probandos, foram detectadas variantes patogênicas no gene *STRC* que explicaram a perda auditiva em 71 casos, dos quais 70 continham variações no número de cópias (deleções parciais ou completas do gene, em heterozigose composta ou homozigose). Esse gene está relacionado à perda auditiva não-sindrômica autossômica recessiva, grupo com maior número de amostras na nossa investigação. Possivelmente a análise de CNVs do gene *STRC* poderia ter

contribuído para obter maior taxa de detecção nesse grupo e é possível que a análise de CNVs nos outros genes incluídos também contribuísse com a identificação de variantes causais nas outras amostras para as quais o resultado foi inconclusivo.

Finalmente, em nosso estudo foram detectadas 43 variantes diferentes classificadas como patogênicas ou provavelmente patogênicas, de acordo com o banco de dados *Deafness Variant Database* ou os critérios propostos pelo ACMG, das quais 14 foram classificadas em uma dessas categorias por ambos. Foram detectadas 15 novas variantes que nunca haviam sido descritas como patogênicas ou provavelmente patogênicas, ampliando o espectro de variantes conhecidas que causam surdez nos genes analisados. Para quatro variantes classificadas como provavelmente patogênicas e uma classificada como patogênica pelos critérios do ACMG, a classificação que consta no banco de dados *Deafness Variation Database* é a de efeito desconhecido. Esse banco de dados é uma plataforma aberta, portanto, a submissão das variantes detectadas para curadoria pelo grupo de pesquisas responsáveis por essa ferramenta pode contribuir para a elucidação quanto ao significado clínico das variantes detectadas. É importante considerar que o processo de classificação das variantes é dinâmico, e mesmo o modelo amplamente aceito de classificação proposto pelo ACMG tem sido submetido a sugestões de refinamentos para evitar subjetividade e inconsistência na aplicação dos critérios (Nykamp et al., 2017). Por conta da enorme heterogeneidade e peculiaridades presentes na genética da surdez, um sistema próprio de classificação de variantes para essa condição foi sugerido por Oza et al., (2018) e pode auxiliar na obtenção de classificações mais robustas das variantes nos genes que causam surdez, inclusive com a resolução a respeito da patogenicidade de variantes atualmente classificadas como de efeito desconhecido.

É importante considerar que os critérios utilizados para identificar variantes nesse estudo refletem o conhecimento científico atual e, portanto, principalmente para as amostras sem detecção de variantes causais, é importante realizar revisão periódica a respeito da sua classificação, sobretudo no caso das variantes classificadas como de efeito desconhecido, detectadas em todas as amostras com resultados inconclusivos.

## 5. Conclusões

A utilização do painel multigênico permitiu a identificação das causas moleculares da surdez em 35 amostras da casuística investigada (37,4%), além de apontar variantes de efeito desconhecido que potencialmente explicam a perda auditiva em mais sete casos (7,7%). A taxa de detecção se mostrou similar à obtida em outros estudos que

empregaram o sequenciamento de nova geração de paineis multigênicos, a despeito das diferenças observadas entre metodologia e critérios de inclusão adotados. Os probandos dos casos concluídos ou parcialmente concluídos têm sido convocados a uma nova consulta pelo serviço de aconselhamento genético do LGH, para obterem informações a respeito das variantes detectadas e riscos envolvidos.

As variantes causais foram detectadas em 33 dos 99 genes analisados, portanto, a análise simultânea de diversos genes se mostrou uma estratégia eficiente em comparação com a abordagem clássica de análise gene a gene. Foi possível identificar 15 novas variantes classificadas como patogênicas ou provavelmente patogênicas extremamente raras, que até então não haviam sido descritas. Além disso, do ponto de vista científico, as contribuições mais relevantes foram a identificação da mutação de perda de função c.436C>T / p.Arg146Ter no gene *CEACAM16* responsável por surdez não-sindrômica autossômica recessiva e a confirmação do papel da mutação c.2090T>G / p.Leu697Trp no gene *MYO3A* como causa frequente de surdez não-sindrômica autossômica dominante em amostras brasileiras.

Os dados aqui apresentados reforçam o papel do sequenciamento de nova geração como ferramenta para o diagnóstico clínico e aconselhamento genético da surdez, assim como no caso de diversas outras condições que apresentam elevado grau de heterogeneidade genética. Embora seja possível realizar análises mais abrangentes, como o sequenciamento completo do exoma e até mesmo do genoma, a conclusão desse estudo é que a utilização dos paineis multigênicos é muito eficaz. Além de ser uma opção mais barata, permite cobertura mais uniforme entre as regiões sequenciadas, número maior de amostras analisadas em uma mesma corrida, análise bioinformática mais simples, e evita as implicações do aconselhamento genético complexo a respeito de achados incidentais. Com base na literatura, sugere-se, nos dias de hoje, que um painel seja desenhado de maneira a contemplar também variantes no número de cópias, responsáveis por cerca de 20% dos casos de perda auditiva hereditária. É importante considerar que novos genes têm sido descritos como causa de surdez, portanto, a lista de genes analisados pelo painel deve ser atualizada em revisões periódicas, sempre que possível. O número total de amostras a serem sequenciadas e o fluxo de entrada de amostras deve ser considerado no momento da solicitação dos reagentes do painel, pois é possível que a lista de genes analisados se torne obsoleta antes que todo o material seja consumido, o que pode aumentar o custo do sequenciamento por amostra.

Os dados obtidos por esse estudo em conjunto com dados da revisão bibliográfica realizada permitiram concluir que o sequenciamento de nova geração de paineis multigênicos é uma estratégia eficaz para a investigação molecular da surdez. Além da importante contribuição evidenciada pelas taxas de detecção de variantes, é uma ferramenta importante para o aconselhamento genético e fornece dados científicos relevantes que ampliam o conhecimento a respeito da enorme heterogeneidade genética da surdez.

## 6. Referências Bibliográficas

Alford, R. L., Arnos, K. S., Fox, M., Lin, J. W., Palmer, C. G., Pandya, A., … Yoshinaga-Itano, C. (2014). American college of medical genetics and genomics guideline for the clinical evaluation and etiologic diagnosis of hearing loss. *Genetics in Medicine, 16*(4), 347–355. https://doi.org/10.1038/gim.2014.2

Aller, E., Nájera, C., Millán, J. M., Oltra, J. S., Pérez-Garrigues, H., Vilela, C., … Beneyto, M. (2004). Genetic analysis of 2299delG and C759F mutations (USH2A) in patients with visual and/or auditory impairments. *European Journal of Human*

*Genetics*, *12*(5), 407–410. https://doi.org/10.1038/sj.ejhg.5201138

Aparisi, M. J., Aller, E., Fuster-García, C., García-García, G., Rodrigo, R., Vázquez-Manrique, R. P., … Millán, J. M. (2014). Targeted next generation sequencing for molecular diagnosis of usher syndrome. *Orphanet Journal of Rare Diseases*, *9*(1), 168. https://doi.org/10.1186/s13023-014-0168-7

Arnos, K. S. (2003, agosto). The implications of genetic testing for deafness. *Ear and Hearing*. https://doi.org/10.1097/01.AUD.0000079800.64741.CF

Astuto, L. M., Bork, J. M., Weston, M. D., Askew, J. W., Fields, R. R., Orten, D. J., … Kimberling, W. J. (2002). CDH23 Mutation and Phenotype Heterogeneity: A Profile of 107 Diverse Families with Usher Syndrome and Nonsyndromic Deafness. *The American Journal of Human Genetics*, *71*(2), 262–275. https://doi.org/10.1086/341558

Atik, T., Bademci, G., Diaz-Horta, O., Blanton, S. H., & Tekin, M. (2015, março 31). Whole-exome sequencing and its impact in hereditary hearing loss. *Genetics research*. NIH Public Access. https://doi.org/10.1017/S001667231500004X

Bademci, G., Foster, J., Mahdieh, N., Bonyadi, M., Duman, D., Cengiz, F. B., … Tekin, M. (2016). Comprehensive analysis via exome sequencing uncovers genetic etiology in autosomal recessive nonsyndromic deafness in a large multiethnic cohort. *Genetics in Medicine*, *18*(4), 364–371. https://doi.org/10.1038/gim.2015.89

Baek, J.-I., Oh, S.-K., Kim, D.-B., Choi, S.-Y., Kim, U.-K., Lee, K.-Y., & Lee, S.-H. (2012). Targeted massive parallel sequencing: the effective detection of novel causative mutations associated with hearing loss in small families. *Orphanet Journal of Rare Diseases*, *7*(1), 60. https://doi.org/10.1186/1750-1172-7-60

Baldwin, E. E., Boudreault, P., Fox, M., Sinsheimer, J. S., & Palmer, C. G. S. (2012). Effect of pre-test genetic counseling for deaf adults on knowledge of genetic testing. *Journal of Genetic Counseling*, *21*(2), 256–272. https://doi.org/10.1007/s10897-011-9398-1

Batissoco, A. C., Abreu-Silva, R. S., Braga, M. C. C., Lezirovitz, K., Della-Rosa, V., Alfredo, T., … Mingroni-Netto, R. C. (2009). Prevalence of GJB2 (connexin-26) and GJB6 (connexin-30) mutations in a cohort of 300 Brazilian hearing-impaired individuals: Implications for diagnosis and genetic counseling. *Ear and Hearing*, *30*(1), 1–7. https://doi.org/10.1097/AUD.0b013e31819144ad

Baux, D., Vaché, C., Blanchet, C., Willems, M., Baudoin, C., Moclyn, M., … Roux, A. F. (2017). Combined genetic approaches yield a 48% diagnostic rate in a large cohort of French hearing-impaired patients. *Scientific Reports*, *7*(1), 16783. https://doi.org/10.1038/s41598-017-16846-9

Besnard, T., García-García, G., Baux, D., Vaché, C., Faugère, V., Larrieu, L., … Roux, A.-F. (2014). Experience of targeted Usher exome sequencing as a clinical test. *Molecular Genetics & Genomic Medicine*, *2*(1), 30–43. https://doi.org/10.1002/mgg3.25

Best, S., Wou, K., Vora, N., Van der Veyver, I. B., Wapner, R., & Chitty, L. S. (2018). Promises, pitfalls and practicalities of prenatal whole exome sequencing. *Prenatal*

*Diagnosis*, *38*(1), 10–19. https://doi.org/10.1002/pd.5102

Bocángel, M. A. P., Melo, U. S., Alves, L. U., Pardono, E., Lourenço, N. C. V., Marcolino, H. V. C., … Mingroni-Netto, R. C. (2018). Waardenburg syndrome: Novel mutations in a large Brazilian sample. *European Journal of Medical Genetics*, *61*(6), 348–354. https://doi.org/10.1016/j.ejmg.2018.01.012

Booth, K. T., Azaiez, H., Kahrizi, K., Wang, D., Zhang, Y., Frees, K., … Smith, R. J. (2018). Exonic mutations and exon skipping: Lessons learned from DFNA5. *Human Mutation*, *39*(3), 433–440. https://doi.org/10.1002/humu.23384

