

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE GENÉTICA E BIOLOGIA EVOLUTIVA
LABORATÓRIO DE GENÉTICA HUMANA

ANDRÉ SILVA BUENO

**IDENTIFICAÇÃO DE VARIANTES PATOGENICAS EM
FAMÍLIAS COM PERDA AUDITIVA DE HERANÇA
AUTOSSÔMICA DOMINANTE**

**IDENTIFICATION OF PATHOGENIC VARIANTS IN FAMILIES
WITH AUTOSOMAL DOMINANT HEARING LOSS**

São Paulo

2019

ANDRÉ SILVA BUENO

**IDENTIFICAÇÃO DE VARIANTES PATOGÊNICAS EM
FAMÍLIAS COM PERDA AUDITIVA DE HERANÇA
AUTOSSÔMICA DOMINANTE**

**IDENTIFICATION OF PATHOGENIC VARIANTS IN FAMILIES
WITH AUTOSOMAL DOMINANT HEARING LOSS**

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

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Regina Célia Mingroni Netto

São Paulo

2019

Ficha Catalográfica

Bueno, André Silva

Identificação de Variantes Patogênicas em Famílias com Perda Auditiva de Herança Autossômica Dominante.

104 páginas.

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

1. Perda auditiva hereditária. 2. Surdez hereditária. 3. Surdez dominante. 4. Sequenciamento de Nova Geração. 5. Análise de exomas.

Comissão Julgadora:

Prof(a). Dr(a).

Prof(a). Dr(a).

Prof(a). Dr(a).

Prof^a. Dra. Regina Célia Mingroni Netto

Orientadora

Dedicatória

À minha família, pelo amor incondicional

*"A alegria que se tem em pensar e aprender
faz-nos pensar e aprender ainda mais".*

Aristóteles

Agradecimentos

À minha orientadora, Prof^a Dr^a Regina Célia Mingroni Netto, por ter me dado a oportunidade de ser seu aluno de mestrado e pelas dicas e conselhos que contribuíram para meu avanço como pessoa e como pesquisador.

A todos os docentes do Departamento de Genética e Biologia Evolutiva, pelo conhecimento científico que tive a oportunidade de receber.

À Prof^a Dr^a Mayana Zatz, pela coordenação do projeto CEPID.

Às famílias que participaram deste estudo e contribuíram com a realização deste projeto de pesquisa.

A todos os funcionários do Departamento de Genética e Biologia Evolutiva e, em especial, a Lígia Vieira, Maraisa de Castro Sebastião, Paulo Rogério de Camargo e Sílvia Souza da Costa, por todo o auxílio e aprendizado que recebi.

Aos funcionários do Centro de Pesquisa sobre o Genoma Humano e Células Tronco, em especial às Dras. Meire Aguenta e Daiane Gil Franco, pelas corridas de sequenciamento e à Dra. Marília Scliar, pelo auxílio em assuntos referentes a bioinformática.

À Dra. Kelly Nunes, pela contribuição fundamental com parte importante do meu projeto e por sua inestimável solicitude nos momentos em que precisei de seu auxílio.

À Dra. Karina Lezirovitz, pela contribuição com parte da casuística do estudo.

A todos os profissionais da DERDIC pelo apoio na avaliação da audição dos pacientes da casuística.

Ao Mestre Alex Marcel Moreira Dias, pela contribuição com parte da casuística do estudo.

Ao Dr. Leandro Ucela Alves, pela ajuda em meus primeiros passos com análises de exomas e pelas dicas e conselhos importantes.

Aos colegas do Laboratório de Genética Humana: Beatriz Schiavo, Camila Martins, Larissa Antunes, Lilian Kimura, Rodrigo Salazar, Vinícius Borges e William Bertani pela agradável companhia e apoio nos momentos difíceis e, em especial, a Vinícius Borges, pelo auxílio em assuntos de bioinformática referentes ao estudo.

Aos colegas de departamento: Giovanna Tolezano, Felipe Galante, Juliana Carnavalli, Juliana Sobral, Laura Machado, Luiz Gustavo Dufner de Almeida, Raquel Sarafian, Renan Barbosa Lemes, Sara Ferreira Pires, Sofia Lígia Guimarães Ramos e aos demais alunos do Departamento de Genética e Biologia Evolutiva pela agradável companhia e apoio.

A meus pais Wilson Bueno e Cleonice Bernardo da Silva Bueno, pelo inestimável apoio em todos os momentos de minha vida e pelos ensinamentos que recebo até os dias de hoje.

A meu irmão Eduardo Silva Bueno, meu parceiro de conversas sobre ciência e pela presença e apoio em todos os momentos de minha vida.

A meu avô (*in memoriam*) Alceu Bernardo da Silva, pelo incentivo dado à realização da minha vida acadêmica.

À CAPES, pelo auxílio financeiro na forma de bolsa.

À FAPESP, pelo auxílio financeiro do CEPID - Centro de Pesquisa sobre o Genoma Humano e Células-Tronco.

Índice

RESUMO	1
ABSTRACT	3
Capítulo 1	
Revisão Bibliográfica	5
1.1. Estrutura e função do aparelho auditivo	5
1.2. Etiologia e epidemiologia das perdas auditivas	10
1.3. Genética das perdas auditivas	13
1.4. Genes de miosinas e perda auditiva hereditária	19
1.5. Diagnóstico molecular das perdas auditivas e o sequenciamento de nova geração	23
1.6. Justificativa para a realização do estudo	30
Capítulo 2	
Objetivos	31
Capítulo 3	
Material e Métodos	32
3.1. Casuística	32
3.1.1. Casuística na qual buscamos identificar a frequência e origem da mutação c.2090T>G p.Leu697Trp no gene <i>MYO3A</i>	32
3.1.2. Famílias nas quais buscamos identificar a causa da perda auditiva por meio do sequenciamento massivo em paralelo do exoma	33
3.1.3. Aspectos éticos	36
3.2. Métodos	38
3.2.1. Estudo da origem da mutação c.2090T>G p.Leu697Trp no gene <i>MYO3A</i>	38
3.2.2. Análise de Identidade por Descendência (IBD) e estimativa do tamanho do haplótipo compartilhado que contem a mutação	38
3.2.3. Determinação do haplótipo e idade da mutação	39
3.2.4. Análise da origem e ancestralidade da mutação	40
3.2.5. Sequenciamento massivo em paralelo do exoma	40
3.2.6. Filtragem computacional de variantes	41
3.2.7. Sequenciamento convencional de Sanger	42
3.2.8. Análise de ligação da Família 7	43
Capítulo 4	
Triagem e estudo da origem da mutação c.2090T>G p.Leu697Trp no gene <i>MYO3A</i> em famílias brasileiras	44
4.1. Resultados	44
4.2. Discussão	47

Capítulo 5	
Estudo molecular de famílias nas quais buscamos identificar a causa de perda auditiva por meio do sequenciamento massivo paralelo do exoma .	53
5.1. Família 6	53
5.1.1. Resultados	53
5.1.2. Discussão	55
5.2. Família 7	58
5.2.1. Resultados	58
5.2.2. Discussão	66
Capítulo 6	
Conclusões	73
Capítulo 7	
Referências	75
Capítulo 8	
Anexos	102

Resumo

A perda auditiva é um defeito sensorial frequente na população mundial. Quando hereditária, pode ter herança autossômica dominante ou recessiva, ligada ao cromossomo X ou mitocondrial. Já foram mapeados 67 loci e já foram identificados 47 genes relacionados com a surdez de herança autossômica dominante, sendo esse um mecanismo de transmissão que ocorre em cerca de 20-30% dos casos genéticos.

Esse estudo teve como objetivo investigar a frequência e origem da mutação c.2090T>G p.Leu697Trp no gene *MYO3A*, identificada no Laboratório de Genética Humana – LGH do IBUSP e recentemente descrita na literatura como responsável por quadro de perda auditiva não síndrômica de herança autossômica dominante, em uma amostra de famílias brasileiras com perda auditiva de herança autossômica dominante.

Esse estudo teve ainda como objetivo identificar os genes e mutações correspondentes que explicam a perda auditiva não síndrômica de herança autossômica dominante em duas grandes famílias também em estudo no LGH-IBUSP.

Em relação à mutação c.2090T>G p.Leu697Trp no gene *MYO3A*, a sua triagem em uma coleção de 103 probandos de famílias com surdez de herança dominante revelou a presença da mutação c.2090T>G em mais quatro famílias, além da originalmente averiguada no Laboratório em 2013. Concluímos que a mutação explicou cerca de 5% dos casos de surdez de herança dominante investigados e que ela tem papel importante na causa de perda auditiva de herança dominante entre famílias brasileiras, o que justifica sua investigação em famílias similares em relação ao fenótipo e mecanismo de transmissão.

Análises adicionais, realizadas pela equipe do laboratório, de identidade por descendência (IBD), revelaram um coeficiente de parentesco equivalente a primos de 2º grau entre os indivíduos afetados das cinco famílias, o que indica parentesco próximo entre elas e provável origem comum da mutação. A idade da mutação foi estimada por volta de 27,4 gerações, o que equivale a aproximadamente 675 anos atrás (IC: 350-1325). Abordagens de estudo ancestralidade local revelaram que a região em que a mutação está localizada tem ancestralidade europeia. Embora não seja possível estimar se a mutação surgiu na Europa ou no Brasil em um indivíduo

de origem europeia, a identificação da mesma alteração em um indivíduo com perda auditiva na Holanda, por meio do banco de dados *LOVD*, sugere que a mutação pode ter surgido no continente europeu e sido introduzida durante a ocupação holandesa no nordeste brasileiro no século XVII (1624-1654).

Em relação a uma das famílias dentre as quais buscamos identificar a causa genética de perda auditiva por meio do sequenciamento massivo paralelo do exoma, foi identificada a mutação c.689C>T p.Ala230Val no gene *MYO7A* como causa genética da surdez. O gene *MYO7A* já era conhecido por sua relação com mutações causativas de surdez sindrômica (síndrome de Usher) e não sindrômica, de herança recessiva e dominante. Seu produto atua na manutenção da estrutura e função dos estereocílios das células ciliadas da cóclea. Em relação a uma segunda família estudada, identificamos após filtragem dos exomas dos indivíduos afetados, quatro variantes candidatas, presentes no braço curto do cromossomo 6, (c.1350dupC p.Phe450fs no gene *TRIM38*; c.1556G>A p.Arg519Gln no gene *WDR46*; c.1877C>T p.Pro626Leu no gene *RAB44*; c.6862C>A p.Pro2288Thr no gene *DST*). O estudo de segregação das variantes na família revelou a sua presença em 14 dos 16 indivíduos afetados. No entanto, nenhuma das quatro alterações pode ser considerada causativa na família, uma vez que vários indivíduos não afetados as possuem. Nossos resultados sugerem heterogeneidade genética na origem da perda auditiva da família ou a presença de uma variante em região não exônica, como causa da deficiência auditiva.

Embora não tenha sido identificada a causa molecular de perda auditiva em uma das duas famílias, o sequenciamento de nova geração revelou-se globalmente uma estratégia eficiente, em nosso estudo, para a identificação da causa molecular de distúrbios com elevada heterogeneidade genética, como a perda auditiva.

Abstract

Hearing loss is one of the most frequent sensorial disorders in humans. When inherited, hearing loss can be autosomal dominant or recessive, X-linked or mitochondrial. Sixty-seven *loci* have already been mapped and 47 genes were identified as associated with autosomal dominant hearing loss, which is responsible for about 20-30% of hereditary cases.

This study aimed to investigate the frequency and the origin of the c.2090T>G p.Leu697Trp mutation in *MYO3A* gene, identified in the Laboratory of Human Genetics – (LGH) IBUSP as related to nonsyndromic autosomal dominant hearing loss, in a sample of Brazilian families with autosomal dominant hearing loss.

This study also aimed to identify the genes and corresponding mutations that explain nonsyndromic autosomal dominant hearing loss in two large families also under investigation in LGH-IBUSP.

In relation to studies regarding the c.2090T>G p.Leu697Trp mutation in *MYO3A* gene, the screening of this mutation in a collection of 103 probands from families with autosomal dominant hearing loss revealed the presence of the mutation in four families, in addition to the family that was originally ascertained in the Laboratory in 2013. We concluded that this mutation explained about 5% of autosomal dominant deafness cases investigated, and it plays an important role in causing autosomal dominant hearing loss among Brazilian families, which justifies its investigation in similar pedigrees concerning the phenotype and the mechanism of genetic transmission.

Additional analysis, as identity by descent (IBD), performed by the Laboratory team, revealed a kinship coefficient equivalent to second cousins between the affected individuals of the five families, which indicates close relationship between them and a probable common origin for the mutation. The age of the mutation was estimated near 27,4 generations, which is equivalent to about 675 years (CI: 350-1325). Local ancestry study approaches revealed that the region in which the mutation is located has European Ancestry. Though it is not possible to estimate whether the mutation arose in Europe or in Brazil in an individual of European origin, the identification of the same alteration in an individual with hearing loss in Netherlands, reported in the *LOVD* database, suggests that the mutation has arisen

in Europe and has been introduced later during the Dutch occupation in the northeast region of Brazil in the 17th century (1624-1654).

Regarding one of the families we aimed to identify the genetic cause of hearing loss through massive parallel sequencing of the exome, the mutation c.689C>T p.Ala230Val in *MYO7A* gene was identified as responsible for deafness. *MYO7A* gene was already known for its relation with causative mutations of syndromic (Usher syndrome) and autosomal recessive or dominant nonsyndromic deafness. Its product is crucial for the maintenance of the structure and function of the stereocilia in cochlear hair cells. In relation to the second family, after filtering of variants detected in exome sequencing, we identified four candidate variants to explain hearing loss, which were located in the short arm of chromosome 6 (c.1350dupC p.Phe450fs in *TRIM38* gene; c.1556G>A p.Arg519Gln in *WDR46* gene; c.1877C>T p.Pro626Leu in *RAB44* gene; c.6862C>A p.Pro2288Thr in *DST* gene). Segregation studies of these variants revealed their presence in 14 of the 16 affected individuals of the family. However, none of these alterations can be considered as causative in the family, since several non-affected individuals presented the variants. Our results suggest genetic heterogeneity on the origin of hearing loss in this family or the presence of the causative mutation in a non-exonic region, as causative of hearing loss.

Though the molecular cause of hearing loss in one of the two families was not identified, next generation sequencing (NGS) revealed itself globally as an efficient strategy, in our study, for the identification of the molecular cause of diseases with an elevated degree of genetic heterogeneity, such as hearing loss.

Capítulo 1

Revisão Bibliográfica

1.1. Estrutura e função do aparelho auditivo

Audição é a capacidade de perceber o som por meio da detecção de vibrações das ondas sonoras que se propagam nos compartimentos do sistema auditivo. A orelha humana é capaz de detectar vibrações sonoras com frequências entre 20 e 20000Hz.

O aparelho auditivo é composto por três compartimentos anatômicos: a orelha externa (aurícula), a orelha média (cavidade timpânica) e a orelha interna. As ondas sonoras, ao serem capturadas pela orelha externa, são transportadas para o meato acústico externo e para a membrana timpânica, que vibra por causa das ondas sonoras. As vibrações da membrana timpânica são transmitidas através da orelha média até a orelha interna por meio de três ossículos móveis: o martelo, que é conectado à membrana timpânica; o estribo, cuja base encontra-se apoiada na janela oval do vestíbulo e a bigorna, a qual está situada entre o martelo e o estribo e se articula com ambos (Figura 1). As vibrações sonoras, ao atingirem a membrana timpânica, são propagadas por estes ossículos até a base do estribo, cuja movimentação para dentro da janela oval transmite as vibrações até a orelha interna (Willems, 2000).

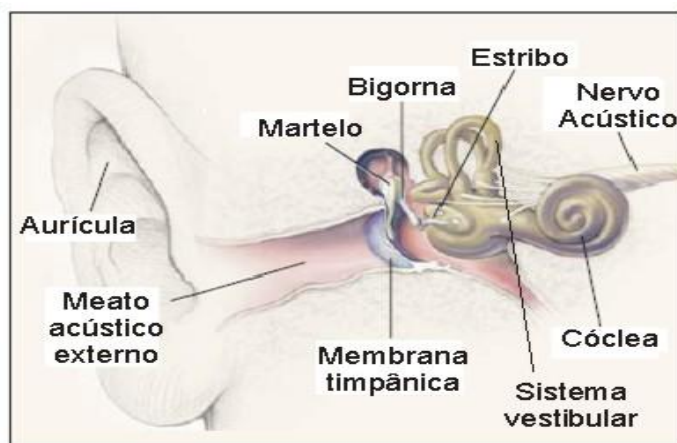


Figura 1: Esquema dos três compartimentos anatômicos do sistema auditivo: a orelha externa (aurícula), orelha média (cavidade timpânica com os três ossículos) e orelha interna (composta pela cóclea e pelo sistema vestibular). Fonte: Modificado de: (Willems, 2000).

