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

2018

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

São Paulo
2018

Ficha Catalográfica

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

Comissão Julgadora:

_____
Prof(a). Dr(a).

_____
Prof(a). Dr(a).

_____
Prof[a].Dra. Regina Célia Mingroni Netto
Orientadora

Dedicatória

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, Prof[a]. 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 Prof[a]. Dra. Mayana Zatz, pela referência profissional e pela coordenação do projeto CEPID.

A todas as famílias que participaram desse estudo.

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. À querida Silvia Souza da Costa, pelo apoio e ideias.

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 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.

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 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 to 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 são o tipo de deficiência sensorial mais 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 70dB; 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 posteriormente adquirida são decorrentes por 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 e redução dos casos de surdez decorrente de infecções.

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) e por conta dos 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 (Smith, Hildebrand, & Van Camp, 2010).

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 (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 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 sindrome 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.	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. 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 junções comunicantes desse 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.

Por conta da importância do lócus DFNB1 como causa de quadros de surdez não-sindrômica, é comum que a pesquisa de variantes nesse 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), possibilidade de obter 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 o sequenciamento 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.

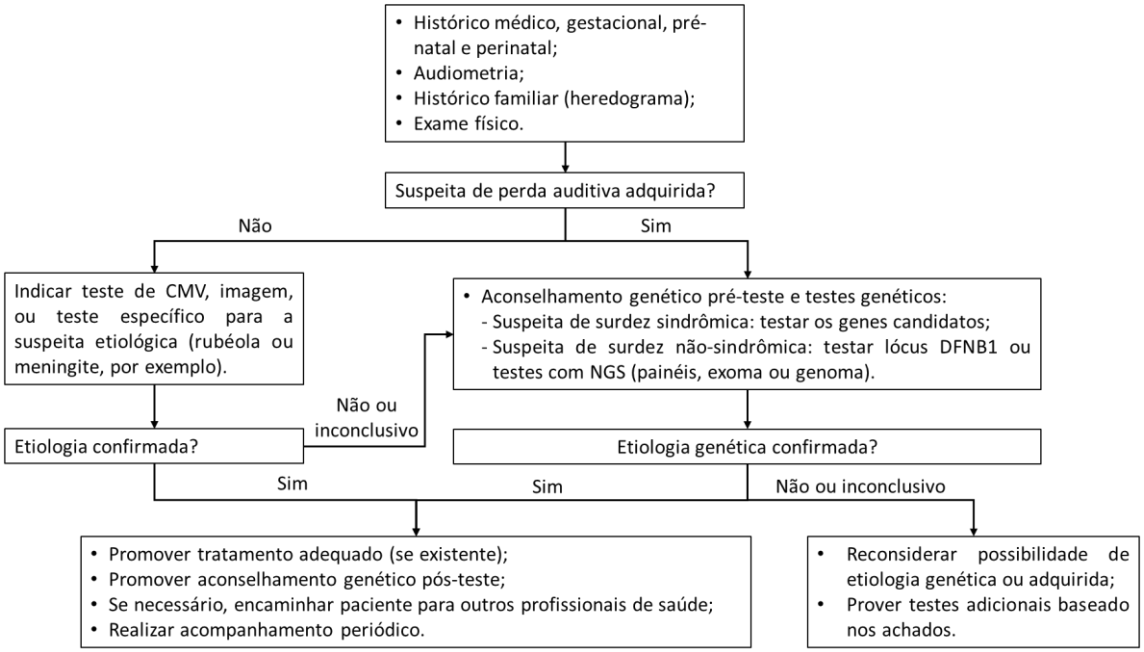
1.4 O sequenciamento de nova geração aplicado ao estudo molecular da surdez

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 custos dos sequenciamentos 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.

3. Conclusões

A utilização do painel multigênico permitiu a identificação das causas moleculares da surdez em 34 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