Booth, K. T., Kahrizi, K., Najmabadi, H., Azaiez, H., & Smith, R. J. (2018). Old gene, new phenotype: splice-altering variants in CEACAM16 cause recessive non-syndromic hearing impairment. *Journal of medical genetics*, jmedgenet-2018-105349. https://doi.org/10.1136/jmedgenet-2018-105349

Braga, M. C. C., Otto, P. A., & Spinelli, M. (1999). Recurrence Risks in Cases of Nonsyndromic Deafness. *The Brazilian Journal of Dysmorphology and Speech-Hearing Disorders*, (2), 33–40. Recuperado de http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1415-47572004000200004&lng=en&tlng=en

Brownstein, Z., Bhonker, Y., & Avraham, K. B. (2012, maio 29). High-throughput sequencing to decipher the genetic heterogeneity of deafness. *Genome Biology*. BioMed Central. https://doi.org/10.1186/gb-2012-13-5-245

Brownstein, Z., Friedman, L. M., Shahin, H., Oron-Karni, V., Kol, N., Rayyan, A., … Avraham, K. B. (2011). Targeted genomic capture and massively parallel sequencing to identify genes for hereditary hearing loss in middle eastern families. *Genome Biology*, *12*(9), R89. https://doi.org/10.1186/gb-2011-12-9-r89

Bruzzone, R., White, T. W., & Paul, D. L. (1996, maio 15). Connections with connexins: The molecular basis of direct intercellular signaling. *European Journal of Biochemistry*. https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1996.0001q.x

Bueno, A. S., Nunes, K., Dantas, V. G. L., Gunther, L. K., Pirana, S., Mendes, B. C. A., … Mingroni-Netto, R. C. (2018). *Frequency of the mutation c.2090T>G p.Leu697Trp in the MYO3A gene in Brazilian families with autosomal dominant hearing loss*. *2018 International Congress of Genetics*. Foz do Iguaçu. Recuperado de www.tcpdf.org

Burton, S., Withrow, K., Arnos, K. S., Kalfoglou, A., & Pandya, A. (2006). A focus group study of consumer attitudes toward genetic testing and newborn screening for deafness. *Genet Med*, *8*(12), 779–783. https://doi.org/10.1097/01.gim.0000250501.59830.ff

Camporesi, S. (2010, janeiro 22). Choosing deafness with preimplantation genetic diagnosis: An ethical way to carry on a cultural bloodline? *Cambridge Quarterly of Healthcare Ethics*. Cambridge University Press. https://doi.org/10.1017/S0963180109990272

Choi, B. Y., Park, G., Gim, J., Kim, A. R., Kim, B.-J., Kim, H.-S., … Park, W.-Y. (2013). Diagnostic Application of Targeted Resequencing for Familial Nonsyndromic

Hearing Loss. *PLoS ONE*, *8*(8), e68692. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0068692

Clark, J. (1981). Uses and abuses of hearing loss. *Asha*, *23*(7), 493–500. Recuperado de https://www.researchgate.net/profile/John_Clark12/publication/16145943_Uses_and_abuses_of_hearing_loss_classification/links/53da93270cf2e38c6337e92c.pdf

Dantas, V. G. L., Lezirovitz, K., Yamamoto, G. L., de Souza, C. F. M., Ferreira, S. G., & Mingroni-Netto, R. C. (2014). c.G2114A MYH9 mutation (DFNA17) causes non-syndromic autosomaldominant hearing loss in a Brazilian family. *Genetics and Molecular Biology*, *37*(4), 616–621. https://doi.org/10.1590/S1415-47572014005000025

Dantas, V. G. L., Raval, M. H., Ballesteros, A., Cui, R., Gunther, L. K., Yamamoto, G. L., … Mingroni-Netto, R. C. (2018). Characterization of a novel MYO3A missense mutation associated with a dominant form of late onset hearing loss. *Scientific Reports*, *8*(1), 8706. https://doi.org/10.1038/s41598-018-26818-2

Del Castillo, F. J., Rodríguez-Ballesteros, M., Álvarez, A., Hutchin, T., Leonardi, E., De Oliveira, C. A., … Del Castillo, I. (2005). A novel deletion involving the connexin-30 gene, del(GJB6-d13s1854), found in trans with mutations in the GJB2 gene (connexin-26) in subjects with DFNB1 non-syndromic hearing impairment. *Journal of Medical Genetics*, *42*(7), 588–594. https://doi.org/10.1136/jmg.2004.028324

Der Kaloustian, V. M., And, H. V. T., & Smith, S. D. (2014). Hereditary Hearing Loss and Its Syndromes, 3rd Edition. *American Journal of Medical Genetics Part A*, *164*(3), 852–854. https://doi.org/10.1002/ajmg.a.36311

Dias, A. M. M., Lezirovitz, K., Marcolino, H. V. C., Nicastro, F. S., Mendes, B. C. A., & Mingroni-Netto, R. C. (2018). Novel mutation in CEACAM16 gene segregating with autosomal recessive deafness. In *Molecular Biology of Hearing and Deafness 2018*.

Dollard, S. C., Grosse, S. D., & Ross, D. S. (2007). New estimates of the prevalence of neurological and sensory sequelae and mortality associated with congenital cytomegalovirus infection. *Reviews in Medical Virology*, *17*(5), 355–363. https://doi.org/10.1002/rmv.544

Donaudy, F., Ferrara, A., Esposito, L., Hertzano, R., Ben-David, O., Bell, R. E., … Gasparini, P. (2003). Multiple mutations of MYO1A, a cochlear-expressed gene, in sensorineural hearing loss. *American journal of human genetics*, *72*(6), 1571–1577. https://doi.org/10.1086/375654

Dória, M., Fernandes, S., & Moura, C. P. (2016). Study of Met34Thr variant in nonsyndromic hearing loss in four Portuguese families. *Porto Biomedical Journal*, *1*(1), 32–35. https://doi.org/10.1016/j.pbj.2015.07.001

Elbracht, M., Senderek, J., Eggermann, T., Thürmer, C., Park, J., Westhofen, M., & Zerres, K. (2007). Autosomal recessive postlingual hearing loss (DFNB8): compound heterozygosity for two novel TMPRSS3 mutations in German siblings. *Journal of medical genetics*, *44*(6), e81. https://doi.org/10.1136/jmg.2007.049122

Emery, S. D., Middleton, A., & Turner, G. H. (2010). Whose Deaf Genes Are They

Anyway?: The Deaf Community's Challenge to Legislation on Embryo Selection. *Sign Language Studies*, *10*(2), 155–169. https://doi.org/10.1353/sls.0.0037

Eppsteiner, R. W., Shearer, A. E., Hildebrand, M. S., DeLuca, A. P., Ji, H., Dunn, C. C., … Smith, R. J. H. (2012). Prediction of cochlear implant performance by genetic mutation: The spiral ganglion hypothesis. *Hearing Research*, *292*(1–2), 51–58. https://doi.org/10.1016/j.heares.2012.08.007

Estivill, X., Govea, N., Barceló, A., Perelló, E., Badenas, C., Romero, E., … Torroni, A. (1998). Familial Progressive Sensorineural Deafness Is Mainly Due to the mtDNA A1555G Mutation and Is Enhanced by Treatment with Aminoglycosides. *The American Journal of Human Genetics*, *62*(1), 27–35. https://doi.org/10.1086/301676

Fitzgerald, T. W., Gerety, S. S., Jones, W. D., Van Kogelenberg, M., King, D. A., McRae, J., … Hurles, M. E. (2015, março 12). Large-scale discovery of novel genetic causes of developmental disorders. *Nature*. Europe PMC Funders. https://doi.org/10.1038/nature14135

Fraser, F. C. (1974). Genetic counseling. *American journal of human genetics*, *26*(5), 636–659. Recuperado de http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4609197

Gao, X., & Dai, P. (2014). Impact of next-generation sequencing on molecular diagnosis of inherited non-syndromic hearing loss. *Journal of Otology*, *9*(3), 122–125. https://doi.org/10.1016/j.joto.2014.11.003

Gettelfinger, J., & Dahl, J. (2018). Syndromic Hearing Loss: A Brief Review of Common Presentations and Genetics. *Journal of Pediatric Genetics*, *07*(01), 001–008. https://doi.org/10.1055/s-0037-1617454

Goderis, J., De Leenheer, E., Smets, K., Van Hoecke, H., Keymeulen, A., & Dhooge, I. (2014). Hearing loss and congenital CMV infection: a systematic review. *Pediatrics*, *134*(5), 972–982. https://doi.org/10.1542/peds.2014-1173

Grati, M., Yan, D., Raval, M. H., Walsh, T., Ma, Q., Chakchouk, I., … Liu, X. Z. (2016). MYO3A Causes Human Dominant Deafness and Interacts with Protocadherin 15-CD2 Isoform. *Human Mutation*, *37*(5), 481–487. https://doi.org/10.1002/humu.22961

Green, R. C., Berg, J. S., Grody, W. W., Kalia, S. S., Korf, B. R., Martin, C. L., … Biesecker, L. G. (2013). ACMG recommendations for reporting of incidental findings in clinical exome and genome sequencing. *Genetics in Medicine*, *15*(7), 565–574. https://doi.org/10.1038/gim.2013.73

Grifa, A., A Wagner, C., D'Ambrosio, L., Melchionda, S., Bernardi, F., Lopez-Bigas, N., … Gasparini, P. (1999, setembro 1). Mutations in GJB6 cause nonsyndromic autosomal dominant deafness at DFNA3 locus [2]. *Nature Genetics*. https://doi.org/10.1038/12612

Guilford, P., Arab, S. Ben, Blanchard, S., Levilliers, J., Weissenbach, J., Belkahia, A., & Petit, C. (1994). A non–syndromic form of neurosensory, recessive deafness maps to the pericentromeric region of chromosome 13q. *Nature Genetics*, *6*(1), 24–28. https://doi.org/10.1038/ng0194-24

Hildebrand, M. S., Newton, S. S., Gubbels, S. P., Sheffield, A. M., Kochhar, A., de Silva,

M. G., … Smith, R. J. (2008, fevereiro 1). Advances in molecular and cellular therapies for hearing loss. *Molecular Therapy*. Elsevier. https://doi.org/10.1038/sj.mt.6300351

Hofrichter, M. A. H., Nanda, I., Gräf, J., Schröder, J., Shehata-Dieler, W., Vona, B., & Haaf, T. (2015). A Novel de novo Mutation in CEACAM16 Associated with Postlingual Hearing Impairment. *Molecular Syndromology*, *6*(4), 156–163. https://doi.org/10.1159/000439576

Issa, S., Bondurand, N., Faubert, E., Poisson, S., Lecerf, L., Nitschke, P., … Pingault, V. (2017). EDNRB mutations cause Waardenburg syndrome type II in the heterozygous state. *Human Mutation*, *38*(5), 581–593. https://doi.org/10.1002/humu.23206