A orelha interna é formada por escavações no osso temporal, cobertas por membranas e preenchidas por líquido. Nela estão presentes a cóclea e o aparelho

vestibular. Desse modo, inclui órgãos de dois sistemas sensoriais: o auditivo e o vestibular. Este último controla a orientação espacial e o equilíbrio. A cóclea é parte do sistema auditivo, sendo uma estrutura que se localiza no labirinto ósseo na orelha interna. É um canal ósseo membranoso altamente especializado como órgão receptor de sons. Consiste de tubos espiralados, divididos em três compartimentos: um superior, chamado de escala vestibular; um intermediário, denominado de escala média ou ducto coclear; e um inferior, chamado de escala timpânica.

Na escala média ocorre um tipo especial de líquido com alta concentração de potássio e baixa concentração de sódio, a endolinfa. A escala vestibular e a escala timpânica são preenchidas com perilinfa, um líquido com alta concentração de sódio e baixa concentração de potássio, exatamente o contrário da endolinfa. A membrana basilar separa a escala média da escala timpânica. Na superfície da membrana basilar está localizado o órgão de Corti, um epitélio sensorial que contém células ciliadas, eletromecanicamente sensíveis, que transformam as ondas sonoras em impulsos elétricos, em um processo denominado mecanotransdução. Há dois tipos de células ciliadas organizadas em fileiras: uma fileira de células ciliadas internas, que são as principais responsáveis por transmitir o sinal da mecanotransdução até o sistema nervoso central, e três fileiras de células ciliadas externas, as quais amplificam e detectam as diferentes frequências das ondas sonoras na cóclea (Figura 2). As células ciliadas contêm no seu ápice estereocílios, projeções que consistem de um núcleo de actina associada a diversas outras proteínas, cobertas pela membrana da célula (Kazmierczak & Muller, 2012; Yu & Goodrich, 2014).

Cada estereocílio possui em seu interior centenas de filamentos de actina, uniformemente polarizados e dispostos paralelamente. Os filamentos paralelos de actina se conectam lateralmente, por meio de ligações cruzadas, promovidas por outras proteínas como fimbrina, espina (ESPN), fascina e vilina. A estrutura dos estereocílios também é mantida por meio de uma série de outras proteínas. Estereocílios têm a capacidade de manter seu comprimento estável ao longo do tempo, de modo que novos monômeros de actina são constantemente adicionados às pontas dos estereocílios. Os monômeros movem-se em direção à base e são degradados, enquanto novos componentes são adicionados ao ápice. Desse modo, é mantido o comprimento dessas protrusões por um mecanismo que foi apelidado de “esteira rolante”. O controle do comprimento dos estereocílios é desempenhado

por uma densa matriz de proteínas, localizada na extremidade apical do estereocílio, denominada “*tip complex*” ou complexo de ponta. A atividade de várias delas regula a estabilidade dos estereocílios durante sua formação. Proteínas da família das gelsolinas têm a propriedade de inibir a adição de monômeros de actina durante a formação dos estereocílios, enquanto proteínas da família Ena/VASP são vasodilatadoras que estimulam o alongamento de tais protrusões. As interações protéicas no complexo de ponta são numerosas e sofisticadas. Outras proteínas têm papel relevante na regulação do comprimento do estereocílio e entre elas se destacam as miosinas não convencionais. Proteínas motoras, como as miosinas não convencionais, são responsáveis pelo alongamento dos estereocílios em direção ao polo apical, nas extremidades dessas protrusões (Lin et. al., 2005; Sakaguchi et. al., 2009).

Miosinas são proteínas que se caracterizam por se ligarem a filamentos do citoesqueleto por meio de seu domínio motor e utilizar energia derivada da hidrólise de moléculas de ATP para se mover ao longo destes filamentos. Os filamentos aos quais as miosinas se ligam são de actina. As moléculas de miosina consistem de dois componentes principais: cadeia leve e cadeia pesada. De acordo com a classificação realizada por Odronitz & Kollmar no ano de 2007, há 35 diferentes classes de miosina descritas na literatura. Miosinas convencionais são aquelas que formam filamentos ao unirem-se entre si por meio de suas extremidades C-terminais e são representadas pelas miosinas de classe II, presentes no sistema muscular. Miosinas não convencionais são caracterizadas por não formarem filamentos, ao contrário de miosinas convencionais. Com exceção das miosinas de classe II, todas as demais classes de miosinas são consideradas não convencionais (Mermall et. al., 1998; Kalhammer & Bahler, 2000). Várias das miosinas não convencionais descritas na literatura foram relacionadas com perda auditiva, quando os seus genes correspondentes estão mutados. São exemplo as miosinas codificadas pelos genes *MYO6* (OMIM#600970), *MYO15* (OMIM#602666), *MYO7A* (OMIM#276903) e *MYO3A* (OMIM#606808).

Cada célula ciliada contém em seu polo apical um feixe em formato de V de aproximadamente 100 estereocílios distribuídos em fileiras de altura escalonada. As células ciliadas internas e externas são unidas em suas extremidades por ligações de ponta (*tip links*) que unem estereocílios vizinhos (Figura 3). As proteínas que

constituem as *tip links* são as caderinas e protocaderinas, as quais são codificadas pelos genes *CDH23* e *PCDH15*, respectivamente. Tais proteínas participam da organização e estrutura das células ciliadas da cóclea e do sistema fotorreceptor. A interação entre ambas as proteínas constitui a base molecular das ligações de ponta. Mutações nos genes de qualquer uma destas proteínas causam prejuízo à interação entre elas, e, como consequência, as ligações de ponta entre estereocílios adjacentes não são formadas, o que prejudica a mecanotransdução e desencadeia o quadro de perda auditiva. Alterações no gene *CDH23* e *PCDH15* estão relacionadas com a síndrome de Usher, a qual é um conjunto de doenças genéticas caracterizadas por perda auditiva associada a uma degeneração progressiva da retina denominada retinose pigmentar. Além dos genes *CDH23* e *PCDH15*, alterações nos genes *MYO7A* e *USH1C* também estão relacionadas à síndrome de Usher. Foi proposto que a caderina é ancorada nos estereocílios por uma proteína denominada harmonina, a qual é codificada pelo gene *USH1C* (Boeda et. al., 2002). A harmonina também se liga à miosina VIIA e é transportada por esta proteína até as pontas dos estereocílios. Este complexo de proteínas contribui para a estabilidade das ligações de ponta, uma vez que mantêm a caderina devidamente localizada na região entre estereocílios vizinhos e permite sua interação com a protocaderina (Siemens et. al., 2002; Yu et. al., 2017). Mutações nos genes *CDH23*, *PCDH15*, *USH1C* e *MYO7A* também podem causar surdez não sindrômica de herança autossômica recessiva. Mutações no gene *MYO7A* também podem estar relacionadas à surdez não sindrômica de herança autossômica dominante (Verpy et. al., 2000; Ahmed et. al., 2002; Yu et. al., 2017).

As ondas sonoras que entram na janela oval por meio da movimentação do estribo fazem vibrar a membrana basilar. Isto causa a deflexão dos estereocílios contra a membrana tectorial (Figura 2). Esta deflexão funciona como gatilho para a abertura de canais condutores de íons, o que gera o influxo de íons potássio para dentro das células ciliadas. A entrada dos íons potássio a partir da endolinfa modifica o potencial de membrana na célula ciliada, causando despolarização, a qual ativa canais de cálcio na porção basolateral destas células (Figura 3). O influxo de cálcio desencadeia a liberação de neurotransmissores, de modo que as células ciliadas realizam sinapse em sua base com terminações nervosas da cóclea, as quais levam os impulsos ao gânglio espiral de Corti, cujas células neuronais enviam

axônios ao oitavo nervo ou nervo auditivo para múltiplos núcleos no sistema nervoso central e, finalmente, para o córtex auditivo cerebral. Os íons potássio são posteriormente reciclados de volta ao seu local de origem primeiramente por meio de canais de potássio, em direção a células de suporte na base da cóclea. Esse movimento do potássio ocorre através de junções comunicantes entre células adjacentes do tipo *gap*, que são canais permeáveis à passagem de íons e pequenas moléculas. Os íons potássio são transportados através das junções comunicantes até uma região denominada estria vascular, sendo posteriormente reciclados de volta à endolinfa (Willems, 2000; Dror & Avraham, 2010).

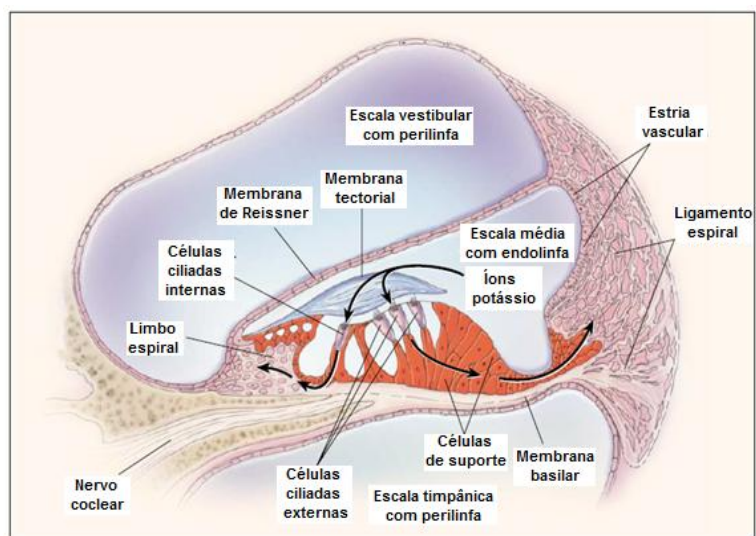


Figura 2: Esquema de um corte transversal da cóclea, indicando as três fileiras de células ciliadas externas e a fileira única de células ciliadas internas. Fonte: Modificado de: (Willems, 2000).

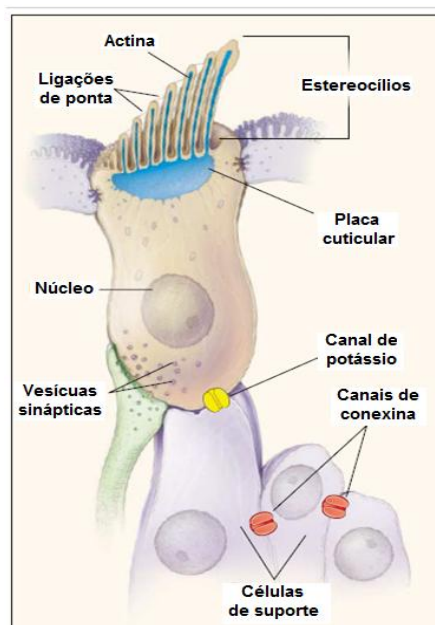


Figura 3: Célula ciliada com seu feixe de estereocílios dispostos em fileira. Fonte: Modificado de: (Willems, 2000).

1.2. Etiologia e epidemiologia das perdas auditivas

Surdez é o termo utilizado para designar perdas auditivas graves e profundas. No entanto, frequentemente a literatura sobre genética utiliza o termo surdez como relacionado a perdas auditivas em geral, independente da gravidade da manifestação. De acordo com o Institute for Quality and Efficiency in Health Care (IQWiG - Germany, 2017), a rigor, o termo perda auditiva é o que costuma ser utilizado para designar limiares de audição acima dos 20 dB considerados normais, que caracterizam perda na capacidade auditiva, independente do grau. Desse modo, na literatura mais recente tem sido preferido utilizar o termo perda auditiva, ao invés de surdez. Ambos os termos serão utilizados de maneira intercambiável nessa dissertação.

A perda auditiva pode ser classificada de acordo com diferentes critérios, como idade de manifestação, lateralidade, simetria, progressão, gravidade, localização ou pela associação com distúrbios otológicos específicos, como a disfunção vestibular e a neuropatia auditiva. Quanto à idade de manifestação, a surdez pode ser pré-lingual, quando se manifesta antes do desenvolvimento da fala ou pós-lingual, quando ocorre depois. Em relação à lateralidade, a surdez pode ser bilateral ao ocorrer em ambas as orelhas e unilateral, quando uma delas é acometida por perda auditiva. A surdez é dita simétrica quando ambas as orelhas apresentam a mesma gravidade de perda de audição, e assimétrica quando uma delas apresenta gravidade maior em relação à outra. A surdez é progressiva ao agravar-se conforme a idade, e estacionária quando a gravidade não se acentua ao longo dos anos. A gravidade da perda auditiva é medida em decibéis (dB), de modo que as perdas auditivas podem ser de grau leve (21-40 dB), moderado (41-70dB), severo (71-90dB) e profundo (acima de 90dB) (Davis & Silvermann, 1970). Quanto aos tipos e à localização do defeito que a originou, a surdez pode ser chamada de condutiva quando decorrente de alterações estruturais na orelha externa que afetam a condução do som; sensorioneural, ao resultar de alterações em células sensoriais da cóclea, no nervo auditivo ou no sistema nervoso central; pode ser chamada de mista, quando decorre de uma combinação de surdez condutiva e sensorioneural. (Smith et. al., 2005; Alford et. al., 2014).

As perdas auditivas são defeitos sensoriais frequentes que afetam cerca de 4% da população mundial, com dois terços dessa parcela vivendo em países

desenvolvidos (Morton & Nance, 2006). Segundo a Organização Mundial da Saúde (WHO, 2018), cerca de 466 milhões de pessoas são afetadas por deficiência auditiva no mundo todo, das quais 34 milhões são crianças. Além disso, segundo estimativas da WHO, cerca de 900 milhões de pessoas serão afetadas por perda auditiva em todo o planeta até o ano de 2050. Também de acordo com esta organização, impactos na comunicação e distúrbios emocionais que levam ao isolamento social são algumas das consequências geradas pela perda auditiva em indivíduos afetados. A surdez é frequente em todas as idades e pode ser geneticamente determinada ou adquirida em consequência de fatores ambientais. Nos EUA, a incidência de perdas auditivas é de aproximadamente 2 a cada 1000 recém-nascidos (Morton & Nance, 2006). Em países desenvolvidos, a contribuição de fatores genéticos para o desenvolvimento de perda auditiva é de 50-60% (Shearer et. al., 2017). A incidência de perda auditiva em países em desenvolvimento é de 6 a cada 1000 nascimentos (Olusanya & Newton, 2007). No Brasil, aproximadamente 9,7 milhões de pessoas são acometidas por deficiência auditiva, em algum grau, segundo o último censo realizado pelo IBGE no ano de 2010, o que equivale a aproximadamente 5% da população brasileira.

Em 1999, foi estimado que 16% dos casos de surdez em uma amostra brasileira eram causados por fatores genéticos, o que corresponderia a uma incidência de 4 a cada 1000 recém-nascidos (Braga et. al., 1999). No entanto, estudos com neonatos sobre a prevalência da surdez no Brasil eram escassos nessa época. Entre o final da década de noventa e início dos anos 2000, um estudo posterior realizado com recém-nascidos no hospital Albert Einstein na cidade de São Paulo revelou uma incidência de perda auditiva em recém-nascidos em torno de 2,4 a cada 1000 nascimentos (Chapchap & Segre, 2001). Um estudo mais recente de triagem auditiva neonatal na cidade de São Paulo revelou que a prevalência de perda auditiva em recém-nascidos na cidade é de 1 a cada 2000 nascimentos (Manzoni et. al., 2016). É provável que a prevalência de perda auditiva tenha se modificado nas últimas duas décadas. Melhorias nas condições socioeconômicas em determinadas regiões, como as do norte e nordeste do país, levaram a uma estimativa posterior de incidência de 2,5 a cada 1000 recém-nascidos nestes locais (Bevilacqua et. al., 2010).

Casos em que a surdez é devida a fatores ambientais correspondem a cerca de 20% dos casos em países desenvolvidos (Shearer et. al., 2017). Em crianças e neonatos, os casos de surdez ambientais podem ser exemplificados como os resultantes da prematuridade, hiperbilirrubinemia ou decorrentes de infecções pré-natais, como a rubéola, o citomegalovírus e a toxoplasmose. O sarampo, a caxumba e a meningite são exemplos de infecções pós-natais que também são responsáveis pela perda auditiva em recém-nascidos e crianças, assim como a exposição a medicamentos ototóxicos. Em países desenvolvidos, como os EUA, infecções congênitas por citomegalovírus (CMV) são a causa mais frequente de perda auditiva pré-lingual em neonatos. A incidência dessa infecção ao nascimento é de 0,64%. Dentre os recém-nascidos com a infecção, foi estimado que até 15% podem exibir perda auditiva (Smith et. al., 2005; Morton & Nance, 2006; Shearer et. al., 2017). No entanto, pouco se sabe sobre a incidência de CMV em países em desenvolvimento. A prevalência varia com a idade materna e questões socioeconômicas. Cerca de 90% dos neonatos com infecção por CMV não apresentam características distintivas da infecção ao nascimento. Logo, em muitos casos, não é óbvio relacionar a perda auditiva nos recém-nascidos com a infecção pelo vírus, o que torna o diagnóstico difícil de ser realizado (Morton & Nance, 2006; Shearer et. al., 2017). Há protocolos experimentais de aplicação de medicamentos antivirais para o tratamento de surdez em pacientes com CMVs, o que reforça a importância do diagnóstico precoce da doença em recém-nascidos (Kimberlin et. al., 2015).