Kenneson, A., Van Naarden Braun, K., & Boyle, C. (2002, agosto). GJB2 (connexin 26) variants and nonsyndromic sensorineural hearing loss: A HuGE review. *Genetics in Medicine*. https://doi.org/10.1097/00125817-200207000-00004

Kiang, D. T., Jin, N., Tu, Z. J., & Lin, H. H. (1997). Upstream genomic sequence of the human connexin 26 gene. *Gene*, *199*(1–2), 165–171. https://doi.org/10.1016/S0378-1119(97)00365-X

Kimberling, W. J., Hildebrand, M. S., Shearer, A. E., Jensen, M. L., Halder, J. A., Trzupek, K., … Smith, R. J. H. (2010). Frequency of Usher syndrome in two pediatric populations: Implications for genetic screening of deaf and hard of hearing children. *Genetics in Medicine*, *12*(8), 512–516. https://doi.org/10.1097/GIM.0b013e3181e5afb8

Kochhar, A., Hildebrand, M. S., & Smith, R. J. H. (2007, julho). Clinical aspects of hereditary hearing loss. *Genetics in Medicine*. https://doi.org/10.1097/GIM.0b013e3180980bd0

Lander, E. S., Linton, L. M., Birren, B., Nusbaum, C., Zody, M. C., Baldwin, J., … Morgan, M. J. (2001). Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature*, *409*(6822), 860–921. https://doi.org/10.1038/35057062

Lane, H. (2005, maio 11). Ethnicity, ethics, and the deaf-world. *Journal of Deaf Studies and Deaf Education*. Oxford University Press. https://doi.org/10.1093/deafed/eni030

Li, Q., & Wang, K. (2017). InterVar: Clinical Interpretation of Genetic Variants by the 2015 ACMG-AMP Guidelines. *American journal of human genetics*, *100*(2), 267–280. https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2017.01.004

Löppönen, T., Dietz, A., Väisänen, M. L., Valtonen, H., Kosunen, A., Hyvärinen, A., … Löppönen, H. (2012). Homozygous M34T mutation of the GJB2 gene associates with an autosomal recessive nonsyndromic sensorineural hearing impairment in Finnish families. *Acta Oto-Laryngologica*, *132*(8), 862–873. https://doi.org/10.3109/00016489.2012.669498

Mamanova, L., Coffey, A. J., Scott, C. E., Kozarewa, I., Turner, E. H., Kumar, A., … Turner, D. J. (2010, fevereiro 28). Target-enrichment strategies for next-generation sequencing. *Nature Methods*. Nature Publishing Group.

https://doi.org/10.1038/nmeth.1419

Manzoni, C. R. C. T., Ferreira, C. A., Almeida, S. M. V. T. de, & Tedesco, M. R. M. (2016). *Triagem auditiva neonatal na cidade de São Paulo*. Recuperado de http://pesquisa.bvsalud.org/sms/resource/pt/sms-12023

Middleton, A., Hewison, J., & Mueller, R. F. (1998). Attitudes of deaf adults toward genetic testing for hereditary deafness. *American Journal of Human Genetics*, *63*(4), 1175–1180. https://doi.org/10.1086/302060

Mikstiene, V., Jakaitiene, A., Byckova, J., Gradauskiene, E., Preiksaitiene, E., Burnyte, B., … Utkus, A. (2016). The high frequency of GJB2 gene mutation c.313_326del14 suggests its possible origin in ancestors of Lithuanian population. *BMC Genetics*, *17*(1), 45. https://doi.org/10.1186/s12863-016-0354-9

Millán, J. M., Aller, E., Jaijo, T., Blanco-Kelly, F., Gimenez-Pardo, A., & Ayuso, C. (2011). An Update on the Genetics of Usher Syndrome. *Journal of Ophthalmology*, *2011*, 1–8. https://doi.org/10.1155/2011/417217

Milunsky, J. M. (1993). Waardenburg Syndrome Type I. *GeneReviews(®)*, *700*, 699–700. Recuperado de http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20301703

Milunsky, J. M., Maher, T. a, Ito, M., & Milunsky, A. (2007). The value of MLPA in Waardenburg syndrome. *Genetic testing*, *11*(2), 179–182. https://doi.org/10.1089/gte.2006.0531

Morimoto, N., Mutai, H., Namba, K., Kaneko, H., Kosaki, R., & Matsunaga, T. (2018). Homozygous EDNRB mutation in a patient with Waardenburg syndrome type 1. *Auris Nasus Larynx*, *45*(2), 222–226. https://doi.org/10.1016/j.anl.2017.03.022

Morton, C. C., & Nance, W. E. (2006). Newborn Hearing Screening — A Silent Revolution. *New England Journal of Medicine*, *354*(20), 2151–2164. https://doi.org/10.1056/NEJMra050700

Mutai, H., Suzuki, N., Shimizu, A., Torii, C., Namba, K., Morimoto, N., … Matsunaga, T. (2013). Diverse spectrum of rare deafness genes underlies early-childhood hearing loss in Japanese patients: a cross-sectional, multi-center next-generation sequencing study. *Orphanet Journal of Rare Diseases*, *8*(1), 172. https://doi.org/10.1186/1750-1172-8-172

Nance, W. E. (2003). The genetics of deafness. *Mental Retardation and Developmental Disabilities Research Reviews*. https://doi.org/10.1002/mrdd.10067

Nykamp, K., Anderson, M., Powers, M., Garcia, J., Herrera, B., Ho, Y. Y., … Topper, S. (2017). Sherloc: A comprehensive refinement of the ACMG-AMP variant classification criteria. *Genetics in Medicine*, *19*(10), 1105–1117. https://doi.org/10.1038/gim.2017.37

Oliveira, C. A., Alexandrino, F., Abe-Sandes, K., Silva, W. A. J., Maciel-Guerra, A. T., Magna, L. A., & Sartorato, E. L. (2004). Frequency of the 35delG mutation in the GJB2 gene in samples of European, Asian, and African Brazilians. *Human biology*, *76*(2), 313–316. https://doi.org/10.1353/hub.2004.0035

Oliveira, C. A., Pimpinati, C. J., Alexandrino, F., Magna, L. A., Maciel-Guerra, A. T., &

Sartorato, E. L. (2007). Allelic frequencies of the 35delG mutation of the GJB2 gene in different Brazilian regions. *Genetic testing*, *11*(1), 1–3. https://doi.org/10.1089/gte.2006.9994

Olusanya, B. O. (2012). Neonatal hearing screening and intervention in resource-limited settings: An overview. *Archives of Disease in Childhood*, *97*(7), 654–659. https://doi.org/10.1136/archdischild-2012-301786

Oza, A., DiStefano, M., Hemphill, S., Cushman, B., Grant, A., Siegert, R., … Workgroup, T. C. H. L. E. (2018). Expert Specification of the ACMG/AMP Variant Interpretation Guidelines for Genetic Hearing Loss. *bioRxiv*, 313734. https://doi.org/10.1101/313734

Pandya, A., Xia, X. J., Landa, B. L., Arnos, K. S., Israel, J., Lloyd, J., … Nance, W. E. (1996). Phenotypic variation in Waardenburg syndrome: Mutational heterogeneity, modifier genes or polygenic background? *Human Molecular Genetics*, *5*(4), 497–502. https://doi.org/10.1093/hmg/5.4.497

Park, H.-J., Cho, H.-J., Baek, J.-I., Ben-Yosef, T., Kwon, T.-J., Griffith, A. J., & Kim, U.-K. (2010). Evidence for a founder mutation causing DFNA5 hearing loss in East Asians. *Journal of Human Genetics*, *55*(1), 59–62. https://doi.org/10.1038/jhg.2009.114

Park, J. H., Kim, N. K. D., Kim, A. R., Rhee, J., Oh, S. H., Koo, J.-W., … Choi, B. Y. (2014). Exploration of molecular genetic etiology for Korean cochlear implantees with severe to profound hearing loss and its implication. *Orphanet Journal of Rare Diseases*, *9*(1), 167. https://doi.org/10.1186/s13023-014-0167-8

Pennings, R. J. E., Wagenaar, M., van Aarem, A., Huygen, P. L. M., Kimberling, W. J., & Cremers, C. W. R. J. (2002). Hearing Impairment in Usher Syndrome. In *Genetic Hearing Impairment* (Vol. 61, p. 184–191). Basel: KARGER. https://doi.org/10.1159/000066832

Pepin, M. G., Murray, M. L., Bailey, S., Leistritz-Kessler, D., Schwarze, U., & Byers, P. H. (2016). The challenge of comprehensive and consistent sequence variant interpretation between clinical laboratories. *Genetics in Medicine*, *18*(1), 20–24. https://doi.org/10.1038/gim.2015.31

Pina-Neto, J. M. de. (2008). Aconselhamento Genético. In *Jornal de Pediatria* (Vol. 84, p. S20–S26). Sociedade Brasileira de Pediatria. https://doi.org/10.1590/s0021-75572008000500004

Pingault, V., Ente, D., Dastot-Le Moal, F., Goossens, M., Marlin, S., & Bondurand, N. (2010, abril). Review and update of mutations causing Waardenburg syndrome. *Human Mutation*. https://doi.org/10.1002/humu.21211

Prezant, T. R., Agapian, J. V., Bohlman, M. C., Bu, X., Öztas, S., Qiu, W. Q., … Fischel-Ghodsian, N. (1993). Mitochondrial ribosomal RNA mutation associated with both antibiotic-induced and non-syndromic deafness. *Nature Genetics*, *4*(3), 289–294. https://doi.org/10.1038/ng0793-289

Raviv, D., Dror, A. A., & Avraham, K. B. (2010). Hearing loss: A common disorder caused by many rare alleles. *Annals of the New York Academy of Sciences*, *1214*(1),

168–179. https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2010.05868.x

Read, A. P., & Newton, V. E. (1997). Waardenburg syndrome. *Journal of Medical Genetics*, *34*(8), 656–665. https://doi.org/10.1136/jmg.34.8.656

Rehm, H. L., Bale, S. J., Bayrak-Toydemir, P., Berg, J. S., Brown, K. K., Deignan, J. L., … Lyon, E. (2013). ACMG clinical laboratory standards for next-generation sequencing. *Genetics in Medicine*, *15*(9), 733–747. https://doi.org/10.1038/gim.2013.92

Resta, R., Biesecker, B. B., Bennett, R. L., Blum, S., Hahn, S. E., Strecker, M. N., & Williams, J. L. (2006, abril 19). A new definition of genetic counseling: National Society of Genetic Counselors' Task Force report. *Journal of Genetic Counseling*. Springer US. https://doi.org/10.1007/s10897-005-9014-3

Richards, S., Aziz, N., Bale, S., Bick, D., Das, S., Gastier-Foster, J., … Rehm, H. L. (2015). Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: A joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology. *Genetics in Medicine*, *17*(5), 405–424. https://doi.org/10.1038/gim.2015.30

Rosenberg, C., Freitas, É. L., Uehara, D. T., Auricchio, M. T. B. M., Costa, S. S., Oiticica, J., … Mingroni-Netto, R. C. (2016). Genomic copy number alterations in non-syndromic hearing loss. *Clinical Genetics*, *89*(4), 473–477. https://doi.org/10.1111/cge.12683

Rosenberg, T., Haim, M., Hauch, A. M., & Parving, A. (1997). The prevalence of Usher syndrome and other retinal dystrophy-hearing impairment associations. *Clinical genetics*, *51*(5), 314–321. https://doi.org/10.1111/j.1399-0004.1997.tb02480.x

Sanger, F., Nicklen, S., & Coulson, A. R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *74*(12), 5463–5467. https://doi.org/10.1073/pnas.74.12.5463

Schein, J. D., & Miller, M. H. (2008). Genetics and deafness: implications for education and life care of deaf students. *American annals of the deaf*, *153*(4), 408–410. https://doi.org/10.1353/aad.0.0054

Schrauwen, I., Sommen, M., Corneveaux, J. J., Reiman, R. A., Hackett, N. J., Claes, C., … Huentelman, M. J. (2013). A sensitive and specific diagnostic test for hearing loss using a microdroplet PCR-based approach and next generation sequencing. *American Journal of Medical Genetics Part A*, *161*(1), 145–152. https://doi.org/10.1002/ajmg.a.35737

Shearer, A. E., Black-Ziegelbein, E. A., Hildebrand, M. S., Eppsteiner, R. W., Ravi, H., Joshi, S., … Smith, R. J. H. (2013). Advancing genetic testing for deafness with genomic technology. *Journal of Medical Genetics*, *50*(9), 627–634. https://doi.org/10.1136/jmedgenet-2013-101749

Shearer, A. E., DeLuca, A. P., Hildebrand, M. S., Taylor, K. R., Gurrola, J., Scherer, S., … Smith, R. J. H. (2010). Comprehensive genetic testing for hereditary hearing loss using massively parallel sequencing. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *107*(49), 21104–21109. https://doi.org/10.1073/pnas.1012989107

Shearer, A. E., Hildebrand, M. S., Sloan, C. M., & Smith, R. J. H. (2011, dezembro). Deafness in the genomics era. *Hearing Research*. NIH Public Access. https://doi.org/10.1016/j.heares.2011.10.001

Shearer, A. E., & Smith, R. J. H. (2015). Massively Parallel Sequencing for Genetic Diagnosis of Hearing Loss. *Otolaryngology-Head and Neck Surgery*, *153*(2), 175–182. https://doi.org/10.1177/0194599815591156

Sloan-Heggen, C. M., Bierer, A. O., Shearer, A. E., Kolbe, D. L., Nishimura, C. J., Frees, K. L., … Smith, R. J. H. (2016). Comprehensive genetic testing in the clinical evaluation of 1119 patients with hearing loss. *Human Genetics*, *135*(4), 441–450. https://doi.org/10.1007/s00439-016-1648-8

Smith, R. J. (Carver C. of M. (2014). Branchiootorenal Spectrum Disorders. *GeneReviews™ - NCBI Bookshelf*, 1–11. https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2015.06.007.Using

Smith, R. J., Bale, J. F., & White, K. R. (2005). Sensorineural hearing loss in children. *The Lancet*, *365*(9462), 879–890. https://doi.org/10.1016/S0140-6736(05)71047-3

Smith, R. J., Hildebrand, M. S., & Van Camp, G. (2010). Deafness and Hereditary Hearing Loss Overview. *GeneReviews*, *6*, 1–13. https://doi.org/NBK1434 [bookaccession]

Smith, R. J., & Van Camp, G. (2014). *Nonsyndromic Hearing Loss and Deafness, DFNB1*. *GeneReviews(®)*. University of Washington, Seattle. https://doi.org/NBK1272 [bookaccession]

Song, J., Feng, Y., Acke, F. R., Coucke, P., Vleminckx, K., & Dhooge, I. J. (2016). Hearing loss in Waardenburg syndrome: a systematic review. *Clinical Genetics*, *89*(4), 416–425. https://doi.org/10.1111/cge.12631

Tamayo, M. L., Gelvez, N., Rodriguez, M., Florez, S., Varon, C., Medina, D., & Bernal, J. E. (2008). Screening program for Waardenburg syndrome in Colombia: Clinical definition and phenotypic variability. *American Journal of Medical Genetics, Part A*, *146*(8), 1026–1031. https://doi.org/10.1002/ajmg.a.32189

Tayoun, A. N. A., Mason-Suares, H., Frisella, A. L., Bowser, M., Duffy, E., Mahanta, L., … Amr, S. S. (2016). Targeted Droplet-Digital PCR as a Tool for Novel Deletion Discovery at the DFNB1 Locus. *Human Mutation*, *37*(1), 119–126. https://doi.org/10.1002/humu.22912

Tucker, T., Marra, M., & Friedman, J. M. (2009, agosto). Massively Parallel Sequencing: The Next Big Thing in Genetic Medicine. *American Journal of Human Genetics*. Elsevier. https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2009.06.022

Usami, S., & Nishio, S.-Y. (2004). *Nonsyndromic Hearing Loss and Deafness, Mitochondrial*. *GeneReviews(®)*. University of Washington, Seattle. https://doi.org/NBK1422 [bookaccession]

Vaché, C., Besnard, T., le Berre, P., García-García, G., Baux, D., Larrieu, L., … Roux, A. F. (2012). Usher syndrome type 2 caused by activation of an USH2A pseudoexon: Implications for diagnosis and therapy. *Human Mutation*, *33*(1), 104–108. https://doi.org/10.1002/humu.21634

Van Camp, G. & Smith, R. (2015). Hereditary Hearing Loss - Hereditary Hearing loss Homepage. Recuperado 12 de agosto de 2017, de http://hereditaryhearingloss.org/

Vona, B., Müller, T., Nanda, I., Neuner, C., Hofrichter, M. A. H., Schröder, J., … Haaf, T. (2014). Targeted next-generation sequencing of deafness genes in hearing-impaired individuals uncovers informative mutations. *Genetics in Medicine*, *16*(12), 945–953. https://doi.org/10.1038/gim.2014.65

Vona, B., Nanda, I., Hofrichter, M. A. H., Shehata-Dieler, W., & Haaf, T. (2015, outubro 1). Non-syndromic hearing loss gene identification: A brief history and glimpse into the future. *Molecular and Cellular Probes*. Academic Press. https://doi.org/10.1016/j.mcp.2015.03.008

Walsh, T., Pierce, S. B., Lenz, D. R., Brownstein, Z., Dagan-Rosenfeld, O., Shahin, H., … Avraham, K. B. (2010). Genomic Duplication and Overexpression of TJP2/ZO-2 Leads to Altered Expression of Apoptosis Genes in Progressive Nonsyndromic Hearing Loss DFNA51. *The American Journal of Human Genetics*, *87*(1), 101–109. https://doi.org/10.1016/J.AJHG.2010.05.011

Walsh, T., Shahin, H., Elkan-Miller, T., Lee, M. K., Thornton, A. M., Roeb, W., … Kanaan, M. (2010). Whole exome sequencing and homozygosity mapping identify mutation in the cell polarity protein GPSM2 as the cause of nonsyndromic hearing loss DFNB82. *American Journal of Human Genetics*, *87*(1), 90–94. https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2010.05.010

Wang, H., Wang, X. X., He, C., Li, H., Qing, J., Grati, M. M., … Feng, Y. (2015). Exome sequencing identifies a novel CEACAM16 mutation associated with autosomal dominant nonsyndromic hearing loss DFNA4B in a Chinese family. *Journal of Human Genetics*, *60*(3), 119–126. https://doi.org/10.1038/jhg.2014.114

Weegerink, N. J. D., Schraders, M., Oostrik, J., Huygen, P. L. M., Strom, T. M., Granneman, S., … Kunst, H. P. M. (2011). Genotype-phenotype correlation in DFNB8/10 families with TMPRSS3 mutations. *JARO - Journal of the Association for Research in Otolaryngology*, *12*(6), 753–766. https://doi.org/10.1007/s10162-011-0282-3

WHO. (2018). WHO | Deafness and hearing loss. *World Health Organization*. World HealthOrganization. https://doi.org//entity/mediacentre/factsheets/fs300/en/index.html

Wilch, E., Azaiez, H., Fisher, R. A., Elfenbein, J., Murgia, A., Birkenhäger, R., … Friderici, K. H. (2010). A novel DFNB1 deletion allele supports the existence of a distant cis-regulatory region that controls GJB2 and GJB6 expression. *Clinical Genetics*, *78*(3), 267–274. https://doi.org/10.1111/j.1399-0004.2010.01387.x

Wilcox, S. A., Saunders, K., Osborn, A. H., Arnold, A., Wunderlich, J., Kelly, T., … Dahl, H. H. M. (2000). High frequency hearing loss correlated with mutations in the GJB2 gene. *Human Genetics*, *106*(4), 399–405. https://doi.org/10.1007/s004390000273

Wingard, J. C., & Zhao, H.-B. (2015). Cellular and Deafness Mechanisms Underlying Connexin Mutation-Induced Hearing Loss â€“ A Common Hereditary Deafness. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, *9*, 202.

https://doi.org/10.3389/fncel.2015.00202

Withrow, K. A., Tracy, K. A., Burton, S. K., Norris, V. W., Maes, H. H., Arnos, K. S., & Pandya, A. (2009). Impact of genetic advances and testing for hearing loss: Results from a national consumer survey. *American Journal of Medical Genetics, Part A*, *149*(6), 1159–1168. https://doi.org/10.1002/ajmg.a.32800

Wu, C.-C., Lin, Y.-H., Lu, Y.-C., Chen, P.-J., Yang, W.-S., Hsu, C.-J., & Chen, P.-L. (2013). Application of Massively Parallel Sequencing to Genetic Diagnosis in Multiplex Families with Idiopathic Sensorineural Hearing Impairment. *PLoS ONE*, *8*(2), e57369. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0057369

Yamamoto, A. Y., Mussi-Pinhata, M. M., Isaac, M. de L., Amaral, F. R., Carvalheiro, C. G., Aragon, D. C., … Britt, W. J. (2011). Congenital Cytomegalovirus Infection as a Cause of Sensorineural Hearing Loss in a Highly Immune Population. *The Pediatric Infectious Disease Journal*, *30*(12), 1043–1046. https://doi.org/10.1097/INF.0b013e31822d9640

Yamasoba, T., Lin, F. R., Someya, S., Kashio, A., Sakamoto, T., & Kondo, K. (2013, setembro). Current concepts in age-related hearing loss: Epidemiology and mechanistic pathways. *Hearing Research*. NIH Public Access. https://doi.org/10.1016/j.heares.2013.01.021