Casos de perdas auditivas relacionadas a fatores ambientais em adultos podem ser exemplificados pelos decorrentes da idade avançada e da exposição a ruídos de forte intensidade. No entanto, não se deve desconsiderar a contribuição de fatores genéticos em conjunto com fatores ambientais para a manifestação da perda auditiva, em decorrência da exposição a ruídos (Abreu-Silva et. al., 2011). Embora seja aparente a relação entre fatores genéticos e ambientais na manifestação de surdez, poucos genes foram relacionados a tal interação (Yamasoba et. al., 2013).

A interação entre genes e fatores ambientais pode desencadear perdas auditivas, especialmente de início tardio. A exposição a medicamentos ototóxicos pertencentes à família dos aminoglicosídeos, como a estreptomicina e a gentamicina, pode causar surdez a depender da dose e da duração do tratamento. No entanto, em uma fração dos indivíduos que perde a audição após tratamento

com os aminoglicosídeos, a perda pode estar relacionada à susceptibilidade aumentada em virtude de alterações genéticas, conforme explicado na seção 1.3.

1.3. Genética das perdas auditivas

Aproximadamente 50-60% dos casos de surdez pré-lingual identificados em países desenvolvidos possuem base genética, cuja manifestação clínica pode ser sindrômica ou não sindrômica (Shearer et. al., 2017). A surdez sindrômica ocorre associada a outros sinais e sintomas, como malformações na orelha externa ou defeitos em outros órgãos ou sistemas (Smith et. al., 2005). Cerca de 30% dos casos de surdez pré-lingual são sindrômicos e cerca de 400 síndromes foram relacionadas à perda auditiva até o presente momento (Toriello et. al., 2016). No entanto, os casos de surdez sindrômica explicam uma pequena fração dos casos de perda auditiva quando comparadas aos casos de surdez não sindrômica, que correspondem a 70% dos casos (Marazita et. al., 1993). Em grande parte dos casos de perda auditiva sindrômica, há variabilidade fenotípica e na idade de manifestação nos indivíduos acometidos pelas síndromes (Alford et. al., 2014).

A surdez sindrômica de herança autossômica dominante tem como exemplos as síndromes do Espectro Branquio-Otorrenal e a Síndrome de Waardenburg, a qual é o tipo mais comum de surdez sindrômica de herança dominante. Exemplos de surdez sindrômica de herança autossômica recessiva são as síndromes de Pendred, Alport e Usher, essa última correspondendo ao tipo mais comum de surdez sindrômica de herança recessiva (Shearer et. al., 2017).

A surdez não sindrômica corresponde a aproximadamente 70% dos casos e é também chamada de isolada, pois não está associada a outros sinais clínicos que caracterizam síndromes específicas (Shearer et. al., 2017). Até o presente momento, existem 119 genes já relacionados à perda auditiva não sindrômica e estima-se que cerca de 6000 mutações causativas diferentes já foram descritas (<https://deafnessvariation-database.org>).

A enorme gama de genes expressos no aparelho auditivo resulta em uma complexa rede que contém diversas estruturas, tipos celulares e proteínas que atuam em conjunto na percepção das ondas sonoras (Morton & Nance, 2006). A heterogeneidade genética da perda auditiva pode ser explicada pelas complexas interações entre a orelha interna e o sistema nervoso central, de modo que qualquer

defeito nesta complexa rede de interações no sistema auditivo pode levar a distúrbios como a surdez (Gao & Dai, 2014).

A surdez não sindrômica exibe enorme heterogeneidade genética em diversos níveis: 1) heterogeneidade de mecanismos de transmissão, 2) heterogeneidade de loci, 3) heterogeneidade alélica e de 4) manifestação clínica.

Quando a perda auditiva é hereditária, há heterogeneidade de mecanismos de transmissão do distúrbio. Nestes casos, a surdez pode ser de herança autossômica dominante ou recessiva, ligada ao cromossomo X, ligada ao cromossomo Y ou mitocondrial.

A heterogeneidade de loci é tão notável que quatro siglas foram criadas, derivadas da sigla DFN (do inglês DeaFNness), para numerar e designar os loci das diferentes formas de transmissão da surdez não sindrômica. Loci mapeados relacionados à herança autossômica dominante são denominados DFNA e os loci com transmissão autossômica recessiva são denominados DFNB. Em relação à herança ligada ao X, os loci são denominados DFNX. DFNM é a sigla usada para designar outros genes com papel de modificadores da expressão fenotípica de outros genes conhecidos como causadores de perda auditiva (Shearer et. al., 2017; <https://www.hereditaryhearingloss.org>).

A perda auditiva de herança autossômica recessiva corresponde a cerca de 80% dos casos, sendo de modo geral sensorineural, estacionária, pré-lingual, de severa a profunda (Campbell et. al., 1997; Smith et. al., 2005). Mutações de perda de função são a principal causa de surdez de herança autossômica recessiva (Hilgert et. al., 2009). A maior parte das mutações responsáveis pelo quadro de surdez de herança autossômica recessiva encontra-se nos genes *GJB2* e *GJB6*. Até o momento, existem 93 loci mapeados e 76 genes identificados para perda auditiva de herança autossômica recessiva (<http://www.hereditaryhearingloss.org>).

O locus DFNB1 contém o gene *GJB2* e o gene *GJB6*. Além da cóclea, o gene *GJB2* também é expresso na pele, fígado, glândula tireóide, paratireóide, glândulas mamárias, glândulas salivares útero, testículo, pâncreas e pulmões (<https://www.proteinatlas.org/>). Nesse gene se encontram cerca de 50% das mutações responsáveis por surdez não sindrômica de herança autossômica recessiva (Kelsell et. al., 1997; Denoyelle et. al., 1999). O produto deste gene é a conexina 26, uma proteína transmembrânica que constitui as junções do tipo *gap*.

Ela se organiza em hexâmeros e é expressa em células de suporte e dos tecidos conjuntivos na cóclea. Os hexâmeros de conexinas de células adjacentes se unem e formam os conexons, que podem ser homotípicos quando formados por dois conexons idênticos ou heterotípicos, quando formados por dois conexons distintos (Bruzzone et. al., 1996). O gene *GJB6* codifica a conexina 30, que também é constituinte de conexons. Tal gene também é expresso na cóclea (Dahl et. al., 1996; Lautermann et. al., 1998).

A frequência de variantes patogênicas no gene *GJB2* varia entre populações. A mutação c.35delG é a mais frequente e corresponde a 70-80% de todas as mutações que ocorrem no gene *GJB2*, sendo mais comum em caucasianos (Zelante et. al., 1997; Denoyelle et. al., 1997; Green et. al., 1999). A mutação c.235delC é a mais comum em asiáticos, especialmente no Japão (Abe et. al., 2000). A variante c.167delT é a mais frequente em judeus Asquenazes (Morell et. al., 1998).

Embora a surdez pré-lingual de herança autossômica recessiva seja a forma mais comum de perda auditiva relacionada a mutações no gene *GJB2*, há casos de surdez pós-lingual descritos na literatura (Snoeckx et. al., 2005, Gandía et. al., 2013), e também de perda auditiva congênita não sindrômica de herança autossômica dominante em afetados com mutações neste gene (Rabionet et. al., 2006), além de mutações de herança dominante que são responsáveis por perda auditiva associada a problema de pele, como o queratoderma pigmentar (Richard et. al., 2002). O fenótipo causado por mutações no gene *GJB2* mais comumente encontrado entre os afetados na população é de surdez sensorineural, congênita, bilateral, não progressiva e de grau severo a profundo. No entanto, defeitos nesta proteína também estão relacionados com enorme variabilidade fenotípica, que abrange desde surdez de grau leve e moderado até profundo (Denoyelle et. al., 1999).

Casos de perda auditiva no locus DFNB1 também podem ocorrer devido a mutações que envolvem o gene *GJB6*. A alteração mais comum relacionada à surdez no gene *GJB6* é uma deleção de 342kb (D13S1830) que pode contribuir com a perda auditiva em conjunto com mutações no gene *GJB2* (del Castillo et. al., 2002). No mesmo ano, uma deleção de 150kb (DS13S175) relacionada à perda auditiva neste gene foi identificada (Pallares-Ruiz et. al., 2002). Posteriormente, outra deleção foi encontrada no gene *GJB6* (DS13S1854), a qual tem 232kb e

também atua em conjunto com mutações no gene *GJB2* desencadeando o fenótipo de surdez (del Castillo et. al., 2005). Os produtos destes dois genes de conexinas interagem para a formação de canais heterotípicos que contribuem para a homeostase coclear (Zhao et. al., 2006). Indivíduos que têm mutação somente em um dos alelos do gene *GJB2* podem manifestar perda auditiva se essa alteração estiver combinada (em trans) com deleções que compreendem o gene *GJB6* vizinho. Contudo, a hipótese de herança digênica como causa de surdez de herança recessiva inicialmente postulada foi descartada, pois se observou que as deleções descritas atingem regiões reguladoras do gene *GJB2*, reduzindo sua expressão (Rodriguez-Paris & Schrijver, 2009; Rodriguez-Paris et. al., 2011). No entanto, foi recentemente postulado que variantes em heterozigose em outros genes relacionados à perda auditiva, como o *MITF* e o *GJB3* também poderiam causar surdez recessiva em conjunto com mutações no gene *GJB2* (Kim et. al., 2016), o que traria o retorno da hipótese de herança digênica compreendendo genes codificadores de conexinas e outros genes relacionados à perda auditiva.

Foi proposto que mutações no gene *GJB2* levam à perda auditiva porque alteram a reciclagem de íons potássio de volta à endolinfa (Kikuchi et. al., 1995; Kelsell et. al., 1997; Rabionet et. al., 2000). No entanto, estudos funcionais com camundongos demonstraram que a reciclagem de íons potássio não é o principal fator responsável pela perda de audição, sugerindo que outros mecanismos podem levar à perda auditiva (Chen et. al., 2014; Zhu et. al., 2015). Em determinados casos, é provável que mutações no gene *GJB2* resultem em prejuízo do desenvolvimento coclear, como demonstrado em camundongos *knockout* para o gene *GJB2*. A ausência do gene *GJB2* nestes camundongos, após quatro dias do seu nascimento, promoveu a perda da mobilidade da membrana tectorial e consequente perda da mecanotransdução, causando prejuízo na audição. Foi observado que deleções no gene *GJB2* nos primeiros dias de vida de camundongos alteram a permeabilidade da conexina 26 a íons e pequenas moléculas. Em outros casos, a perda auditiva causada por mutações no gene *GJB2* pode ser resultado da ausência de motilidade das células ciliadas externas da cóclea (OHCs), como também demonstrado em camundongos *knockout* para o gene (Zhu et. al., 2015; Zhao, 2017).

A surdez de herança autossômica dominante compreende 20% dos casos de deficiência auditiva. A maior parte dos casos de perdas auditivas não sindrômicas de

herança autossômica dominante são sensorineurais, progressivas e pós-linguais, com exceção dos genes *GJB2* e *GJB6* (DFNA3), do locus DFNA19 e do gene *TECTA* (DFNA8/12), que apresentam casos pré-linguais de surdez de herança dominante. As alterações genéticas responsáveis pela surdez não sindrômica de herança dominante são geralmente causadas por haploinsuficiência, efeito dominante negativo ou mutações de ganho de função (Hilgert et. al., 2009). Ao contrário da surdez de herança autossômica recessiva, cuja maioria dos casos ocorre devido a mutações nos genes *GJB2* e *GJB6*, variantes causativas de perdas auditivas de herança autossômica dominante ocorrem em uma variedade de genes, de modo que não há predominância de mutações em um único gene (Zanchetta et. al., 2000; Shearer et. al., 2017). A perda auditiva de herança autossômica dominante já teve 67 loci mapeados e 47 genes identificados (<http://www.hereditaryhearingloss.org>).

A perda auditiva ligada ao cromossomo X ocorre em pouco mais de 2% dos casos. Seis loci e cinco genes foram identificados até o presente momento para perdas auditivas ligadas ao cromossomo X (<https://www.hereditaryhearingloss.org>). O gene mais comumente associado à surdez ligada ao cromossomo X é o *POU3F4*, o qual codifica um fator de transcrição e está situado no loco DFN3 (DFNX2) (Douville et. al., 1994; de Kok et. al., 1995). Tal gene contém cerca de 30 mutações já descritas responsáveis pela perda auditiva com herança ligada ao cromossomo X (<http://deafnessvariationdatabase.org>). Afetados com mutações no gene *POUF34* apresentam uma conexão indevida entre o canal auditivo interno e a base da cóclea. Indivíduos que passam por cirurgia no estribo sofrem vazamento na perilinfa e consequente perda auditiva e problemas vestibulares (de Kok et. al., 1995; Song et. al., 2010).

A surdez de herança mitocondrial ocorre em cerca de 1 a 2% dos casos de perda auditiva hereditária. Casos de perda auditiva de herança mitocondrial geralmente são progressivos, pós-linguais e sensorineurais (Prezant et. al., 1993; Reid et. al., 1994), e apresentam variabilidade de penetrância, gravidade e idade de manifestação. Interações com genes modificadores nucleares e mitocondriais, além de fatores ambientais como a exposição a aminoglicosídeos contribuem com tal variabilidade (Tang et. al., 2007). Até o momento foram identificados 3 genes relacionados a este modo de herança de perda auditiva não sindrômica (Smith et.

al., 2005; <http://deafnessvariation-database.org>). A mutação m.A1555G é a mais frequente e foi a primeira a ser identificada, ocorrendo no gene *MTRNR1* (Prezant et. al., 1993). O produto desse gene é uma molécula de RNA, que constitui a subunidade 12S do RNA ribossômico mitocondrial. A mutação m.1555A>G altera o RNAr em sítios que interagem com o RNA transportador e tem potencial para afetar a tradução eficiente dos RNA mensageiros na mitocôndria. Este fato pode estar relacionado à morte das células ciliadas da cóclea (Prezant et. al., 1993).

Todavia, a manifestação da perda auditiva ocorre mais precocemente em indivíduos com a mutação m.1555A>G que receberam tratamento com medicamentos ototóxicos, como aminoglicosídeos. O fenótipo causado pela administração de aminoglicosídeos é geralmente de surdez bilateral de grave a profunda com manifestação precoce, normalmente poucos dias após a administração dos antibióticos (Prezant et. al., 1993; Estivill et. al., 1998). Os aminoglicosídeos afetam a fidelidade da tradução nas bactérias, pois se ligam a uma região conservada do RNA ribossômico. Supõe-se que a mutação m.1555A>G torna a estrutura do RNAr mitocondrial mais similar à estrutura do ribossomo bacteriano, resultando em maior afinidade pelos aminoglicosídeos e ampliando os efeitos desses antibióticos sobre a fidelidade da tradução que ocorre na mitocôndria (Lynch & Puglisi, 2001).

A perda auditiva de herança ligada ao cromossomo Y foi averiguada em apenas uma família, localizada na China, porém o gene nunca foi identificado (Wang et. al., 2004).

Após décadas de pesquisas que culminaram com a identificação de 119 genes e milhares de mutações, foram observados fenômenos genéticos muito curiosos relacionados à perda auditiva: alterações em um mesmo gene podem levar a surdez síndrômica ou não síndrômica, como no caso do gene *SLC26A4*. Tal gene está relacionado com a Síndrome de Pendred, um tipo de surdez síndrômica de herança autossômica recessiva que é caracterizada pelo desenvolvimento anormal da cóclea, perda auditiva sensorineural e aumento anormal da glândula tireóide (bócio) (Everett et. al., 1997). Mutações no gene *SLC26A4* também estão relacionadas ao aqueduto vestibular alargado (EVA) não síndrômico de herança autossômica recessiva e a diversas outras malformações na orelha interna (DFNB4) (Li et. al., 1998), sendo o segundo gene com o maior número de casos relacionados

à surdez (Albert et. al., 2006), atrás apenas do gene *GJB2* (Denoyelle et. al., 1997); alterações em um mesmo gene podem levar à surdez de herança recessiva ou dominante, como no caso dos genes *GJB2* (DFNB e DFNA1A), *GJB6* (DFNB1B e DFNA3B) e *TECTA* (DFNA1 e DFNA8). O gene *TECTA* codifica uma proteína que compõe a membrana tectorial no órgão de Corti, sendo importante para a transdução de sinal do estímulo sonoro na orelha interna (Legan et. al., 1997); as mesmas mutações podem levar a quadros com idade de manifestação, progressão e gravidade distintas em famílias diferentes. Todos estes exemplos de heterogeneidade na origem da perda auditiva trazem muita complexidade à análise e à interpretação de resultados de testes moleculares.

1.4. Genes de miosinas e perda auditiva hereditária

Conforme anteriormente mencionado, diversos genes de miosinas não convencionais foram relacionados com perda auditiva hereditária, vários deles com mutações que se caracterizam por transmissão característica da herança autossômica dominante.

O gene *MYO15* codifica uma miosina não convencional, e o gene humano foi clonado pela primeira vez em humanos por Liang et. al. (1999). Neste trabalho, foi identificado o locus DFNB3, ao estudarem uma família asiática com perda auditiva de herança autossômica recessiva (Wang et. al., 1998). O produto do gene localiza-se nas pontas dos estereocílios das células ciliadas da cóclea. Foi proposto que sua função no sistema auditivo é a de manutenção da estrutura e função das protruções de actina, de modo que mutações neste gene provocam diminuição do comprimento dos estereocílios a aproximadamente um terço de seu tamanho original na linhagem de camundongos *shaker-2*. Como consequência deste encurtamento, a transdução do sinal das ondas sonoras em estímulos elétricos ao sistema nervoso é prejudicada nestes organismos modelo (Probst et. al., 1998). Além disso, o transporte de carga realizado pela miosina XVA até as pontas dos estereocílios é fundamental para a morfogênese das células ciliadas da cóclea (Belyantseva et. al., 2005).

O gene humano *MYO6* codifica uma miosina não convencional e foi clonado por Avraham et. al. (1997). Mutações neste gene foram relacionadas pela primeira vez à surdez em humanos por Melchionda et. al. (2001), os quais atribuíram o gene *MYO6* ao locus DFNA22 ao estudar uma família com perda auditiva de herança autossômica dominante. O gene *MYO6* é expresso nas células ciliadas da cóclea,

mais especificamente na região da placa cuticular situada na base dos estereocílios. O estudo com a linhagem de camundongos *Snell's waltzer* (*ksv*), cuja deficiência auditiva ocorre devido a uma mutação no gene *MYO6*, demonstrou a importância deste gene para a audição. No sistema auditivo, a função proposta para a miosina classe VI é a de auxílio no ancoramento dos estereocílios na placa cuticular das células ciliadas da cóclea, de modo que o rompimento de filamentos de actina na porção basal dos estereocílios provoca a fusão destas protruções e causa perda auditiva (Steel & Brown, 1994; Avraham et. al., 1995). No entanto, estudos recentes em camundongos *ksv/ksv* demonstraram que alterações no gene *MYO6* também levam ao rompimento de filamentos actina na porção apical dos estereocílios. Embora neste caso a região da placa cuticular se mantenha estável, a fusão dos estereocílios também ocorre, o que leva como consequência à perda auditiva nestes animais (Seki et. al., 2017).

O gene *MYO7A* codifica uma miosina não convencional e foi identificado pela primeira vez, por meio de clonagem posicional, em uma região cromossômica que está associada à ocorrência da síndrome de Usher tipo B, de herança autossômica recessiva, no braço longo do cromossomo 11 (Weil et. al., 1995). Tal gene é expresso no epitélio pigmentar e nas células fotorreceptoras da retina, além de também ser expresso no neuroepitélio vestibular e coclear embrionário humano (Weil et. al., 1996). No sistema auditivo, a proteína se localiza na região que une estereocílios adjacentes e está relacionada com transporte de carga em direção à extremidade apical dos estereocílios, como é o caso da proteína USH1, que é transportada pela miosina VIIA até as pontas destes filamentos de actina nas células ciliadas da cóclea (Boeda et. al., 2002). Foi proposto que tal proteína contribui com a manutenção e a estrutura dos estereocílios, além de participar da mecanotransdução ao contribuir com o tensionamento das ligações de ponta (*tip links*) que unem os estereocílios e, deste modo, permite a entrada de íons potássio nas células ciliadas da cóclea (Hasson et. al., 1997; Self et. al., 1998). A ausência de miosina VIIA na linhagem de camundongos *shaker-1* prejudica a localização de proteínas componentes das ligações de ponta (*tip links*), como a protocaderina 15 (PCDH15) e a harmonina (USH1C), causando, desta forma, perda auditiva não sindrômica ou associada à retinose pigmentar (Gibson et. al., 1995; Boeda et. al., 2002; Yu et. al., 2017).

Miosinas da classe III são miosinas não convencionais caracterizadas por possuírem um domínio quinase N-terminal (Montell & Rubin, 1988). Duas isoformas compõem esta classe de miosinas: miosina IIIA e miosina IIIB. Ambas diferem pela ausência, na miosina IIIB, de um segundo domínio de ligação à actina (THDII), o qual contribui para a localização da miosina IIIA nas pontas dos estereocílios (Dosé & Burnside, 2002; Les Erickson et. al., 2003).

A primeira miosina de classe III foi isolada em *Drosophila melanogaster* por Pak, (1979). Mutações no gene que codifica a miosina de classe III foram relacionadas com alterações na resposta fotorreceptora seguida por degeneração da retina em *Drosophila* (Porter & Montell, 1993). Em 1996, Hillman et. al. isolaram a primeira proteína desta classe em vertebrados, no peixe *Morone saxatilis* (Hillman et. al., 1996). No ano 2000, Dosé & Burnside isolaram a primeira miosina classe III a partir da retina humana, sendo denominada miosina IIIA (*MYO3A*). Foi verificado posteriormente que mutações no gene *MYO3A* também são responsáveis por alterações na resposta fotorreceptora em vertebrados, como no caso de *Morone saxatilis*, e, portanto, tais alterações são potenciais candidatas a causarem degeneração da retina em humanos (Dosé et. al., 2003).

No ano de 2002, Walsh et. al. identificaram, por meio de estudo de ligação seguido de sequenciamento de Sanger, três mutações no domínio motor da proteína *MYO3A*, as quais estavam presentes em uma família de origem judaica com surdez não sindrômica de herança autossômica recessiva. Todas as três mutações estavam situadas no mesmo locus, o qual foi denominado DFNB30. Este foi o primeiro trabalho a identificar mutações no gene *MYO3A* responsáveis por perda auditiva. Uma provável explicação para a visão normal dos indivíduos com perda auditiva desta família foi uma possível compensação de expressão de outras classes de miosina na retina, como a miosina IIIB (Walsh et. al., 2002). Uma possível explicação para a ausência de disfunções vestibulares nos indivíduos afetados desta família é o fato de as células ciliadas da cóclea conterem mais estereocílios do que as células sensoriais do sistema vestibular. Logo, mutações em proteínas que mantêm a estabilidade dos estereocílios das células ciliadas da cóclea terão maior probabilidade de causar prejuízo ao sistema auditivo em relação ao sistema vestibular (Lim, 1986; Johnson et. al., 2010).

Foi demonstrado em um estudo com camundongos que a miosina IIIA localiza-se nas pontas dos estereocílios das células ciliadas da cóclea. Tal proteína também está localizada nas pontas dos estereocílios das células do sistema vestibular e do sistema fotorreceptor (Dosé et. al., 2002; Mecklenburg et. al., 2015). Foi demonstrado que a *MYO3A* promove o alongamento dos estereocílios e que o comprimento destas protrusões é regulado no processo. O domínio quinase N-terminal da miosina IIIA tem a propriedade de regular a atividade motora da própria proteína. A fosforilação do domínio motor pelo domínio quinase N-terminal regula o alongamento de filamentos de actina tanto nos estereocílios das células dos sistemas auditivo e vestibular quanto nas microvilosidades das células da retina, de modo a não permitir seu crescimento em excesso, o que evita o abaulamento destas protrusões e a consequente alteração da morfologia da porção apical das células sensoriais em que tais filamentos estão inseridos (Ng et. al., 1996; Komaba et. al., 2003; Dosé et. al., 2008). O alongamento dos estereocílios das células ciliadas da cóclea é aperfeiçoado por meio da interação entre o domínio 3THDI da miosina IIIA e o domínio WH26 da proteína ESPN1, a qual pertence à família de proteínas ESPN. A proteína ESPN1 contribui para a coesão dos filamentos de actina na manutenção da estrutura dos estereocílios (Salles et. al., 2009).

Um estudo funcional realizado com uma linhagem de camundongos buscou avaliar o impacto de uma das mutações descritas por Walsh et. al. (2002), a qual causa surdez de herança autossômica recessiva. Esse estudo revelou que a mutação c.3126T>G p.Tyr1042Ter está relacionada com perda auditiva progressiva, semelhante à do loco DFNB30, com degeneração das células ciliadas externas da cóclea ao longo da idade, mais especificamente por volta dos 10 meses (Walsh et. al., 2011).

Desde o trabalho de Walsh et. al. (2002), somente mutações no gene *MYO3A*, responsáveis por surdez de herança autossômica recessiva haviam sido descritas na literatura, até a publicação do trabalho de Grati et. al. (2016), o qual identificaram em uma família de origem Afro-americana a mutação c.1463G>A p.Gly488Glu no gene *MYO3A*. Esta foi a primeira mutação no gene *MYO3A* relatada na literatura como relacionada à perda auditiva de herança autossômica dominante. Este estudo também demonstrou, por meio de estudo funcional *in vitro*, uma

possível interação entre a miosina IIIA e a protocaderina 15, de modo que esta proteína transporta a miosina IIIA até a ponta dos estereocílios (Grati et. al., 2016).

A segunda mutação associada à surdez de herança dominante foi descrita por Dantas (2013), em sua tese de doutorado, que identificou a mutação c. 2090T>G p.Leu697Trp no gene *MYO3A* em uma família brasileira estudada em nosso laboratório, a qual apresentava perda auditiva progressiva de herança autossômica dominante com início entre a segunda e a terceira década de vida. A detecção da mesma mutação em uma segunda família (presente estudo), e o estudo funcional realizado em colaboração com o Dr. Bechara Kachar (National Institute of Health, Bethesda, USA) resultaram na publicação de Dantas et. al. (2018). Os estudos funcionais consistiram, entre outros experimentos, de análise da velocidade de deslizamento da actina sobre a miosina IIIA mutada, imobilizada em lâminas. A conclusão desse experimento é que a velocidade de deslizamento era reduzida em comparação com a miosina IIIA selvagem. A alteração aparentemente aumenta a afinidade entre a actina e a *MYO3A* mutada. Utilizando-se células COS7, as quais são células semelhantes a fibroblastos derivadas de rins de macacos, observou-se redução das atividades de iniciação da formação e de alongamento dos filopódios nas células nas quais a proteína mutada foi superexpressa. Estudos similares também foram realizados em células ciliadas do aparelho vestibular e auditivo de camundongos, que foram transfectadas com construções que expressavam as proteínas selvagem e mutada. Essas análises revelaram aumento da concentração e do tempo de permanência da proteína mutada nas extremidades dos estereocílios, deslocando a proteína selvagem. Esses e outros achados do estudo levaram os autores a postular que o mecanismo molecular que leva à herança dominante da perda auditiva nas famílias com a mutação c.2090T>G p.Leu697Trp no gene *MYO3A* é o efeito dominante negativo.

1.5. Diagnóstico molecular das perdas auditivas e o sequenciamento de nova geração

A identificação dos genes relacionados à manifestação da perda auditiva é um desafio para os pesquisadores em genética humana. Conforme já explicado, isso ocorre devido à enorme heterogeneidade genética do distúrbio. O diagnóstico clínico de perda auditiva ocorre por meio da triagem auditiva de recém-nascidos na maioria dos países industrializados. Tal metodologia reconhece com eficácia a surdez

congenita antes do primeiro mês de nascimento da criança afetada. Exames físicos do sistema auditivo acompanham estas triagens para verificar a presença ou ausência de características relacionadas à surdez sindrômica. Em caso negativo, testes genéticos são conduzidos para proceder à investigação da causa da perda auditiva (Van Camp et. al., 1997; Smith et. al., 2005; Hilgert et. al., 2009).

De acordo com o American College of Medical Genetics and Genomics (ACMG, 2014), testes genéticos são recomendados precocemente após o nascimento, assim que confirmado o diagnóstico clínico de perda auditiva. O diagnóstico da causa genética de perda auditiva pode ser facilitado por meio de características fenotípicas relacionadas a determinados genes relacionados à surdez. Como exemplo, testes genéticos que incluem a triagem de mutações no loco DFNB1 são comumente realizados devido à alta frequência de mutações no gene *GJB2*, e de mutações no gene *GJB6*. Os genes *WFS1* e *TECTA* estão relacionados a características clínicas específicas que podem resultar em um diagnóstico mais rápido de perda auditiva. Mutações no gene *WFS1* estão relacionadas à surdez de baixa frequência. Mutações neste gene também estão relacionadas com a Síndrome de Wolfram. Variantes causativas de perda auditiva no gene *TECTA* resultam em surdez progressiva moderada ou grave dependendo da idade dos pacientes. Além disso, variantes neste gene estão relacionadas à perda auditiva com diferentes frequências. A peculiaridade em relação ao gene *TECTA* está relacionada ao domínio da proteína alfa-tectorina que está alterado. Por exemplo, mutações em domínios ricos em cisteína promovem surdez de alta frequência, enquanto mutações em domínios ricos em glicoproteínas estão relacionadas à perda auditiva de baixa frequência. Em casos de surdez de manifestação progressiva ou relacionada a bócio, aqueduto vestibular alargado (EVA) ou displasia de Mondini, mutações no gene *SLC26A4* são candidatas a causarem o fenótipo e o sequenciamento deste gene é recomendado. Genes mitocondriais, como o *MT-RNR1*, também podem ser suspeitas como causa de perda auditiva em casos de herança de origem materna da mutação ou de administração de aminoglicosídeos (Hilgert et. al., 2009; Alford et. al., 2014).

O estabelecimento de um diagnóstico de perda auditiva genética é importante na medida em que proporciona um maior conhecimento aos pais da criança

diagnosticada com perda auditiva quanto às causas do distúrbio, além de auxiliar a aliviar a culpa e a ansiedade dos progenitores (Gilliver et. al., 2013).

A técnica de sequenciamento de DNA de Sanger, descrita pela primeira vez em 1977, foi o procedimento padrão dos estudos genéticos e dos diagnósticos moleculares das doenças genéticas por mais de 30 anos (Sanger et. al., 1977). A introdução da reação em cadeia da polimerase (PCR) em 1983 proporcionou uma maior implementação da técnica de Sanger nas pesquisas científicas, a qual foi responsável pelo sequenciamento do genoma humano, completado no ano de 2003 (Yan et. al., 2013). Em relação ao diagnóstico de perda auditiva, o sequenciamento de Sanger é eficaz para o sequenciamento de um conjunto específico de genes (Hoppman et. al., 2013; Sloan Heggen & Smith, 2016). No entanto, a técnica de Sanger torna-se ineficiente se for necessário o sequenciamento de um conjunto mais abrangente de genes relacionados à perda auditiva, em virtude do elevado custo e do tempo de análise. Esses fatores dificultam o diagnóstico de distúrbios geneticamente heterogêneos como a surdez (Shearer & Smith, 2015).

Após a conclusão do projeto do genoma humano, a necessidade de técnicas de baixo custo, maior abrangência, menor tempo de sequenciamento para diagnósticos genéticos e com maior possibilidade de identificação de novos genes relacionados à perda auditiva levou ao desenvolvimento do sequenciamento massivo em paralelo (*massive parallel sequencing* - MPS) ou sequenciamento de nova geração (*next-generation sequencing* - NGS). Este novo conjunto de técnicas permite o sequenciamento de exomas e genomas individuais em poucas horas, e por um menor custo em relação às técnicas tradicionais. Embora existam várias plataformas de sequenciamento de nova geração, todas elas têm em comum a capacidade de sequenciar milhões de pequenos fragmentos de DNA paralelamente, com alta cobertura das regiões sequenciadas (Shearer et. al., 2011; Slatko et. al., 2018). As principais plataformas de MPS são a *Ion Torrent* (Thermo Fisher) e a *Illumina*, a qual é a plataforma mais utilizada (Yohe & Thyagarajan, 2017). O surgimento do NGS permitiu maiores possibilidades de diagnóstico de distúrbios geneticamente heterogêneos como a surdez, uma vez que tornou possível a triagem de vários genes relacionados a perdas auditivas em uma única análise (Shearer & Smith, 2015).

O princípio subjacente a tecnologias pós-Sanger, como o NGS, consiste em utilizar amostras de DNA fragmentadas oriundas de bibliotecas que são capturadas de tal modo que determinadas regiões de interesse destas amostras são o alvo da captura. Milhares destas regiões são sequenciadas paralelamente em uma simples corrida, de modo que cada região gera uma leitura de sequência curta ou *read*. É necessário obter grande cobertura de cada região para assegurar a qualidade do sequenciamento e para garantir a análise de todo o conteúdo alélico das amostras (Slatko et. al., 2018). Os dados oriundos do sequenciamento são analisados de modo a garantir sua interpretação dentro do contexto biológico, de modo que a última etapa da análise bioinformática das sequências produzidas pelo NGS é a criação de arquivos denominados *variant call format* (VCF), os quais contem informações sobre as variantes identificadas em relação a um genoma de referência, tais como frequência em bancos de dados genômicos e previsão de patogenicidade de acordo com pacotes computacionais (Magi et. al., 2010; De Leng et. al., 2016).

As plataformas de sequenciamento de nova geração têm sido muito utilizadas para a descoberta de novos genes causadores de distúrbios com heterogeneidade genética, como é o caso da surdez. O sequenciamento de nova geração pode identificar os genes associados a estes distúrbios por meio do sequenciamento de amostras de um ou poucos indivíduos de uma família, o que pode dispensar estudos de mapeamento realizados com marcadores moleculares utilizando amostras de vários indivíduos afetados de uma mesma família. Isto diminui o custo e otimiza o tempo de duração de um projeto de descoberta de genes (Walsh et. al., 2010). As diferentes plataformas de sequenciamento de nova geração identificam as bases moleculares subjacentes às doenças genéticas por meio de três principais tipos de diferentes metodologias: sequenciamento do genoma completo, sequenciamento do exoma completo e sequenciamento de um painel de genes selecionados (Gao & Dai, 2014).