Yan, D., & Liu, X. Z. (2010, junho 9). Genetics and pathological mechanisms of Usher syndrome. *Journal of Human Genetics*. Nature Publishing Group. https://doi.org/10.1038/jhg.2010.29

Yang, T., Wei, X., Chai, Y., Li, L., & Wu, H. (2013). Genetic etiology study of the non-syndromic deafness in Chinese Hans by targeted next-generation sequencing. *Orphanet Journal of Rare Diseases*, *8*(1), 85. https://doi.org/10.1186/1750-1172-8-85

Yates, B., Braschi, B., Gray, K. A., Seal, R. L., Tweedie, S., & Bruford, E. A. (2017). Genenames.org: The HGNC and VGNC resources in 2017. *Nucleic Acids Research*, *45*(D1), D619–D625. https://doi.org/10.1093/nar/gkw1033

Yu, C., Meng, X., Zhang, S., Zhao, G., Hu, L., & Kong, X. (2003). A 3-nucleotide deletion in the polypyrimidine tract of intron 7 of the DFNA5 gene causes nonsyndromic hearing impairment in a Chinese family. *Genomics*, *82*(5), 575–579. Recuperado de http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14559215

Zazo Seco, C., Serrão De Castro, L., Van Nierop, J. W., Morín, M., Jhangiani, S., Verver, E. J. J., … Kremer, H. (2015). Allelic mutations of KITLG, encoding KIT ligand, cause asymmetric and unilateral hearing loss and Waardenburg syndrome type 2. *American Journal of Human Genetics*, *97*(5), 647–660. https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2015.09.011

Zegers-Hochschild, F., Adamson, G. D., Dyer, S., Racowsky, C., de Mouzon, J., Sokol, R., … van der Poel, S. (2017). ASRM pages. *Fertility and Sterility*, *108*(3), 393–406. https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2017.06.005

Zelante, L., Gasparini, P., Estivill, X., Melchionda, S., D'Agruma, L., Govea, N., … Fortina, P. (1997). Connexin26 mutations associated with the most common form of

non-syndromic neurosensory autosomal recessive deafness (DFNB1) in Mediterraneans. *Human Molecular Genetics*, *6*(9), 1605–1609. https://doi.org/10.1093/hmg/6.9.1605

Zhao, H. B., Kikuchi, T., Ngezahayo, A., & White, T. W. (2006). Gap junctions and cochlear homeostasis. *Journal of Membrane Biology*. NIH Public Access. https://doi.org/10.1007/s00232-005-0832-x

Zheng, J., Miller, K. K., Yang, T., Hildebrand, M. S., Shearer, A. E., DeLuca, A. P., … Dallos, P. (2011). Carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 16 interacts with -tectorin and is mutated in autosomal dominant hearing loss (DFNA4). *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *108*(10), 4218–4223. https://doi.org/10.1073/pnas.1005842108

## 7. Anexos

### Anexo A – Cópia das fichas de anamnese utilizada na consulta de aconselhamento genético dos pacientes.

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

**DADOS PESSOAIS**

REGISTRO Nº:_____ DATA DA CONSULTA:_____

NOME DO PACIENTE:_____

ENDEREÇO:_____

TELEFONE:_____

ENCAMINHADO POR: ( )1.DERDIC ( )2.HC-IMPLANTE COCLEAR ( )3.HC OTORRINO ( )4.SURDEZ SÚBITA

( )5.I.C. ( ) 6.TANU ( ) 7.OUTROS

MÉDICO_____

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

NATURAL:_____

OCUPAÇÃO:( )1. Estudante ( ) 2.Outros

Qual?_____

ESCOLARIDADE: ( )0.Nenhuma ( )1.Fundamental I ( )2.Fundamental II ( )3.Médio incompleto ( )4.Médio completo ( )5.Superior incompleto ( )6.Superior completo ( )7.Pós-graduação

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

MÃE:_____

DATA NASC.:_____ IDADE:_____

NATURAL:_____

OCUPAÇÃO:( ) 1.Estudante ( ) 2.Outros

Qual?_____

ESCOLARIDADE: ( )0.Nenhuma ( )1.Fundamental I ( )2.Fundamental II ( )3.Médio incompleto ( )4.Médio completo ( )5.Superior incompleto ( )6.Superior completo ( )7.Pós-graduação

PAI:_____

_____

DATA NASC.:_____ IDADE:_____

NATURAL:_____

OCUPAÇÃO:( ) 1.Estudante ( ) 2.Outros

Qual?_____

ESCOLARIDADE: ( )0.Nenhuma ( )1.Fundamental I ( )2.Fundamental II ( )3.Médio incompleto ( )4.Médio completo ( )5.Superior incompleto ( )6.Superior completo ( )7.Pós-graduação

**HISTÓRICO FAMILIAL**

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

GRAU:_____

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

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

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

(VIDE HEREDOGRAMA PG 5)

**CARACTERIZAÇÃO DA SURDEZ**

LATERALIDADE: ( )1.Unilateral ( )2.Bilateral ( )3.Não determinada

ÉPOCA EM QUE PERCEBEU O PROBLEMA: ( )1.Pré-lingual ( )3.Pós-lingual

Idade de início:_____

IDADE EM QUE FOI FEITO O DIAGNÓSTICO:_____

EVOLUÇÃO: ( )1.Estacionária ( )2.Progressiva ( )3.Súbita ( )4.Não determinada

TIPO: ( )1.Sensorioneural ( )2.Condutivo ( )3.Misto ( )4.Não determinado

GRAU DA PERDA (Davis e Silverman, 1970):

( )1.Leve (21-40dB) ( )2.Moderada (41-70dB) ( )3.Severa (71-90dB) ( )4.Profunda (>91dB)

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

EXAMES REALIZADOS:

AUDIOMETRIA: ( )1.NÃO FEZ ( )2.NÃO TROUXE ( )2.CÓPIA NA PASTA

BERA/PEATE: ( )1.NÃO FEZ ( )2.NÃO TROUXE ( )2.CÓPIA NA PASTA

EMISSÕES OTO-ACÚSTICAS: ( )1.NÃO FEZ ( )2.NÃO TROUXE ( )2.CÓPIA NA PASTA

EXAMES DE IMAGEM: ( )1.NÃO FEZ ( )2.NÃO TROUXE ( )3.INFORMAÇÃO MÉDICA ( )4.CÓPIA NA PASTA QUAL?_____

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

**GESTAÇÃO**

INTERCORRÊNCIAS: ( )1.NÃO ( )2.SIM

PRÉ-NATAL: ( )1.NÃO ( )2.SIM, QUAIS EXAMES? ( )1.Rubéola ( )2.CMV ( )3.Toxoplasmose

( )4.Sífilis ( )5.Herpes ( )6.HIV ( )7. Outros:_____ ( ) 8. Não Sabe

INFECÇÕES MATERNAS: ( )1.NÃO ( )2.SIM

QUAL?_____

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

Quais?_____

_____

_____

_____

RAIO-X: ( )1.NÃO ( )2.SIM

OBSERVAÇÕES:_____

_____

_____

_____

_____

**PERÍODO PERINATAL**

INTERCORRÊNCIAS: ( )1.NÃO ( )2.SIM

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

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

Ao nascer: Peso_____ Comprimento_____

Boas condições de vitalidade: ( )1.NÃO ( )2.SIM

ANOXIA: ( )1.NÃO ( )2.SIM CIANOSE: ( )1.NÃO ( )2.SIM

ICTERÍCIA: ( )1.NÃO ( )2.SIM Banho de luz(Fototerapia): ( )1.NÃO ( )2.SIM

INCOMPATIBILIDADE DE Rh ( )1.NÃO ( )2.SIM

FEBRE ALTA: ( )1.NÃO ( )2.SIM DEFEITOS FÍSICOS: ( )1.NÃO ( )2.SIM

INCUBADORA: ( )1.NÃO ( )2.SIM

Motivo:_____

UTI neonatal: ( )1.NÃO ( )2.SIM

Motivo:_____

SAÍDA DA MATERNIDADE COM A MÃE: ( )1.NÃO

Motivo:_____( )2.SIM

OBSERVAÇÕES:_____

_____

_____

_____

_____

**EXPOSIÇÃO A FATORES ETIOLÓGICOS AMBIENTAIS**

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

OUTRAS DROGAS OTOTÓXICAS: ( )1.NÃO ( )2.SIM

Quais?_____

_____

_____

INFECÇÕES DE ORELHA: ( )1.NÃO ( )2.SIM DIABETES MELITO: ( )1.NÃO ( )2.SIM

MENINGITE/MENINGOENCEFALITES: ( )1.NÃO ( )2.SIM SARAMPO: ( )1.NÃO ( )2.SIM CAXUMBA: ( )1.NÃO ( )2.SIM INFECÇÕES DAS VIAS AÉREAS SUPERIORES: ( )1.NÃO ( )2.SIM

EXPOSIÇÃO CONSTANTE A RUÍDOS: ( )1.NÃO ( )2.SIM, por qto tempo?_____

OUTRAS DOENÇAS: ( )1.NÃO ( )2.SIM

OBS.:_____

_____

_____

_____

_____

INTERNAÇÕES: ( )1.NÃO ( )2.SIM

OBS.:_____

_____

_____

_____

_____

CIRURGIAS: ( )1.NÃO ( )2.SIM

OBS.:_____

_____

_____

_____

_____

**DESENVOLVIMENTO NEUROMOTOR**

DESENVOLVIMENTO:( )1.NORMAL ( )2.ATRASADO

BEBÊ: ( )1.FIRME ( )2. MOLE

SUSTENTOU O PESCOÇO:_____

SENTOU COM APOIO:_____

SENTOU SEM APOIO:_____

ENGATINHOU:_____

ANDOU:_____

PRIMEIRAS PALAVRAS:_____

**HIPÓTESE DIAGNÓSTICA**

ETIOLOGIA:( )1.GENÉTICA(HEREDITÁRIA) ( )2.AMBIENTAL (ADQUIRIDA) ( )3.IDIOPÁTICA

MANIFESTAÇÃO: ( )NÃO-SINDRÔMICA (isolada) ( )SINDRÔMICA

Qual?_____

( )3.NÃO DETERMINADA

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

COLETA DE MATERIAL PARA DIAGNÓSTICO/PESQUISA:

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

**INFORMAÇÕES – ACONSELHAMENTO GENÉTICO**

PAIS PRETENDEM TER MAIS FILHOS: ( )1.NÃO ( )2.SIM

MÉTODOS CONTRACEPTIVOS: LAQUEADURA ( )1.NÃO ( )2.SIM VASECTOMIA ( )1.NÃO ( )2.SIM

**CONSULTA**

( )1. Paga ( )2. Não Paga

Obs.:_____

Valor:_____

**HEREDOGRAMA**

## Anexo B – Termos de consentimento livre e esclarecido

**Universidade de São Paulo**
**Instituto de Biociências**

# TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

**(maiores de 18 anos)**

ESTUDO: Estudo molecular da heterogeneidade genética na surdez não-sindrômica e sindrômica

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

---

Eu, .....
(inserir o nome), 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 "Estudo molecular da heterogeneidade genética na surdez não-sindrômica e sindrômica" , e esclareço que obtive todas as informações.