O sequenciamento do genoma completo (WGS), embora seja útil para identificar variantes de doenças raras e para o diagnóstico de possíveis doenças monogênicas, não é aplicado de rotina para a identificação de genes relacionados com surdez, especialmente em casos de perda auditiva não sindrômica. Os altos custos para a implementação da técnica, a falta de padronização de protocolos, a dificuldade de interpretação dos resultados, além da necessidade de um maior

controle de qualidade das variantes obtidas são alguns dos obstáculos para a aplicação desta estratégia no diagnóstico de surdez (Moore et. al., 2011; Saunders et. al., 2012; Posey, 2019).

O sequenciamento do exoma completo (WES) é uma abordagem intermediária entre o sequenciamento do genoma completo e abordagens menos custosas de estudo molecular (Ng et. al., 2009). É considerada uma estratégia válida para a identificação de novos genes relacionados à surdez, uma vez que a maioria dos distúrbios mendelianos decorre de mutações em regiões codificadoras de proteínas e uma significativa proporção de mutações raras não sinônimas é deletéria. O sequenciamento do exoma completo permite a análise de variantes presentes em genes já conhecidos e tem o potencial de revelar alterações em genes que ainda não foram relacionados à doença em estudo (Shearer et. al., 2011; Lewis et. al., 2018).

Embora o sequenciamento do exoma completo seja uma estratégia eficiente para a identificação de variantes relacionadas com surdez, há algumas limitações em sua aplicação clínica, como: regiões codificadoras de proteína representam apenas 1,5% do genoma e 85% das mutações que causam doenças ocorrerem nestas regiões (Choi et. al., 2009; Teer & Mullikin, 2010). No entanto, apesar do foco nestas regiões ser útil para a descoberta de variantes de interesse, possíveis variantes causativas presentes em outras regiões do genoma, como as não codificadoras ou regiões reguladoras, como promotoras e *enhancers*, podem não ser detectadas (Yan et. al., 2013). Além disso, as regiões de interesse podem não ser representadas adequadamente, uma vez que o sequenciamento do exoma completo não é uma tecnologia feita sobre encomenda, e a cobertura das sequências pode não ser sempre adequada para o diagnóstico clínico devido a regiões do genoma que dificultam a captura e o sequenciamento, como regiões repetitivas e alto conteúdo das bases guanina e citosina. Assim como no WGS, é uma limitação a possibilidade de achados incidentais, uma vez que há maior probabilidade de identificação de variantes indesejadas em abordagens que focam somente em um conjunto de genes específicos (Shearer & Smith, 2015; Yohe & Thyagarajan, 2017; Sheppard et. al., 2018).

A utilização de um painel de genes pode ser realizada em estudos nos quais a captura e análise de regiões de interesse sejam restritas a um determinado

conjunto de genes selecionados de acordo com objetivos específicos (Vona et. al., 2014). A OtoSCOPE (Otological Sequence Capture Of Pathogenic Exons) foi a primeira plataforma de sequenciamento massivo em paralelo que utilizou técnicas de captura e enriquecimento genômico para identificação de variantes causativas em genes de surdez (Shearer et. al., 2010).

As técnicas de enriquecimento genômico e captura de um grupo específico de genes têm a vantagem de aumentar a cobertura das regiões sequenciadas em relação ao sequenciamento do exoma completo, além de serem menos custosas e com tempo de execução mais curto. Além disso, o foco em determinado subconjunto do genoma reduz a capacidade de sequenciamento exigida e a infraestrutura bioinformática necessária para analisar, interpretar e estocar a grande quantidade de dados de sequenciamento que são gerados. No entanto, há três grandes limitações para a utilização de painéis de genes: a seleção de determinado número de genes específicos pode excluir o gene que de fato explica o quadro; além disso, é necessária uma atualização constante da lista de genes, uma vez que novos genes são descobertos com certa frequência (Lin et. al., 2012; Dilliot et. al., 2018).

Desde a introdução da primeira tecnologia de sequenciamento de nova geração, em 2004, mais de 1000 artigos sobre NGS foram publicados, e até o presente momento foram identificadas dezenas de genes novos de surdez por meio da tecnologia aplicada ao sequenciamento de exomas (<https://www.hereditaryhearingloss.org>) (Tabela 1).

As variantes candidatas a explicar os fenótipos são identificadas durante a análise bioinformática, sendo posteriormente interpretadas de acordo com critérios gerais estabelecidos pelo American College of Medical Genetics and Genomics (ACMG, 2014). Dentre estes critérios estão: frequências alélicas das variantes em bancos de dados populacionais, estudos de segregação das variantes, o tipo da mutação, seu potencial patogênico de acordo com pacotes de previsão e estudos funcionais para a compreensão do papel biológico das variantes. De acordo com esses critérios, as variantes são classificadas como patogênicas, provavelmente patogênicas, variantes de significado incerto (VUS), variantes provavelmente benignas e variantes benignas (Richards et. al., 2015).

Tabela 1: Lista de genes novos e mutações relacionadas com perda auditiva que foram identificadas por sequenciamento de nova geração (NGS). Dados obtidos no portal www.hereditaryhearingloss.org.

Genes	Mutações	Lócus	Referências
<i>TSPEAR</i>	c.1726G>T+c.1728delC	DFNB98	Delmaghani et. al., 2012
<i>ELMOD3</i>	c.794T>C; p.Leu265Ser	DFNB88	Jaworek et. al., 2013
<i>KARS</i>	c.1129G>A p.Asp377Asn	DNB89	Santos-Cortez et. al., 2013
<i>CLPP</i>	c.433A>C p.Thr145Pro	DFNB81	Jenkinson et. al., 2013
<i>LARS2</i>	c.1565C>A p.Thr522Asn	DFNB81	Pierce et. al., 2013
<i>ADCY</i>	c.3112C>T p.Arg1138*)	DFNB44	Santos-Cortez et. al., 2014
<i>TBC1D24</i>	c.208G>T p.Asp70Tyr	DFNB86	Rehman et. al., 2014
<i>EPS8</i>	c.88C>T p.Gln30*	DFNBB102	Behloul et. al., 2014
<i>FAM65B</i>	c.1021G>A p.R_34_D86delinsSS	DFNB105	Diaz-Horta et. al., 2014
<i>TMEM132E</i>	c.1259G>A p.Arg420Gln	DFNB99	Li et. al., 2015
<i>DCDC2</i>	c.1271A>C p.Gln424Pro	DFNB66	Grati et. al., 2015
<i>NARS2</i>	c.637G>T p.Val213Phe	DFNB94	Simon et. al., 2015
<i>MET</i>	c.2521T>G p.F841V	DFNB97	Mutjaba et. al., 2015
<i>EPS8L2</i>	c.1014delC p.Ser339Alafs*15	DFNB105	Dahmani et. al., 2015
<i>SLC22A4</i>	c.338G>A p.Cys113Tyr	DFNB60	Ben Said et. al., 2016
<i>S1PR2</i>	c.323G>C p.Arg108Pro	DFNB68	Santos-Cortez et. al., 2016
<i>CDC14A</i>	c.1126C>T p.Arg376*	DFNB105	Delmaghani et. al., 2016
<i>ROR1</i>	c.2207G>C p.R736T	DFNB105	Diaz-Horta et. al., 2016
<i>ESRP1</i>	c.775C>G p.Leu259Val	DFNB108	Rohacek et. al., 2017
<i>GAB1</i>	c.347G>A p.Gly116Glu	DFNB26	Yousaf et. al., 2018
<i>PPIP5K2</i>	c.2510G>A p.Arg837His	DFNB100	Yousaf et. al., 2018
<i>MPZL2</i>	c.72del p.Ile24Metfs*22	DFNB108	Wesdorp et. al., 2018
<i>CLDN9</i>	c.86delT p. Leu29ArgfsTer4	DFNB108	Sineni et. al., 2019
<i>GRAP</i>	c.311A>T p.Gln104Leu	DFNB108	Li et. al., 2019
<i>SPNS2</i>	c.1066_1067delCCinsT p.Pro356Cysfs*35	DFNB108	Ingham et. al., 2019
<i>CEACAM16</i>	c.418A>C p.Thr140Pro	DFNA4B	Zheng et. al., 2011
<i>P2RX2</i>	c.178G>T p.Val60Leu	DFNA41	Yan et. al., 2013
<i>TNC</i>	c.5317G>A p.Val1773Met	DFNA56	Zhao et. al., 2014
<i>TBC1D24</i>	c.533C>T p.Ser178Leu	DFNA65	Azaiez et. al., 2014
<i>CD164</i>	c.574C>T p.Arg192*	DFNA66	Nyegaard et. al., 2015
<i>OBSPL2</i>	c.141_142delITG p.Arg50Alafs*103	DFNA67	Xing et. al., 2015
<i>HOMER2</i>	c.554G>C; p.Arg185Pro	DFNA68	Azaiez et. al., 2015
<i>KITLG</i>	c.286_303delinsT p.Ser96Ter	DFNA69	Zazo Seco et. al., 2015
<i>MCM2</i>	c.130C>T p.Arg44Cys	DFNA70	Gao et. al., 2015
<i>DMXL2</i>	c.7250G>A p.Arg2417His	DFNA73	Chen et. al., 2016
<i>IFNLR1</i>	c.296G>A p.Arg99His	DFNA2C	Gao et. al., 2017
<i>PTPRQ</i>	c.6881G>A p.Trp2294*	DFNA73	Eisenberger et. al., 2017
<i>LMX1A</i>	c.721G>C p. Val241Leu	DFNA7	Wesdorp et. al., 2018
<i>COL11A1</i>	c.652-2A>C	DFNA37	Booth et. al., 2018
<i>PDE1C</i>	c.958G>T p.Ala320Ser	DFNA73	Wang et. al., 2018
<i>SMPX1</i>	c.214G>T p. Glu72X	DFNX4	Schraders et. al., 2011
<i>COL4A6</i>	c.1771G>A p.Gly591Ser	DFNX6	Rost et. al., 2014
<i>AIFM1</i>	c.1030C>T p.Leu344Phe	DFNX5	Zong et. al., 2015

No entanto, há algumas dificuldades de aplicação das diretrizes estabelecidas pelo ACMG. A primeira delas são as diferenças entre laboratórios quanto à utilização dos critérios de interpretação das variantes. Também há dificuldades na aplicação de critérios de filtragem baseados em frequência das variantes em bancos de dados populacionais. Por exemplo, algumas variantes de herança recessiva podem ter alta frequência em heterozigose em indivíduos não afetados, e mutações com baixa penetrância podem ser entendidas como alterações não patogênicas, o que dificulta a interpretação. Apesar destas limitações, a utilização de tais diretrizes é eficaz na medida em que permite a comparação da interpretação das variantes entre os diferentes laboratórios, e um consenso maior entre tais instituições poderá ser estabelecido (Amendola et. al., 2016; Yohe & Thyagarajan, 2017).

Recentemente, um trabalho buscou padronizar a classificação de variantes em genes já conhecidos por explicar o quadro de surdez, sugerindo uma adaptação da classificação estabelecida pelo ACMG. Após uma avaliação de 51 variantes presentes em nove genes de surdez conhecidos, dezessete destas alterações tiveram suas classificações modificadas em relação à classificação originalmente proposta de acordo com o ACMG (Oza et. al., 2018), indicando que essa adaptação dos critérios era de fato necessária nos casos de surdez.

1.6. Justificativa para a realização do estudo

A disponibilidade de famílias averiguadas no Laboratório de Genética do IBUSP, com vários indivíduos afetados por perda auditiva não sindrômica de herança dominante motivou a condução dessa pesquisa, cujo objetivo é identificar novos genes e novos mecanismos mutacionais associados à perda de audição.

A identificação de novos genes e mutações relacionados à perda auditiva permite a realização de novas pesquisas sobre a heterogeneidade genética da surdez e estudos sobre fisiologia molecular da audição, o que permite um maior conhecimento sobre os mecanismos subjacentes à perda de audição. Como consequência, o diagnóstico molecular da surdez e orientações mais precisas no aconselhamento genético podem ser facilitados e possíveis avanços em terapias para a perda auditiva poderão ocorrer no futuro e beneficiar os indivíduos acometidos pelo distúrbio.

Capítulo 2

Objetivos

O objetivo geral deste estudo foi a identificação de genes e mutações correspondentes que explicam a perda auditiva não síndrômica de herança autossômica dominante, em famílias em estudo no Laboratório de Genética Humana - LGH, do IBUSP. Para atingir esse objetivo, foram executadas as etapas detalhadas nos objetivos específicos:

- I - Identificar e avaliar a frequência da mutação c.2090T>G p.Leu697Trp no gene *MYO3A* em uma casuística de 101 famílias com surdez não síndrômica de herança autossômica dominante, utilizando sequenciamento convencional pelo método de Sanger.
- II - Identificar se a mutação no gene *MYO3A* detectada nas famílias estudadas tem origem comum ou se resulta de eventos mutacionais independentes, por meio da genotipagem dos afetados realizada em arrays de SNPs.
- III - Identificar os genes e as mutações causativas em duas grandes famílias com vários afetados por surdez, por meio de sequenciamento massivo em paralelo do exoma, seguido de filtragem de variantes e sequenciamento convencional de Sanger das mutações selecionadas para estudo de transmissão nas famílias.

Capítulo 3

Material e Métodos

3.1. Casuística

As amostras utilizadas nesse estudo são provenientes de uma coleção de amostras de DNA de famílias com surdez do Laboratório de Genética Humana - LGH do IBUSP e de uma coleção de amostras de DNA de famílias, com surdez, do Laboratório de Otorrinolaringologia do Hospital das Clínicas/LIM32.

3.1.1. Casuística na qual buscamos identificar a frequência e origem da mutação c.2090T>G p.Leu697Trp no gene *MYO3A*

As famílias 1, 2 e 3 haviam sido identificadas previamente ao início do trabalho de mestrado como apresentando uma mutação de herança autossômica dominante c.2090T>G p.Leu697Trp no gene *MYO3A*.

A Família 1 foi estudada no serviço de aconselhamento genético do Laboratório de Genética Humana, e apresenta 27 indivíduos afetados por perda auditiva não sindrômica (Figura 4). Há amostras de DNA de 52 indivíduos, 27 afetados e 25 não afetados. A idade de manifestação de perda auditiva varia de 12 a 70 anos. A média de idade de manifestação é de 30 anos. Foi inicialmente averiguada na tese de doutorado de Dantas (2013) após sequenciamento massivo em paralelo do exoma de quatro indivíduos afetados (indivíduos V:4, V:15, V:24, V:34 da genealogia) e sua descrição está apresentada na publicação de Dantas et. al. (2018).

A Família 2 foi averiguada no serviço de aconselhamento genético do Laboratório de Genética Humana, e apresenta 11 indivíduos afetados por perda auditiva não sindrômica (Figura 5). Obtivemos amostras de DNA de 21 indivíduos, 11 afetados e 10 não afetados. A idade de manifestação de perda auditiva varia de 0 a 36 anos, com um caso congênito. A idade média de manifestação é de 30 anos, excluindo-se o caso congênito. A mutação c.2090T>G p.Leu697Trp no gene *MYO3A* foi identificada durante a iniciação científica após filtragem de variantes presentes em quatro exomas analisados, realizada pelo mestrando, e também foi incluída na publicação de Dantas et. al. (2018).

A Família 3 foi estudada no serviço de aconselhamento genético do Laboratório de Genética Humana, e apresenta 7 indivíduos afetados por perda

auditiva não sindrômica (Figura 6). Há amostras de DNA de 16 indivíduos, 7 afetados e 9 não afetados. A idade de manifestação de perda auditiva varia de 9 a 20 anos. A média de idade de manifestação é de 15 anos. A mutação c.2090T>G p.Leu697Trp no gene *MYO3A* foi identificada após filtragem de variantes identificadas por meio de sequenciamento massivo paralelo de um painel de 100 genes de surdez, por colegas do laboratório.

Além dessas famílias, utilizamos uma coleção de 100 amostras adicionais de probandos com perda auditiva não sindrômica de herança autossômica dominante. Destas amostras, 56 são oriundas do Laboratório de Otorrinolaringologia do Hospital das Clínicas/LIM32 e 44 são provenientes do Laboratório de Genética Humana do IBUSP.

3.1.2. Famílias nas quais buscamos identificar a causa da perda auditiva por meio de sequenciamento massivo em paralelo do exoma

A Família 6, também averiguada no serviço de aconselhamento genético do Laboratório de Genética Humana, apresenta 6 indivíduos afetados por perda auditiva não sindrômica (Figura 7). Obtivemos amostras de DNA de 8 indivíduos, 6 afetados e 2 não afetados. A idade de manifestação de perda auditiva varia de 6 a 34 anos. A média de idade de manifestação é de 12 anos. Foram encaminhadas três amostras de indivíduos afetados para sequenciamento massivo paralelo do exoma no Centro de Pesquisa sobre o Genoma Humano e Células-Tronco - CEGH-CEL (IBUSP).