Estou ciente de que:

O estudo se faz necessário para que se possam descobrir as possíveis causas de algumas doenças hereditárias como a "***surdez sindrômica e a surdez não-sindrômica***" que é um defeito do sistema auditivo.

---

I) Será feita a coleta de 10 ml. de sangue.

II) Essa coleta será feita apenas para este estudo e em nada influenciará o meu tratamento; não vai me curar; não vai me causar nenhum problema, exceto o pequeno incômodo de dor no momento da coleta (introdução da agulha para retirada do sangue).

III) Tenho a liberdade de desistir ou de interromper a colaboração neste estudo no momento em que desejar, sem necessidade de qualquer explicação;

IV) A desistência não causará nenhum prejuízo à minha saúde ou bem estar físico. Não virá interferir no atendimento ou tratamento médico;

V) 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;

VI) Caso eu desejar, poderei tomar conhecimento dos resultados, ao final desta pesquisa:

( ) Desejo conhecer os resultados desta pesquisa.

( ) Não desejo conhecer os resultados desta pesquisa.

VIII) Caso tenham sido tiradas fotografias,

( ) concordo que sejam incluídas em publicações científicas, se necessário

( ) concordo que sejam apresentadas em aulas para profissionais da saúde

( ) não concordo que sejam incluídas em nenhum tipo de publicação ou apresentação.

IX) O material colhido será armazenado por um tempo considerado necessário para a identificação e caracterização do gene e de sua mutação e/ou mecanismo genético responsável pela doença observada na minha família.

São Paulo, de de 20_____

**Participante:** .....

**Pesquisador Responsável pelo Projeto:** _____

Regina Célia Mingroni Netto - **Bióloga**

**Telefone para contato: (11) 3091-7478**

**Pesquisador e instituição responsáveis pelas amostras de DNA:**

_____

Dra. Regina Célia Mingroni Netto
CRBio/SP 10.238-01
Depto de Genética e Biologia Evolutiva
Instituto de Biociências – USP

# TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

**(menores de18 anos)**

ESTUDO: Estudo molecular da heterogeneidade genética na surdez não-sindrômica e sindrômica

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

---

Eu .....
RG ..... , abaixo assinado(a), concordo de livre e espontânea vontade que meu(minha) filho(a) ..... nascido(a) em _____ / _____ /_____ , participe do estudo "Estudo molecular da heterogeneidade genética na surdez não-sindrômica e sindrômica" e esclareço que obtive todas informações necessárias.
as informações.

Estou ciente de que:

---

I) O estudo se faz necessário para que se possam descobrir as possíveis causas de algumas doenças hereditárias como a "***surdez sindrômica e a surdez não-sindrômica***" que é um defeito do sistema auditivo.

II) Será feita a coleta de 10 ml. de sangue.

III) Essa coleta será feita apenas para este estudo e em nada influenciará no tratamento; não vai curar; não vai causar nenhum problema, exceto o pequeno incômodo de dor no momento da coleta (introdução da agulha para retirada do sangue).

IV) Tenho a liberdade de desistir ou de iterromper a colaboração neste estudo no momento em que desejar, sem necessidade de qualquer explicação;

V) A desistência não causará nenhum prejuízo à saúde ou bem estar físico. Não virá interferir no atendimento ou tratamento médico;

VI) Os resultados obtidos durante este ensaio serão mantidos em sigilo, mas concordo que sejam divulgados em publicações científicas, desde que meus os dados pessoais de meu filho não sejam mencionados;

VII) Caso eu desejar, poderei tomar conhecimento dos resultados, ao final desta pesquisa:

( ) Desejo conhecer os resultados desta pesquisa.

( ) Não desejo conhecer os resultados desta pesquisa.

VIII) Caso tenham sido tiradas fotografias,

( ) concordo que sejam incluídas em publicações científicas, se necessário

( ) concordo que sejam apresentadas em aulas para profissionais da saúde

( ) não concordo que sejam incluídas em nenhum tipo de publicação ou apresentação.

IX) O material colhido será armazenado por um tempo considerado necessário para a identificação e caracterização do gene e de sua mutação e/ou mecanismo genético responsável pela doença observada na minha família.

São Paulo, de de 20_____

**Participante:** .....

**Pesquisador Responsável pelo Projeto:** _____

Regina Célia Mingroni Netto - **Bióloga**

**Telefone para contato: (11) 3091-7478**

**Pesquisador e instituição responsáveis pelas amostras de DNA:**

_____

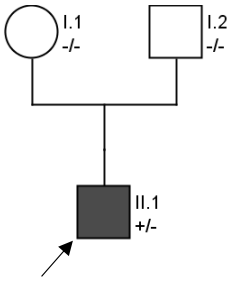
Dra. Regina Célia Mingroni Netto
CRBio/SP 10.238-01
Depto de Genética e Biologia Evolutiva
Instituto de Biociências – USP

## Anexo C – Heredogramas dos casos em que foi possível analisar familiares para investigação da segregação das variantes

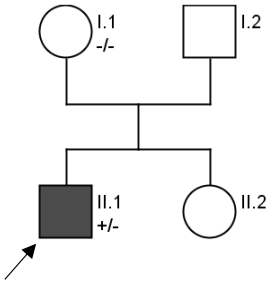
**Legenda** + variante detectada / **-** variante ausente

Probandos com suspeita de síndrome de Waardenburg (SW)

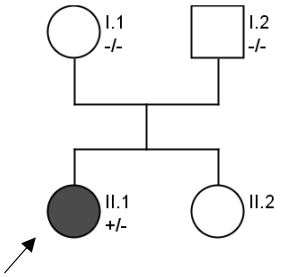
**Probando:** 31
**Variante:** c.44_62del / p.Val15fs no gene *SOX10*




**Probando:** 52
**Variante:** c.142G>C / p.Gly48Arg no gene *PAX3*

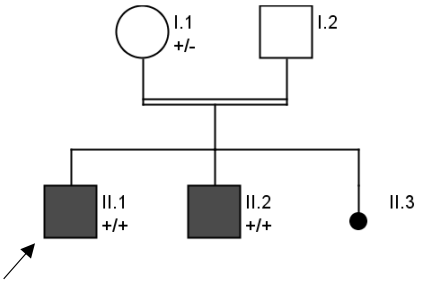



**Probando:** 74
**Variante:** c.461delG / p.Ser154fs no gene *PAX3*

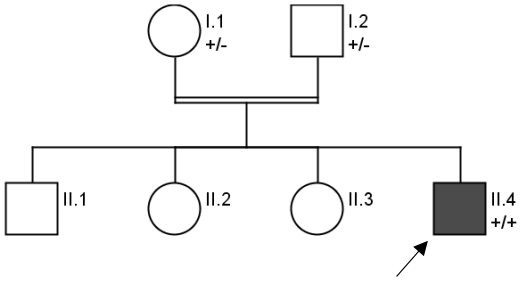



Probandos com suspeita de síndrome de Usher (SW)

**Probando:** 64
**Variante:** c.9345_9346del / p.Pro3116Hisfs no gene *USH2A*

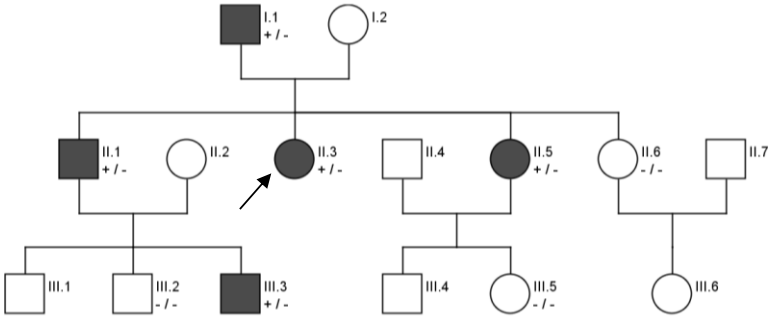



**Probando:** 68
**Variante:** c.1880delT / p.Leu627fs no gene *CDH23*

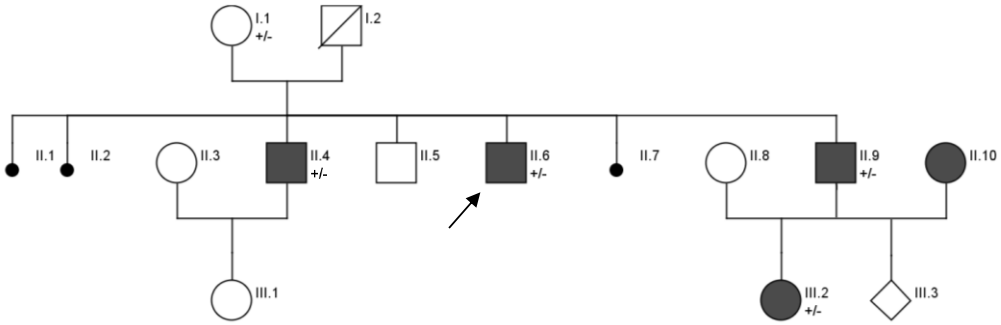


Probandos com suspeita de surdez não-sindrômica autossômica dominante

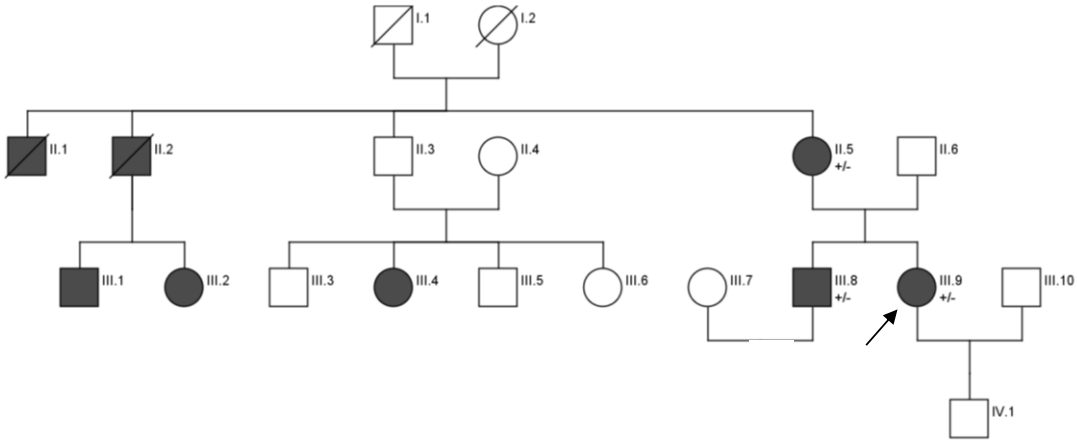
**Probando:** 34
**Variante:** c.2090T>G / p.Leu697Trp no gene *MYO3A*