A Família 7, averiguada no serviço de aconselhamento genético do Laboratório de Genética Humana, apresenta 16 indivíduos afetados por perda auditiva não sindrômica (Figura 8). Há amostras de DNA coletadas de 55 indivíduos, 16 afetados e 39 não afetados. A idade de manifestação de perda auditiva varia de 7 a 40 anos. A média de idade de manifestação é de 21 anos. Foram encaminhadas quatro amostras de afetados para sequenciamento massivo paralelo do exoma no Centro de Pesquisa sobre o Genoma Humano e Células-Tronco - CEGH-CEL (IBUSP).

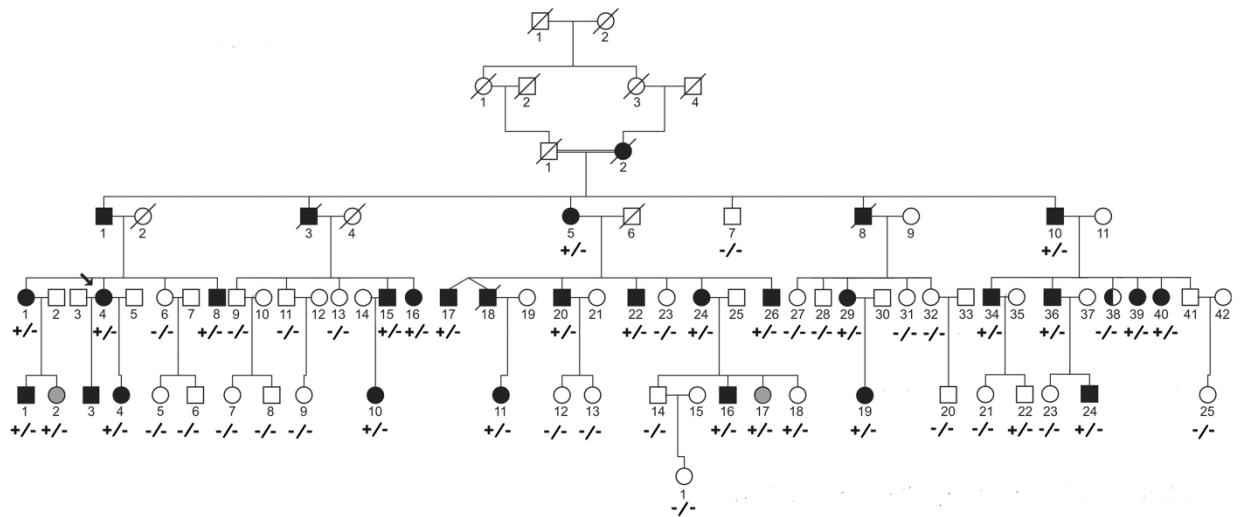


Figura 4: Genealogia da Família 1. O sinal de +/- indica os indivíduos que possuem a mutação c.2090T>G p.Leu697Trp no gene *MYO3A* em heterozigose. O sinal de -/- indica os indivíduos em que a mutação não está presente.

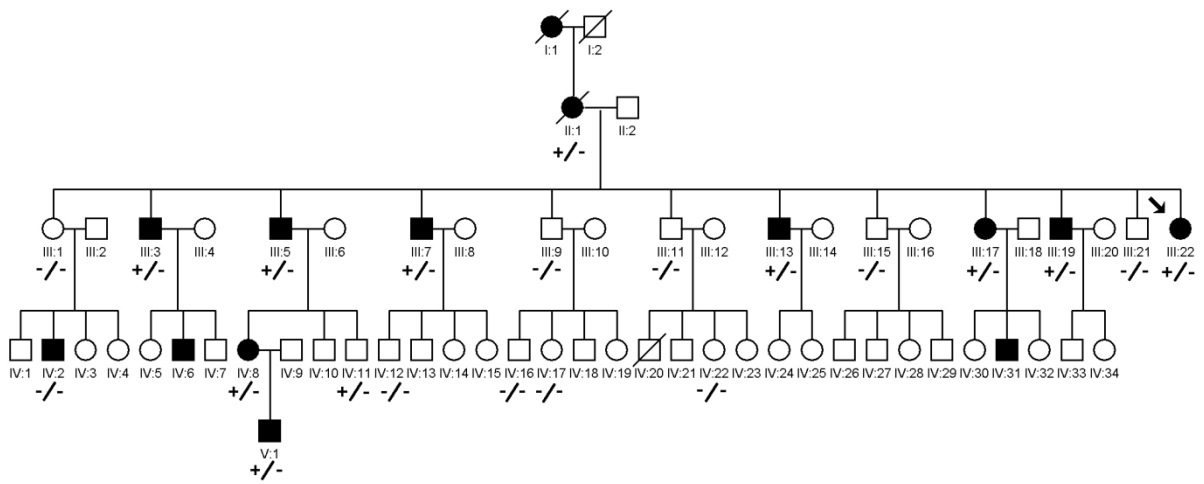


Figura 5: Genealogia da Família 2. O sinal de +/- indica os indivíduos que possuem a mutação c.2090T>G p. Leu697Tp no gene *MYO3A* em heterozigose. O sinal de -/- indica os indivíduos em que a mutação não está presente.

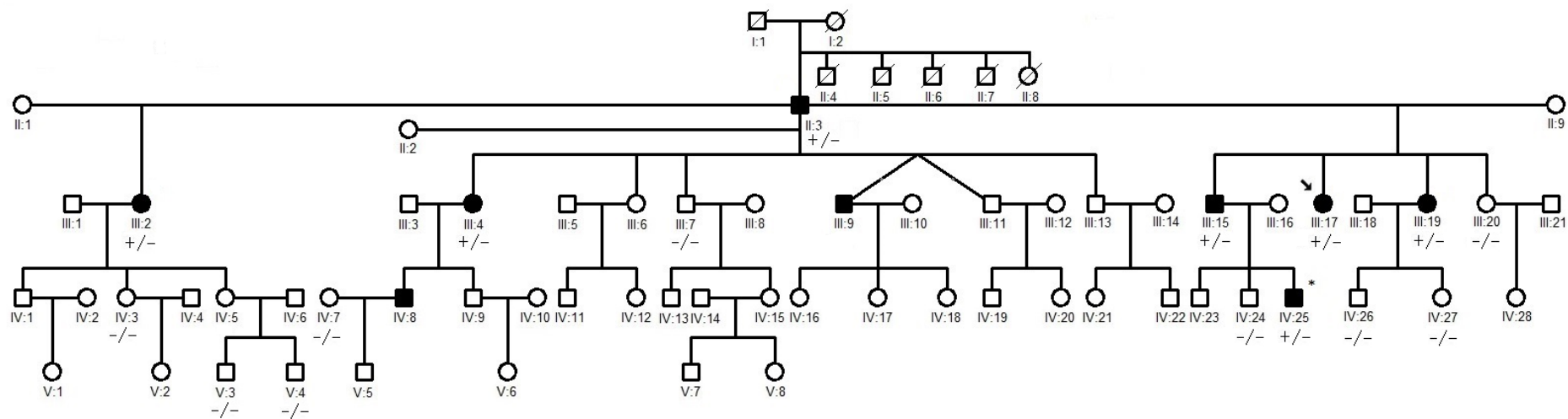


Figura 6: Genealogia da Família 3. O sinal de +/- indica os indivíduos que possuem a mutação c.2090T>G p.Leu697Trp no gene *MYO3A* em heterozigose. O sinal de -/- indica os indivíduos em que a mutação não está presente.

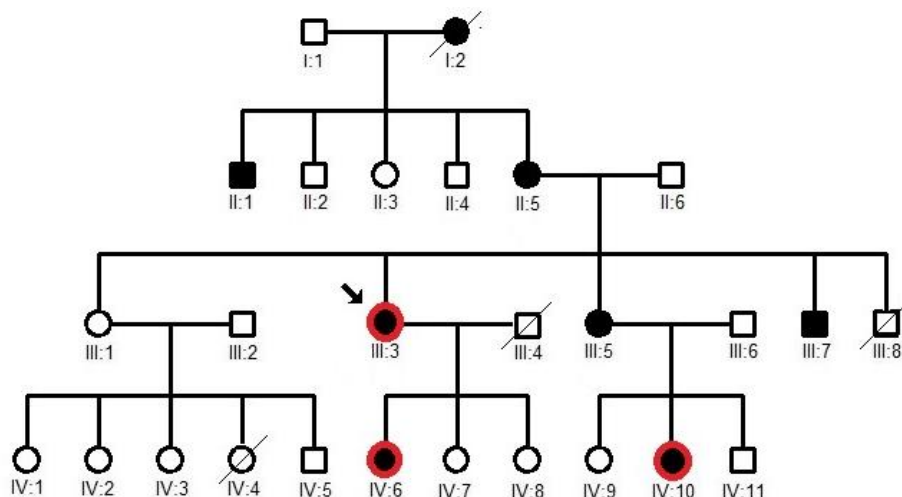


Figura 7: Genealogia da Família 6. Os indivíduos afetados que tiveram exoma analisado estão assinalados com círculo vermelho.

3.1.3. Aspectos éticos

As amostras oriundas do IBUSP foram coletadas durante o desenvolvimento de diversos projetos aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa - Seres Humanos do Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo. O primeiro deles (Mapeamento de locos responsáveis por surdez não-sindrômica em famílias brasileiras - nº 25000.143724/2003-29) foi também aprovado pela Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP) em dezembro de 2003, durante a vigência do projeto de doutorado de Karina Lezirovitz, ocorrido entre os anos de 2003 e 2007. O segundo projeto (Estudos Moleculares na Perda Auditiva de Herança Autossômica Dominante - nº 097/2009) foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa - Seres Humanos do Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo em junho de 2009. O terceiro projeto (Estudo da Heterogeneidade Genética da Surdez por Sequenciamento de Nova Geração) foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa - Seres Humanos do IB-USP (Parecer nº 1.133416), datado de 23/06/15.

As amostras oriundas do Hospital das Clínicas – HC foram aprovadas sob o protocolo de pesquisa nº 02238412.0.1001.0068, pela CAPPesq (Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa) do Hospital das Clínicas e da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (HCFMUSP) em 13/10/2012, parecer nº 130.695.

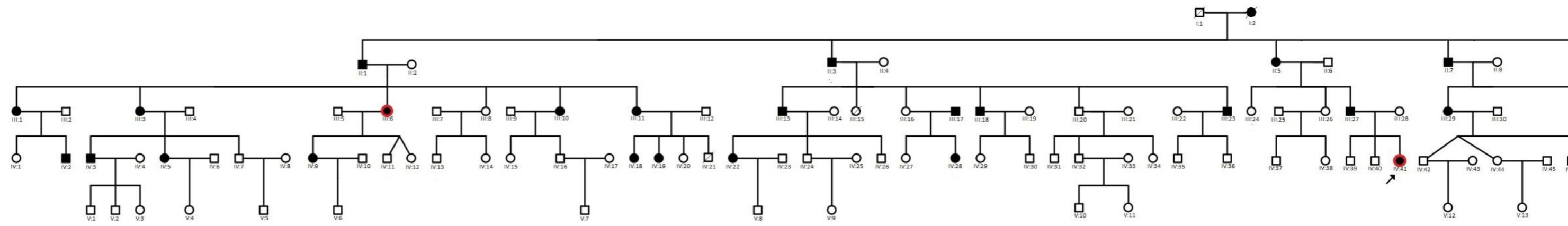


Figura 8. Genealogia da Família 7. Os indivíduos afetados que tiveram exoma analisado estão assinalados com círculo vermelho.

Todos os procedimentos foram realizados após assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido. Todos os pacientes atendidos receberam um relatório com resultados dos exames realizados e orientação em relação aos riscos de recorrência da deficiência auditiva na sua família. O aconselhamento genético foi oferecido pela Dra. Regina Célia Mingroni Netto, do Departamento de Genética e Biologia Evolutiva do Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo.

3.2. Métodos

3.2.1. Estudo da origem da mutação c.2090T>G p.Leu697Trp no gene *MYO3A*

Foram selecionadas para genotipagem em *array* de SNPs amostras de DNA de indivíduos afetados de cada uma das cinco famílias com a mutação c.2090T>G p.Leu697Trp no gene *MYO3A*. O *array* selecionado para o estudo foi desenvolvido especialmente para estudos de genética populacional e de ancestralidade (Axiom Human Origins 650K da Affymetrix - Thermo Fisher Scientific - Waltham, USA). As placas contendo amostras dos indivíduos das famílias foram enviadas à empresa Affymetrix, nos Estados Unidos da América, para genotipagem como serviço terceirizado. Foram enviadas sete amostras da Família 1, sete amostras da Família 2, cinco amostras da Família 3, uma amostra da Família 4 e uma amostra da Família 5. Em relação às Famílias 4 e 5, apenas uma amostra de cada família foi enviada porque só tivemos acesso às amostras dos probandos de cada uma delas.

3.2.2. Análise de identidade por descendência (IBD) e estimativa do tamanho do haplótipo compartilhado que contem a mutação

Os resultados da genotipagem de cerca de 650.000 SNPs em *array* foram filtrados por meio do software *PLINK* (<https://www.cog-genomics.org/plink2>). Filtragens adicionais foram realizadas por meio do pacote GWASTools R (Gogarten et. al., 2012; Nunes et. al., 2016). Foram eliminados os polimorfismos de nucleotídeos simples muito próximos entre si, uma vez que a análise de SNPs muito próximos em desequilíbrio de ligação acarreta aumento nos coeficientes de parentesco e redundância na análise. Após a filtragem, foram utilizados os genótipos em 70.000SNPs espalhados por todo o

genoma, os quais foram utilizados para a análise de parentesco entre as famílias.

A relação de parentesco entre as famílias e entre indivíduos da mesma família com a mutação c.2090T>G p.Leu697Trp no gene *MYO3A* foi estimada por uma abordagem denominada identidade por descendência (IBD). A partir dos genótipos nos 70.000 SNPs, foi estimada a probabilidade de identidade por descendência entre pares de indivíduos das famílias para cada um dos SNPs analisados, por meio do método de momentos implementado no pacote SNPRelate R (Zheng et. al., 2012). Após as estimativas de IBD, foram alcançadas médias a partir das quais foram estimados os coeficientes de parentesco entre os pares de indivíduos analisados. O coeficiente de 0,02 foi utilizado para indicar parentesco equivalente a primos de 2º grau. Este valor corresponde a um ajuste interno, uma vez que os indivíduos que apresentaram este coeficiente nas genealogias das famílias são os que eram primos de 2º grau (o real valor do coeficiente de parentesco entre primos de 2º grau é de 0,03125). Essa análise foi realizada pela pós-doutoranda Kelly Nunes.

3.2.3. Determinação do haplótipo e idade da mutação

O programa *Shape it* foi utilizado para inferir o haplótipo no qual a mutação c.2090T>G p.Leu697Trp está localizada (Delaneau et. al., 2011). Em tal programa, o método duoHMM foi aplicado para garantir a consistência da informação entre os haplótipos e a estrutura dos *pedigrees* das famílias, de modo que eventuais erros mendelianos fossem corrigidos e descartados durante o faseamento. Em seguida, os dados oriundos do *array* de SNPs foram colocados em fase e os haplótipos possíveis foram construídos a partir destes dados. No *Shape it*, foram utilizados genomas de referência (*1000 Genomes*) para determinar os haplótipos, uma vez que nem sempre houve nas famílias trios de indivíduos genotipados para analisar a segregação do haplótipo com a mutação em estudo.

A idade da mutação foi estimada por meio do método Gamma, o qual se baseia no tamanho do haplótipo compartilhado entre todos os indivíduos e o decaimento do desequilíbrio de ligação ao longo das gerações. Tal análise foi realizada por meio da utilização de *scripts* da linguagem computacional R

(Gandolfo et. al., 2014). Essa análise foi realizada pela pós-doutoranda Kelly Nunes.

3.2.4. Análise da origem e ancestralidade da mutação

A investigação de ancestralidade local foi utilizada para inferir a origem da mutação por meio da inferência da ancestralidade da região cromossômica em que a alteração está inserida. Foram utilizadas como referência populações parentais do Human Genetic Diversity Panel (HGDP-CEPH), que incluiu populações africanas, europeias e nativo-americanas, as quais foram genotipadas com o mesmo array de SNPs utilizado para genotipar os indivíduos das famílias com a mutação c.2090T>G. A abordagem de ancestralidade local foi realizada por meio do software RFMIX (Maples et. al., 2013). A partir de algoritmos Random Forest, os cromossomos 10 dos indivíduos genotipados no *array* foram comparados, em janelas de 2 megabases, com o cromossomo 10 dos indivíduos de ancestralidade europeia, nativo-americana e africana presentes em bancos de dados genômicos de referência.

A análise de ancestralidade global foi realizada por meio do software ADMIXTURE (Alexander et. al., 2009), o qual se baseou em um modelo algorítmico bayesiano utilizando uma população tri-híbrida como referência. Essa análise foi realizada pela pós-doutoranda Kelly Nunes.