**Probando:** 37
**Variante:** c.1754G>A / p.Gly585Asp no gene *TMC1*

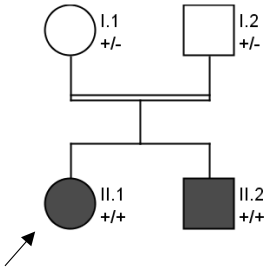



**Probando:** 71
**Variante:** c.1714G>C / p.Asp572His no gene *TMC1*

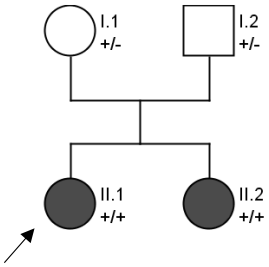


Probandos com suspeita de surdez não-sindrômica autossômica recessiva

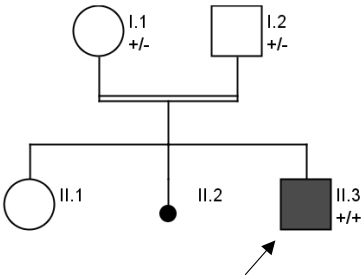
**Probando:** 3
**Variante:** c.291C>A / p.Cys97Ter no gene *CLDN14*



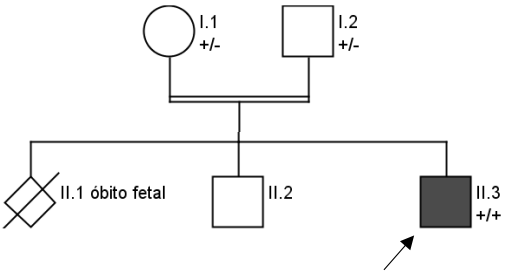

**Probando:** 8
**Variante:** c.4489G>C / p.Gly1497Arg no gene *MYO7A*



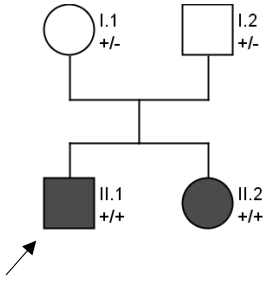

**Probando:** 28
**Variante:** c.109G>A / p.Val37Ile no gene *GJB2*



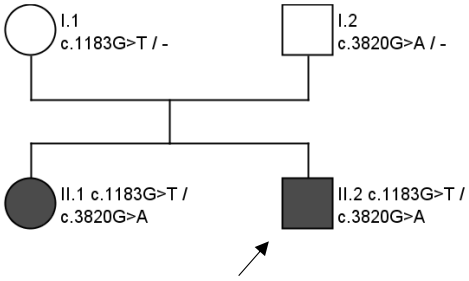

**Probando:** 39
**Variante:** c.101T>C / p.Met34Thr no gene *GJB2*



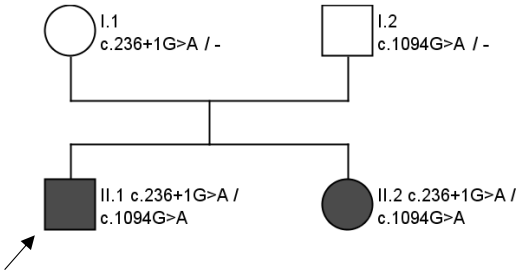

**Probando:** 57
**Variante:** c.526C>T / p.Arg176Cys no gene *LHFPL5*



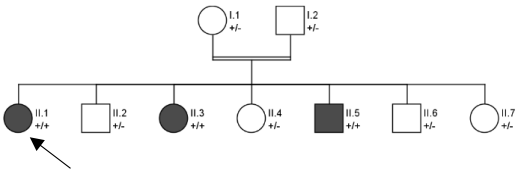

**Probando:** 72
**Variantes:** c.1183G>T / p.Val395Phe e c.3820G>A / p.Glu1274Lys no gene *CDH23*




**Probando:** 75
**Variantes:** c.236+1G>A e c.1094G>A / p.Arg365Lys no gene *TMC1*

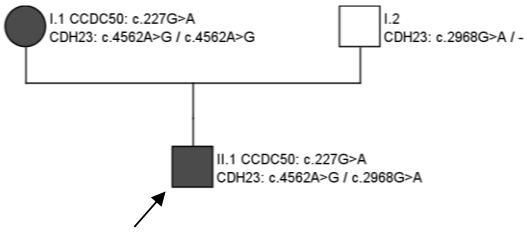



**Probando:** 84
**Variante:** c.436C>T / p.Arg146Ter no gene *CEACAM16*

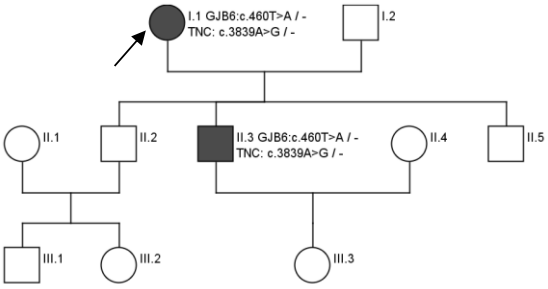


Probandos com suspeita de surdez não-sindrômica com mais de um mecanismo de transmissão genética possível

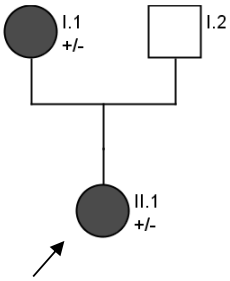
**Probando:** 5
**Variantes:** c.227G>A / p.Arg76His no gene *CCDC50*; c.2968G>A / p.Asp990Asn e c.4562A>G / p.Asn1521Ser no gene *CDH23*




**Probando:** 19
**Variantes:** c.460T>A / p.Phe154Ile no gene *GJB6* e c.3839A>G / p.Asp1280Gly no gene *TNC*




**Probando:** 70
**Variante:** c.1133T>C / p.Phe378Ser no gene *P2RX2*



**Anexo D – Manuscrito do artigo em que serão publicados os dados referentes à investigação realizada na família do probando 84**

**BRIEF COMMUNICATION**

# Further evidence for loss of function mutations in the *CEACAM16* gene causing nonsyndromic autosomal recessive hearing loss in humans

Alex Marcel Moreira Dias[1], Karina Lezirovitz[1,2], Fernanda Stávale Nicastro[3], Beatriz C.A. Mendes[3], Regina Célia Mingroni-Netto[1].

[1]Centro de Pesquisas sobre o Genoma Humano e Células-Tronco, Departamento de Genética e Biologia Evolutiva, Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brazil

2 Laboratório de Otorrinolaringologia/LIM32 – Hospital das Clínicas, Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brazil

.3. Divisão de Educação e Reabilitação dos Distúrbios da Comunicação da Pontifícia Universidade Católica de São Paulo, São Paulo, Brazil

Corresponding Author:

Regina Célia Mingroni-Netto

Dep. de Genética e Biologia Evolutiva

Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo

Rua do Matão, 277, CEP 05008-090

São Paulo – SP, Brazil

Phone: +55 (11) 3091-7553 / renetto@ib.usp.br

**Conflicts of interest statement**

We declare no conflicts of interest.

**RUNNING TITLE: Novel *CEACAM16* mutation causing recessive deafness**

## ABSTRACT

Mutations in the *CEACAM6* gene were first described as causing autosomal dominant nonsyndromic hearing loss, but two splice affecting variants have been recently described as causing autosomal recessive nonsyndromic hearing loss. We describe the novel and extremely rare loss-of-function variant c.436C>T / p.(Arg146Ter) in the *CEACAM16* gene segregating with postlingual progressive autosomal recessive hearing loss. This variant is predicted to significantly reduce the size of the wild-type protein. Our results give additional support that loss-of-function variants in *CEACAM16* cause autosomal recessive hearing loss in humans.

**MAIN TEXT**

Hearing loss is the most frequent sensory disability, with a wide array of etiologies, reflecting the number of cellular types and proteins necessary to maintain the process of sound perception. Nonsyndromic hearing loss corresponds to 70% of hereditary hearing loss and may be transmitted according to any genetic pattern of inheritance, with a broad spectrum of genes and phenotypes involved[1]. Mutations in more than 150 genes (http://hereditaryhearingloss.org) have been related to hereditary hearing loss. The organ of Corti (OC), located in the cochlea, is the main organ of hearing in humans. It is a neuroepithelium composed of two types of hair cells and accessory structures, such as the tectorial membrane[2] (TM), an extracellular matrix that spirals along the length of the OC and is composed of collagen fibrils and glycoproteins, such as α-tectorin (TECTA), β-tectorin (TECTB) and the carcinoembryoinic antigen-related cell adhesion molecule 16 (CEACAM16 #OMIM 614614)[2,3]. The CEACAM family is a group of Ig-related glycoproteins with diverse functions[4]. Though it is unknown how the proteins of the TM are assembled within the lumen of the inner ear[4], their relevance in

the hearing process is unquestionable, due to the large number of pathogenic variants in genes encoding TM proteins that lead to hearing loss[5,6].

The DFNA4, an autosomal dominant nonsyndromic hearing loss (ADNSHL) locus, maps on chromosome 19q13.31 and is subdivided into DFNA4A and DFNA4B according to the mutated gene (*MYH14* gene and *CEACAM16* gene, respectively[7–10]). CEACAM16 is well conserved among mice, rats and humans[11] .

In 2006, we described a family in which oculocutaneous albinism and hearing loss were segregating[12]. Hearing loss was caused by the homozygous mutation c.35delG / p.(Gly12Valfs) in the *GJB2* gene and albinism was explained by the homozygous mutation c.1121delT / p.(Phe374Serfs) in the *MATP* gene. However, hearing loss in a second sibship from the same pedigree remained unexplained. In this study, we reanalyzed this sibship, with three affected siblings presenting sensorineural, post-lingual and progressive hearing loss, with age of onset in the second decade of life, and four hearing siblings, all children of a normal-hearing consanguineous couple (Figure 1A). All individuals underwent evaluation of hearing threshold levels: pure tone audiometry, both air (frequencies range: 250-8000 Hz) and bone conduction (frequencies range: 500-4000 Hz) (Figure 1B).

After obtaining informed consent from family members, blood samples were collected. This study was approved by CONEP, the Brazilian National Committee on Ethics in Research.

Next Generation Targeted Sequencing of 100 genes related to hearing loss was performed in the proband's sample, using SureSelect QXT Target Enrichment System Kit for Illumina Multiplexed Sequencing protocol (Agilent, Santa Clara, USA) and Illumina MiSeq System (Illumina, San Diego, USA). Data analysis was performed according to bioinformatic procedures, as described[14]. Variants were first filtered according to frequency (<1% in: 1000 Genomes Project database; The National Heart, Lung, and Blood Institute Exome Sequencing Project Exome Variant Server and ExAC). The remaining variants were filtered based on pathogenicity prediction (SIFT, PolyPhen2, Mutation Taster) and on phenotypic description (Clinvar, HGMD, DeafnessVD). The homozygous substitution c.436C>T / p.(Arg146Ter) was found as the sole

likely pathogenic variant in the proband. This variant is extremely rare, it was only described in Genome Aggregation Database (gnomAD), where it was found in heterozygous state in one individual (frequency of 0.000004173). It generates a premature stop codon at position 146, in exon 4 (*CEACAM16* has 7 exons), significantly reducing the size of the wild-type protein, which is composed of 425 amino acids.