3.2.5. Sequenciamento massivo em paralelo do exoma

No caso das amostras que foram submetidas a sequenciamento massivo em paralelo do exoma (Famílias 1, 2, 6 e 7), a construção da biblioteca de DNA, a etapa de captura dos fragmentos da biblioteca, o sequenciamento de nova geração (NGS) e a análise bioinformática do resultado do NGS de amostras dos indivíduos afetados foram realizadas no Centro de Pesquisa sobre o Genoma Humano e Células-Tronco – CEGH-CEL (IBUSP). As bibliotecas foram preparadas por meio do kit *Nextera DNA Library Prep Kits* (Illumina INC, San Diego, California). A etapa de captura dos fragmentos ocorreu através do kit *Sure Select QXT Target Enrichment* (Agilent Technologies, Santa Clara, California). O sequenciamento de nova geração (NGS) foi realizado no equipamento HiSeq 2500 (Illumina INC, San Diego,

California). As sequências resultantes do NGS foram alinhadas por meio do *software* Burrows-Wheeler Aligner (BWA) (<http://bio-bwa.sourceforge.net/>). O realinhamento de regiões indel, chamada de variantes e recalibração de qualidade das bases foram realizadas pelo *software* Genome Analysis Tool Kit (GATK) (<https://software.broadinstitute.org/gatk/>) para a produção de arquivos Variant Call Format (VCF). A anotação das variantes foi realizada pelo *software* Annovar (<http://annovar.openbioinformatics.org/en/latest/>).

A amostra do probando da família 3 e dos probandos de mais outras doze amostras foram submetidas a sequenciamento massivo paralelo de um painel de 100 genes de surdez, selecionados por meio do kit *SureDesign – Agilent Technologies*. As bibliotecas de DNA foram criadas por meio do kit *Sure Select QXT Target Enrichment System Kit for Illumina Multiplexed Sequencing*. O sequenciamento de nova geração dos éxons capturados da biblioteca de DNA foi realizado através do equipamento Miseq (Illumina, San Diego). Todas estas etapas foram realizadas no Centro de Pesquisa sobre o Genoma Humano e Células-Tronco - CEGH-CEL (IBUSP), pelo aluno de mestrado Humberto Cezar Marcolino.

3.2.6. Filtragem computacional de variantes

A partir do arquivo computacional VCF Anotado, uma série de filtrações foi realizada, com a seleção de variantes raras em bancos de dados populacionais, com alta probabilidade de patogenicidade de acordo com pacotes computacionais. Os programas de previsão de patogenicidade utilizados foram *Polyphen*, (<http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/>), *SIFT* (<http://sift.jcvi.org/>) e *Mutation Taster* (<http://www.mutationtaster.org/>), entre outros.

Foram selecionadas as variantes: autossômicas; em heterozigose, exônicas ou em sítios de *splicing*, com frequência menor ou igual a 0,01 em bancos de dados populacionais e ausentes em indivíduos controle da mesma corrida. Foram descartadas variantes: sinônimas, de efeito desconhecido e em genes hipervariáveis.

3.2.7. Sequenciamento convencional de Sanger

O estudo da segregação da mutação c.2090T>G p.Leu697Trp no gene *MYO3A* nas grandes famílias averiguadas e sua triagem na coleção de amostras dos probandos de 88 genealogias com surdez não sindrômica de herança autossômica dominante foi feita pelo sequenciamento de Sanger.

A confirmação da presença das variantes candidatas selecionadas a partir dos exomas dos indivíduos analisados e sua segregação em cada genealogia foi estudada por meio do sequenciamento convencional de Sanger em todas as amostras coletadas.

Foram sintetizados oligonucleotídeos para promover a amplificação de DNA das regiões exônicas que contém as variantes selecionadas oriundas da filtragem computacional. Os oligonucleotídeos foram sintetizados por meio de ferramentas *online* como o Primer3 (<http://primer3.ut.e/>) e Primer designing tool (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>).

O DNA das amostras dos indivíduos das famílias foi amplificado pela Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), usando pares de *primers* desenhados para amplificar os exons contendo as variantes selecionadas. Os produtos foram purificados utilizando-se duas enzimas, a *Exonuclease I* (GE Healthcare-Little Chalfont, UK) e *Shrimp Alkaline Phosphatase*, (GE Healthcare-Little Chalfont, UK) de acordo com o protocolo ExoSAP. A etapa de purificação foi seguida pela reação de sequenciamento. Nesta, os produtos purificados foram preparados para as reações de sequenciamento utilizando "BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit" (Thermo Fisher Scientific – Waltham, USA). A etapa seguinte foi a de purificação com AutoSeq 96 Dye Terminator Clean-up (GE Healthcare-Little Chalfont, UK). Nesta etapa, a placa Multiscreen – HV (MILLIPORE) (Merck Millipore – Billerica, USA) com Sephadex™ G-50 (GE Healthcare-Little Chalfont, UK) em Fine foi preenchida utilizando a Multiscreen Column Loader, (Merck Millipore – Billerica, USA), seguida de hidratação por água miliq estéril. Logo após esta etapa, as amostras foram enviadas ao CEGH-CEL, onde as sequências de DNA foram analisadas no equipamento ABI 3730 DNA Analyzer®. (Thermo Fisher Scientific – Waltham, USA).

Os pacotes computacionais utilizados para analisar as sequências foram o BioEdit (<http://www.mbio.ncsu.edu/bioedit/bioedit.html>) e o Chromas (<http://technelysium.com.au/wp/chromas/>).

3.2.8. Análise de Ligação da Família 7

A estratégia de análise de ligação foi realizada por meio da genotipagem em *Axiom® Genome-Wide LAT 1 Array World Array 4* (Affymetrix, California-EUA). Este *array* conta com 817.810 SNPs, sendo estes selecionados com o objetivo de prover alta cobertura de alelos comuns e também de alelos raros associados a doenças em populações com contribuições genéticas dos ancestrais da África Ocidental, Europeia e Nativa Americana.

Resumidamente, o *array* escolhido oferece genotipagem direcionada para estudos populacionais e de ancestralidade, ao mesmo tempo em que oferece uma cobertura eficiente para variantes comuns e raras, tipicamente avaliadas por estudos clínicos.

O processo de análise contou diversas etapas: (1) Verificação das relações de parentesco intrafamiliar por meio do *software* KING Robust v.2.1.6; (2) Filtragem de SNPs com base em *SNP Call Rate* (*gene zero* < 0.1); (3) Filtragem de SNPs com base na taxa de SNPs monomórficos (MAF < 0.01); (4) Seleção de SNPs com elevada taxa de desequilíbrio de ligação (*window size* [50], *step size* [5] e r^2 [0.2]); (5) Cálculos de *Lod score* por meio do programa *lm_linkage* do pacote Morgan v.3.3; (6) Investigação de regiões cromossômicas com *Lod score* elevado. Foram realizadas análises de *Lod score* utilizando-se amostras de 8 indivíduos afetados da Família 7. Dos 629.443 SNPs iniciais, restaram 41.703 SNPs pós-seleção e pós-filtragem para cálculo dos *Lod scores*. O processo de análise de ligação foi realizado pelo aluno de doutorado Vinícius M. Borges.

Capítulo 4

Triagem e estudo da origem da mutação c.2090T>G p.Leu697Trp no gene *MYO3A* em famílias brasileiras

4.1. Resultados

A presença da mutação c.2090T>G p.Leu697Trp no gene *MYO3A* nas famílias 1 e 2 descritas na publicação de Dantas et. al. (2018) nos motivou a avaliar a frequência desta alteração em uma coleção adicional de 101 indivíduos afetados, probandos de famílias com perda auditiva de herança autossômica dominante.

Treze das 101 amostras haviam sido submetidas à análise em um painel de 100 genes de surdez. A mutação em estudo no gene *MYO3A* foi encontrada em um indivíduo, o probando da família 3 de nossa casuística.

Foi realizado o sequenciamento de Sanger do éxon 19 do gene *MYO3A* nas 88 amostras de DNA restantes, e a mutação c.2090T>G no gene *MYO3A* foi encontrada em heterozigose em dois probandos (Famílias 4 e 5; Figuras 9 e 10).

Concluiu-se que a mutação c.2090T>G p.Leu697Trp é responsável por cerca de 5 % dos casos de perda auditiva de herança autossômica dominante nos indivíduos analisados neste estudo, pois foi detectada em um total de 5 dentre uma casuística de 103 famílias (101 avaliadas neste estudo, mais as famílias 1 e 2 já publicadas).

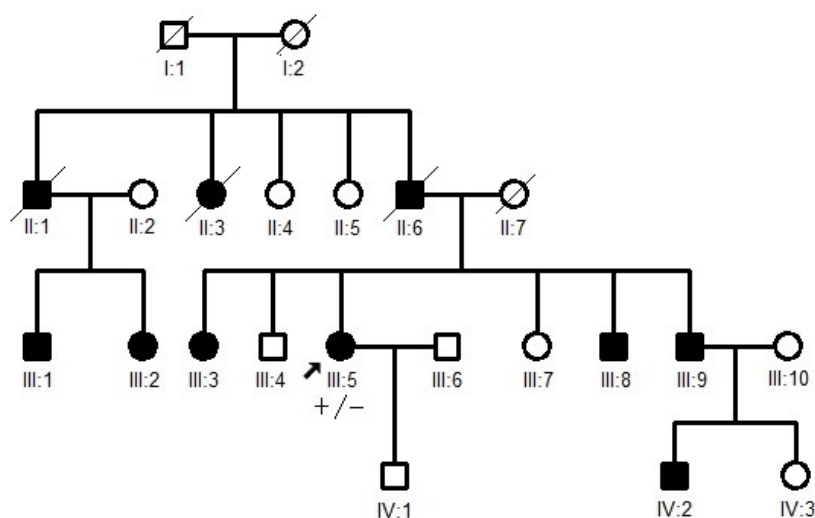


Figura 9: Genealogia da Família 4. O probando está indicado com uma seta e o sinal de +/- indica a presença da mutação c. 2090T>G p.Leu697Trp no gene *MYO3A* em heterozigose.

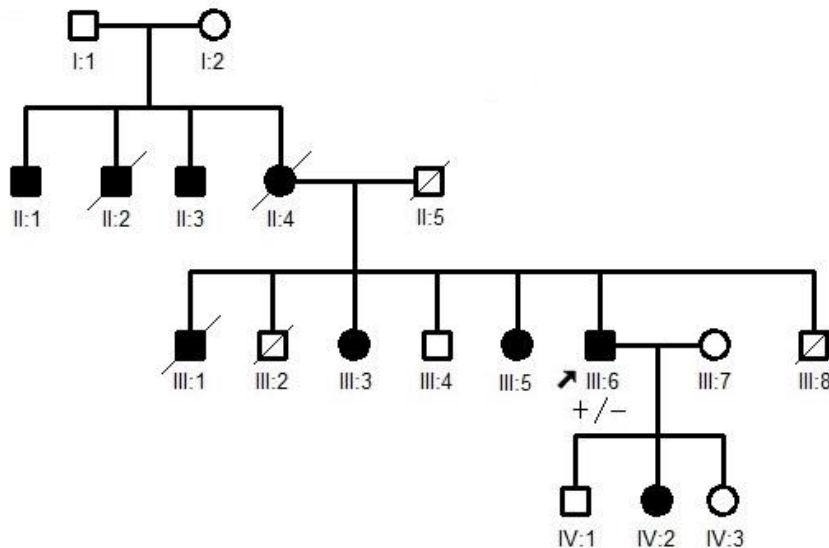


Figura 10: Genealogia da Família 5. O probando está indicado com uma seta e o sinal de +/- indica a presença da mutação c. 2090T>G p.Leu697Trp no gene *MYO3A* em heterozigose.

Com exceção da Família 3, cujo ancestral mais remoto conhecido vivia em Piancó, no estado da Paraíba, as famílias 1, 2, 4 e 5 têm seus ancestrais mais antigos oriundos do estado de Minas Gerais, nas respectivas cidades de Visconde do Rio Branco, Monte Azul, Ubá e Monte Azul, as quais estão localizadas na Zona da Mata (Ubá e Visconde do Rio Branco) e no norte do estado (Monte Azul) (Figura 11). A partir destes resultados, com a colaboração da doutora Kelly Nunes, procuramos identificar uma possível relação de ancestralidade em comum entre as cinco famílias com perda auditiva de herança autossômica dominante que possuem a mutação *missense* no gene *MYO3A*.

Foram selecionadas 21 amostras de indivíduos afetados das cinco famílias para genotipagem por *array* de SNPs (650K-SNPs Affymetrix/ThermoFisher). A relação entre 210 pares de indivíduos das cinco famílias foi estudada por meio da abordagem de Identidade por Descendência (IBD), por meio da qual foi revelada que em 160 pares os indivíduos apresentaram um coeficiente de parentesco próximo ao esperado entre primos de 2º grau, o que indica que têm parentesco próximo. Também foi verificado que os 21 indivíduos compartilham um haplótipo de 607kb, o que nos leva a concluir que foi transmitido ao longo das gerações com desequilíbrio de ligação.

Também foi avaliada a idade da mutação, a qual foi estimada em 27.4 gerações. Assumindo que uma geração é equivalente em média a 25 anos, podemos inferir que esta variante surgiu há aproximadamente 675 anos, com um intervalo de confiança entre 350 e 1325 anos.

Foi investigada a ancestralidade da mutação por meio da abordagem de estimativa de ancestralidade local. Os resultados dessa investigação revelaram que a região na qual se encontra a mutação em estudo no gene *MYO3A* tem ancestralidade europeia, conforme indicado na Figura 12. A estimativa de ancestralidade global de todos os 21 indivíduos analisados na genotipagem foi predominantemente europeia, de 80,53% e a porcentagem estimada de ancestralidade nativo-americana e africana foi 9,94% e 9,99%, respectivamente.



Figura 11: Mapa indicando a origem dos ancestrais mais antigos conhecidos das 5 famílias analisadas. Os números entre parênteses indicam cada família.

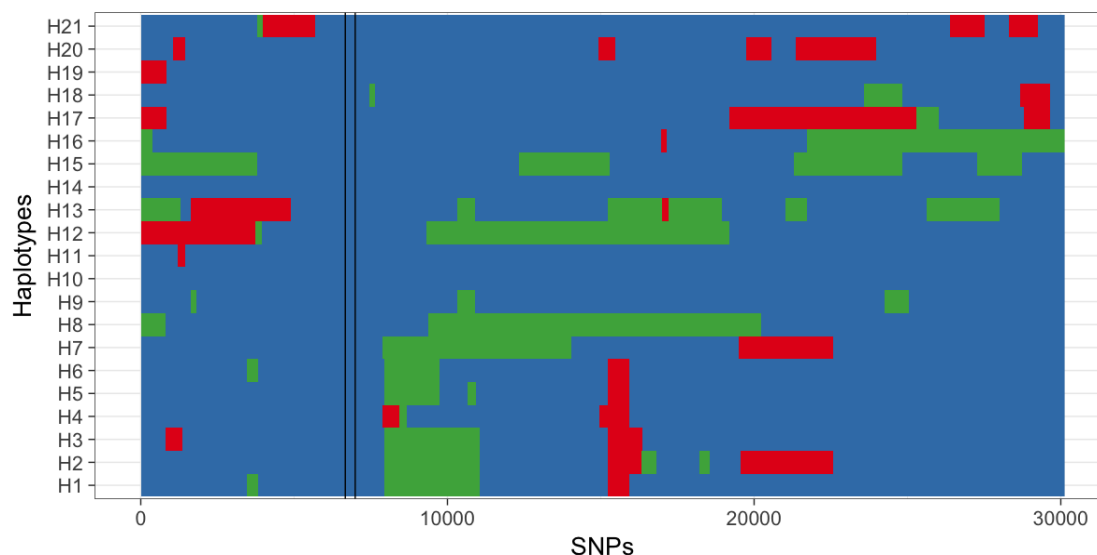


Figura 12: Inferência de ancestralidade: O eixo Y representa o cromossomo 10 em fase dos 21 indivíduos genotipados das 5 famílias. O eixo X representa os haplótipos que incluem os 30.117 SNPs no cromossomo 10. As cores verde, azul e vermelho representam o componente de ancestralidade africano, europeu e nativo-americano, respectivamente. A linha vertical representa a região da mutação c. 2090T>G p.Leu697Trp no gene *MYO3A*, a qual corresponde à região mínima do haplótipo compartilhado entre os 21 indivíduos. Análise realizada pela Dra. Kelly Nunes.

4.2. Discussão

A mutação p.Gly488Glu, descrita por Grati et. al. (2016) em uma família Afro-americana, foi a primeira alteração genética no gene *MYO3A* descrita na literatura causando perda auditiva com herança autossômica dominante. Não houve estudos sobre a frequência desta mutação em outras populações. Como a família que possui a mutação tem origem afro-americana, é provável que a mutação tenha ocorrido em um segmento cromossômico de origem africana, mas isso não foi investigado nesse estudo. Também não houve descrições na literatura sobre outras famílias que possuíssem a mesma mutação como causa de surdez.