Sanger sequencing revealed co-segregation of the variant with HL. It was present in homozygous state in all three affected siblings and in heterozygous state in both hearing parents and in the four normal hearing siblings (Figure 1A and 1C). According to ACMG criteria for classification of variants[15], the variant is considered pathogenic.

Gain-of-function mutations in the *CEACAM16* gene results in ADNHSL[8,9,16]. A recent study revealed that two splice-altering variants in the *CEACAM16* gene were responsible for ARNSHL in two Iranian families[13]. One of these (c.662-1G>C) resides in the donor site of exon 5 of *CEACAM16* that leads to two abnormal splicing events, resulting in loss of the first nucleotides of exon 5 (c.662_764del) and leading to a premature stop codon (p.Phe221Cysfs*16), that alters the Ig-like C2-type 2 domain. The variant described herein generates a premature stop codon at position 146, significantly reducing the size of the protein. Once the interruption of protein synthesis in exon 5 was reported as resulting in hearing loss [13], we hipothesize that the interruption of the protein in exon 4, which has a Ig-like V-type domain, leads to a similar phenotype. Indeed, the phenotype in our patients is similar to that described[13], with all affected individuals presenting postlingual progressive hearing loss, initially affecting high frequencies, with age of onset in second decade of life. Targeted deletion of Ceacam16 in mice results in alteration of the tectorial membrane and also causes progressive hearing impairment[11]. The variant here described may have similar effects, once it is a well conserved protein among mice and humans.

ADNSHL and ARNHSL caused by mutations in the same gene is a common phenomenon in genetics of deafness, but generally the resulting phenotypes vary among different mutations and patterns of inheritance. This was not observed in *CEACAM16* until now. Our results, in

combination with the first report of variants of *CEACAM16* gene causing ARNSHL[13] add *CEACAM16* gene to the list of genes that are related to different modes of transmission of hearing loss. In this particular case, the resulting phenotype seems to be very similar in gain-of-function variants, related to dominant inheritance, and loss-of-functions variants, related to recessive transmission.

In conclusion, we report on a novel homozygous nonsense variant segregating with progressive ARNSHL, giving further support that loss-of-function variants in the *CEACAM16* are implicated in progressive ARNSHL.

## ACKNOWLEDGMENTS

The authors are indebted to Humberto Cezar Marcolino for technical assistance. We thank Dr. Alfredo Tabith Junior and all DERDIC staff for clinical assistance. This work was supported by FAPESP - CEPID Human Genome Research Center 2013/08028-1, Coordinator: Mayana Zatz). We thank all family members for participation in the study.

## CONFLICT OF INTEREST

We declare no conflicts of interest.

## REFERENCES

1. Smith R, Hildebrand, Van Camp G. Deafness and Hereditary Hearing Loss Overview. *GeneReviews*. 6:1-13. doi:NBK1434 [bookaccession]
2. Goodyear RJ, Richardson GP. Structure, Function, and Development of the Tectorial Membrane: An Extracellular Matrix Essential for Hearing. In: *Current Topics in Developmental Biology*. Vol 130. Academic Press; 2018:217-244. doi:10.1016/bs.ctdb.2018.02.006
3. Cheatham MA, Ahmad A, Zhou Y, Goodyear RJ, Dallos P, Richardson GP. Increased Spontaneous Otoacoustic Emissions in Mice with a Detached Tectorial Membrane. *J Assoc Res Otolaryngol*. 2016;17(2):81-88. doi:10.1007/s10162-015-0551-7
4. Kuespert K, Pils S, Hauck CR. CEACAMs: their role in physiology and pathophysiology. *Curr Opin Cell Biol*. 2006;18(5):565-571. doi:10.1016/j.ceb.2006.08.008
5. Richardson GP, Lukashkin AN, Russell IJ. The tectorial membrane: one slice of a

complex cochlear sandwich. *Curr Opin Otolaryngol Head Neck Surg*. 2008;16(5):458-464. doi:10.1097/MOO.0b013e32830e20c4

6. Hildebrand MS, Morín M, Meyer NC, et al. DFNA8/12 caused by TECTA mutations is the most identified subtype of nonsyndromic autosomal dominant hearing loss. *Hum Mutat*. 2011;32(7):825-834. doi:10.1002/humu.21512

7. 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). *Am J Hum Genet*. 2004;74(4):770-776. doi:10.1086/383285

8. Wang H, Wang X, He C, et al. Exome sequencing identifies a novel CEACAM16 mutation associated with autosomal dominant nonsyndromic hearing loss DFNA4B in a Chinese family. *J Hum Genet*. 2015;60(3):119-126. doi:10.1038/jhg.2014.114

9. Hofrichter MAH, Nanda I, Gräf J, et al. A Novel de novo Mutation in CEACAM16 Associated with Postlingual Hearing Impairment. *Mol Syndromol*. 2015;6(4):156-163. doi:10.1159/000439576

10. Zheng J, Miller KK, Yang T, et al. Carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 16 interacts with  -tectorin and is mutated in autosomal dominant hearing loss (DFNA4). *Proc Natl Acad Sci*. 2011;108(10):4218-4223. doi:10.1073/pnas.1005842108

11. Kammerer R, Rüttiger L, Riesenberg R, et al. Loss of mammal-specific tectorial membrane component carcinoembryonic antigen cell adhesion molecule 16 (CEACAM16) leads to hearing impairment at low and high frequencies. *J Biol Chem*. 2012;287(26):21584-21598. doi:10.1074/jbc.M111.320481

12. Lezirovitz K, Nicastro FS, Pardono E, et al. Is autosomal recessive deafness associated with oculocutaneous albinism a “coincidence syndrome”? *J Hum Genet*. 2006. doi:10.1007/s10038-006-0003-7

13. Booth KT, Kahrizi K, Najmabadi H, Azaiez H, Smith RJ. Old gene, new phenotype: splice-altering variants in CEACAM16 cause recessive non-syndromic hearing impairment. *J Med Genet*. April 2018:jmedgenet-2018-105349. doi:10.1136/jmedgenet-2018-105349

14. Caires-Júnior LC, Goulart E, Melo US, et al. Discordant congenital Zika syndrome twins show differential in vitro viral susceptibility of neural progenitor cells. *Nat Commun*. 2018;9(1):475. doi:10.1038/s41467-017-02790-9

15. Richards S, Aziz N, Bale S, et al. Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: A joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology. *Genet Med*. 2015;17(5):405-424. doi:10.1038/gim.2015.30

16. Zheng J, Miller KK, Yang T, et al. Carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 16 interacts with alpha-tectorin and is mutated in autosomal dominant hearing loss (DFNA4). *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011;108(10):4218-4223. doi:10.1073/pnas.1005842108

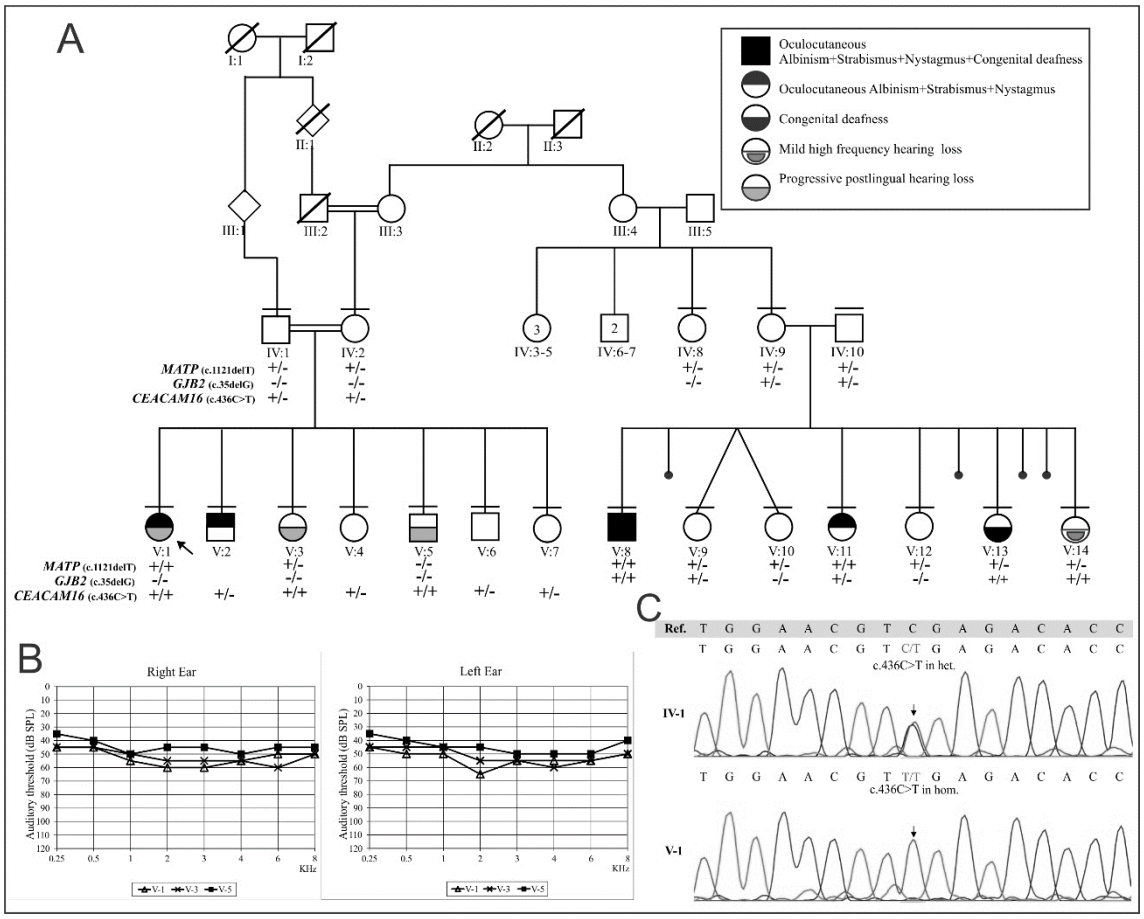



**Figure1**. (A) Pedigree of the family showing the segregation of the deafness and albinism related variants. Examined individuals are indicated with a bar above their symbol. (B) Audiograms of three affected homozygotes for c.436C>T. (C) Chromatograms of the *CEACAM16* gene (NM_001039213.3) showing the c.436C>T/p.(Arg146Ter) variant in heterozygous state (IV-1 sample) and in homozygous state (V-1 sample).