No artigo de Dantas et. al. (2018) foi descrita a segunda mutação de herança dominante no gene *MYO3A*. A sua ocorrência em pelo menos duas famílias distintas fez suspeitar que a mutação fosse frequente em famílias brasileiras, fato confirmado no nosso estudo. Ainda, a ocorrência da mutação em cinco famílias distintas permitiu as análises de origem e idade da mutação descritas no nosso estudo, que são inéditas.

A presença da mutação em cinco famílias em uma casuística de 103 probandos de famílias com perda auditiva de herança dominante permitiu estimar a frequência de aproximadamente 5% da alteração no grupo analisado.

Tais estudos sobre frequência e origem de mutações permitem análises genéticas economicamente mais acessíveis destas alterações, uma vez que um maior conhecimento sobre a epidemiologia destas variantes promove um melhor direcionamento da escolha dos testes genéticos, além de prover aconselhamento genético mais eficiente.

De acordo com os resultados de análises de IBD e do faseamento do haplótipo que contém a mutação c.2090T>G, é provável que esta variante tenha surgido em um ancestral comum entre as cinco famílias. A origem dos ancestrais de 4 das 5 famílias em regiões próximas do território brasileiro, o fato do coeficiente de parentesco estabelecido entre vários pares de afetados de cada família ser correspondente a primos de segundo grau e a ocorrência de um haplótipo compartilhado entre os indivíduos afetados corroboram tal hipótese (Bueno, Nunes et. al., manuscrito em preparação).

A localização dos ancestrais mais remotos de quatro das cinco famílias no estado de Minas Gerais, e do ancestral de uma delas no estado da Paraíba, sugere um possível evento de migração entre as regiões nordeste e sudeste do Brasil. O ciclo do ouro, ocorrido no final do século XVII, levou milhares de imigrantes oriundos do nordeste brasileiro e de outras regiões do Brasil para o estado de Minas Gerais, onde a exploração do minério ocorreu até meados do século XVIII. No entanto, as cidades mineiras de Monte Azul, Visconde do Rio Branco e Ubá não fizeram parte da exploração do ouro. Os principais meios de subsistência destas cidades baseavam-se na cultura de algodão e na criação de gado. A região norte do estado de Minas Gerais e a zona da mata mineira têm diferentes histórias de colonização. Em relação à região norte de Minas, a pecuária era a principal atividade econômica. Imigrantes nordestinos, advindos principalmente dos estados de Pernambuco e da Bahia, povoaram a região norte de Minas por meio do Rio São Francisco, de modo que fazendas de criação de gado foram sendo desenvolvidas ao longo da margem do rio, desde a região nordeste até o norte do estado de Minas Gerais. Além disso, o transporte de alimentos, como o feijão, o milho e a farinha também contribuíram para o povoamento da região (Cardozo & Cardozo, 1945). Bandeirantes também povoaram a região, oriundos das regiões sul e sudeste. Assim como os povos oriundos da região nordeste, os bandeirantes que migraram para o norte do estado de Minas Gerais também se tornaram

criadores de gado, com predomínio de bandeirantes paulistas (Mata-Machado, 1991; Oliveira, 2000). A colonização da zona da mata teve início na primeira metade do século XVIII, e relaciona-se diretamente com o objetivo de construção de um caminho de escoamento do ouro, produzido na região das minas, até o estado do Rio de Janeiro. Outra razão para o povoamento da zona da mata mineira foi o declínio da atividade mineradora, o que resultou em uma diversificação da economia naquela região. A migração de sertanistas para a zona da mata propiciou maior atividade agrícola, com ênfase aos cultivos de algodão e fumo (Martiniere, 1991).

As análises de identidade por descendência (IBD), além do parentesco equivalente a primos de primeiro grau entre o ancestral mais antigo da Família 3 e no mínimo 6 indivíduos afetados da família 2 sugerem uma provável rota migratória, por meio do rio São Francisco, entre o estado da Paraíba e o norte do estado de Minas Gerais, e, posteriormente, para a Zona da Mata mineira. Embora indivíduos afetados das famílias estudadas tenham sido indagados sobre suas origens, não foi possível estabelecer com total certeza a rota migratória que deu origem à relação de parentesco entre os indivíduos afetados das diferentes famílias (Bueno, Nunes et. al., manuscrito em preparação).

A análise de ancestralidade global revela um cenário de miscigenação entre indivíduos europeus, africanos e nativo-americanos no estado de Minas Gerais durante o período colonial. A análise revelou a contribuição genética europeia de 80.53%, com 9.99% de contribuição africana e 9.94% de ancestralidade nativo-Americana (Bueno, Nunes et. al., manuscrito em preparação).

Por meio do processo de mistura que ocorreu entre tais populações que migraram para o Brasil, as quais associadas com eventos de recombinação, resultaram cromossomos que são mosaicos de haplótipos de diferentes ancestralidades, como é o caso do cromossomo 10 (Figura 12), que abriga a mutação c.2090T>G no gene *MYO3A*.

A idade da mutação c.2090T>G foi estimada em 675 anos com base no intervalo de confiança obtido para a idade da mutação (C.I = 350-1325), não sendo possível inferir se a variante surgiu no Brasil ou foi introduzida por colonizadores europeus. Em outras palavras, o evento mutacional poderia ter

ocorrido em qualquer data entre o ano 694 e o ano 1669, ou seja, ocorreu no Brasil já colonizado ou, anteriormente, em um indivíduo europeu e foi por ele introduzida no país. Embora a mutação c.2090T>G p.Leu697Trp no gene *MYO3A* não tenha sido relatada nos bancos de dados genômicos *ExAC*, *1000 genomes*, *6500 exomes*, *AbrAOM*, *Deafness Variation Database*, *Clinviteae*, *The Human Gene Mutation Database*, *Database of Genomic Variation*, *Ensemble* e *Clinvar*, a mutação c.2090T>G foi descrita no banco de dados *Leiden Open Variation Database (LOVD)* (<https://www.lovd.nl>), o qual foi desenvolvido no Centro Médico da Universidade de Leiden, na Holanda (Fokkema et. al., 2005). A mutação descrita no *LOVD* foi identificada em um laboratório na Holanda, em amostra do propósito de uma família em que segrega surdez sensorioneural com herança dominante (Injtema, H. University Medical Center - UMC - Utrecht, Netherlands, comunicação pessoal).

A identificação da mutação c.2090T>G na Holanda nos faz remeter à colonização holandesa ocorrida no Brasil no século XVII, entre os anos de 1624 e 1654. A partir da segunda década deste século, a Companhia Holandesa das Índias Ocidentais recém-emancipada do domínio espanhol chega ao nordeste brasileiro. A ocupação holandesa alcançou quatro estados brasileiros: Pernambuco (1630-1654), Paraíba (1634-1654), Rio Grande do Norte (1634-1654) e Ceará (1637-1654). A capitania de Pernambuco era a mais rica das possessões portuguesas no Brasil na época, sendo o maior alvo dos recém-chegados holandeses, que, segundo registros históricos, desembarcaram no Brasil com cerca de 7000 navegadores e soldados. A colonização holandesa foi caracterizada pela disputa com Portugal pelo controle do comércio do açúcar, e durou cerca de 30 anos (de Mello, 2011). Durante este período, os colonizadores holandeses deixaram descendentes no Brasil, o que leva à hipótese de que a variante c.2090T>G pode ter origem holandesa e ter sido introduzida no Brasil nesse período. A mutação teria sido posteriormente transmitida à região sudeste do Brasil, mais especificamente ao norte do estado de Minas Gerais e posteriormente à zona da mata, durante a expansão agropecuária acima descrita.

Há na literatura outros estudos interessantes que investigaram a origem de mutações que causam distúrbios hereditários em populações brasileiras, algumas aparentemente restritas a populações específicas.

De Farias et. al. (2018) realizaram um estudo que buscou identificar a origem de mutações nos genes *KLC2*, *MED25*, *IMPA1* e *WNT7A*. Essas mutações raras ocorreram em famílias do nordeste brasileiro, mais especificamente dos estados da Paraíba e do Rio Grande do Norte. O gene *KLC2* localiza-se no braço longo do cromossomo 11 e está associado a Síndrome de SPOAN, a qual é uma síndrome caracterizada por paraplegia espástica, atrofia ótica e neuropatia (Macedo Souza et. al., 2005). O gene *MED25* está situado no braço longo do cromossomo 19 e está relacionado à atrofia fibular muscular, a qual é uma doença que afeta os nervos periféricos (Leal et. al., 2009). O gene *IMPA1* localiza-se no braço longo do cromossomo 8 e está associado à deficiência intelectual (Figueiredo et. al., 2016). O gene *WNT7A* localiza-se no braço curto do cromossomo 3 e foi identificado como relacionado à Síndrome de Santos por Alves et. al. (2017). A síndrome de Santos havia sido descrita previamente no Brasil por Santos et. al. (2008). Nesse estudo, foi realizada genotipagem de indivíduos afetados por estes distúrbios, em *arrays* de SNPs para identificar a origem das alterações. Dentre os afetados com a síndrome SPOAN, a maior parte habita regiões do estado do Rio Grande do Norte. Embora esta mutação esteja em região cromossômica que se evidenciou ter origem europeia, pode ter surgido tanto no continente europeu quanto no oriente médio, uma vez que há relatos de dois indivíduos egípcios com a mesma mutação. A maior parte dos afetados com mutações nos genes *MED25* e *IMPA1* é residente no norte do estado da Paraíba. Uma provável origem europeia foi inferida para estas mutações. No entanto, é provável que tais alterações tenham se originado em território brasileiro, uma vez que não há relatos de indivíduos afetados por deficiência intelectual devida a essas mutações em outros países. A alteração presente no gene *WNT7A* tem provável ancestralidade nativo-americana, tendo sido originada possivelmente após mistura entre colonizadores europeus, africanos e nativo-americanos (de Farias et. al., 2018).

Em um estudo realizado também no Brasil foi realizada a genotipagem de repetições curtas em *tandem*, da região do braço curto do cromossomo 17, em doze famílias não aparentadas relacionadas entre si com a mutação c.1010G>A p.Arg337His no gene *TP53*, a qual é responsável pela Síndrome de Li-Fraumeni. A síndrome se caracteriza pela predisposição aumentada a vários

tipos de câncer, vários deles de início precoce. O haplótipo compartilhado entre as doze famílias foi comparado e foi identificado, por meio de bancos de dados genômicos, como tendo origem ibérico-portuguesa. Foi estimada para a mutação uma idade aproximada de 2000 anos, o que equivale a 72-84 gerações (Paskulin et. al., 2015).

Outro estudo sobre frequência e origem de mutações foi realizado em dois grupos de famílias sul-americanas, um grupo de famílias peruanas e um grupo de famílias brasileiras com ataxia espinocerebelar. Essas famílias apresentavam a expansão ATTCT no gene *ATNX10*, a qual está localizada no braço longo do cromossomo 22 e é responsável pelo distúrbio. A investigação de polimorfismos de microssatélites próximos ao gene em ambos os grupos revelou uma provável origem comum para a mutação em vários casos. Um dos haplótipos mais frequentemente compartilhados entre os dois grupos de famílias está presente em cerca de 80% dos cromossomos com a expansão, de ambos os grupos de famílias afetadas, além de ser compartilhado por cerca de 40% dos indivíduos controle de origem nativo-americana (ameríndios) (Bampi et. al., 2017).

Em resumo, a partir dos resultados obtidos, concluímos que a mutação c.2090T>G p.Leu697Trp no gene *MYO3A* explica cerca de 5% (5/103) dos casos de perda auditiva de herança autossômica dominante analisados. Tal frequência sugere que provavelmente há mais famílias com perda auditiva devido a esta mesma mutação no Brasil ou fora dele. Os resultados do Laboratório indicaram que a mutação deve ter surgido em um ancestral comum entre as cinco famílias há cerca de 675 anos.

Os achados desse estudo serão em breve submetidos a publicação.

Capítulo 5

Estudo molecular de famílias nas quais buscamos identificar a causa da perda auditiva por meio de sequenciamento massivo paralelo do exoma

5.1. Família 6

5.1.1. Resultados

A partir dos arquivos VCF anotados foram executadas duas estratégias de filtragem de variantes, de acordo com o que foi descrito na metodologia no item 3.2.6, seguidas das seguintes etapas: variantes presentes em três dos três indivíduos afetados com exoma analisado (II:3, IV:6 e IV:10) e variantes presentes em pelo menos dois dos três indivíduos com exoma analisado (IV:6 e IV:10). Da primeira estratégia, resultaram quatro variantes em comum entre os três afetados com exoma analisado (Anexo 1). A partir da segunda estratégia foram filtradas quarenta variantes em comum em dois dos três afetados com exoma sequenciado (Anexo 1). Uma delas chamou nossa atenção porque estava presente em gene de surdez já conhecido e relacionado à surdez de herança autossômica dominante. Esta variante, localizada no éxon 7 do gene *MYO7A* no cromossomo 11, é uma variante *missense*, de substituição de citosina por timina (c.689C>T) (Figura 13) que leva à substituição do aminoácido alanina por valina (p.Ala230Val) na posição 230 no domínio motor da proteína *MYO7A*. De acordo com o pacote computacional *Mutation Taster*, a mutação tem potencial patogênico, com uma probabilidade de 1. De acordo com o programa *SIFT*, o índice obtido foi zero, que indica elevada probabilidade de ser danosa. O *Polyphen* indicou uma previsão de patogenicidade de 100%. A variante também é considerada patogênica segundo o banco de dados *Deafness Variation Database* (<http://deafnessvariationdatabase.org/-letter/m>). A variante descrita não foi relatada em nenhum dos principais bancos de dados genômicos (*1000 Genomes*, *6500 Exomes*, *ExAC* e *AbrAOM*) que incluem indivíduos em teoria não afetados por doenças genéticas.

Devido ao fato de o gene *MYO7A* ser amplamente descrito na literatura por sua associação à surdez, foi realizado primeiramente o sequenciamento de Sanger desta mutação nos indivíduos afetados e não afetados da família,

mesmo ela estando presente no exoma de somente dois dos indivíduos afetados. A mutação foi encontrada nos seis indivíduos afetados da família e em nenhum dos indivíduos não afetados (Figura 14). Com estes resultados, concluímos que houve falha do sequenciamento massivo em paralelo do exoma do probando (um dos três selecionados da família com exoma analisado), porque a mutação não detectada no exoma, foi detectada por meio do sequenciamento de Sanger. Foi analisado o arquivo BAM da região do cromossomo 11 referente ao exoma do probando que não possuía a mutação c.689C>T p.Ala230Val no gene *MYO7A* no arquivo VCF anotado. Esta alteração, contudo, está presente no arquivo BAM (Figura 15), em duas leituras. Uma hipótese proposta para explicar a ausência desta mutação no arquivo VCF é a de que a cobertura ou quantidade de *reads* oriundas do sequenciamento massivo paralelo na região foi muito baixa, o que deve ter levado à falta de anotação no arquivo VCF. A região em que a mutação c.689C>T se encontra não é repetitiva, tampouco de alto conteúdo de bases guanina e citosina (C-G). Tais regiões são conhecidas por prejudicar a ligação da DNA polimerase à sequência de DNA de interesse, o que não permite um sequenciamento eficiente. Portanto, deve ter ocorrido alguma falha no sequenciamento de nova geração da amostra do probando da família 6, de razão desconhecida. A avaliação global da cobertura do exoma do probando foi realizada por meio do *software Integrative Genomics Viewer (IGV)* (<https://www.igv.org>).

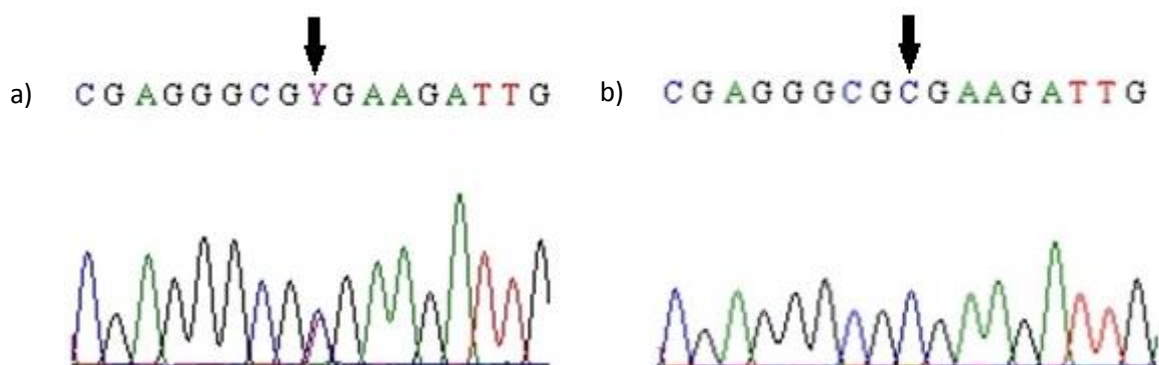


Figura 13: Eletroferogramas indicando com as setas em (a) a presença da mutação em heterozigose c.689C>Tp.Ala230Val no éxon 7 do gene *MYO7A* no indivíduo III:3 (probando) da genealogia da família 6 e em (b) a ausência da mutação no indivíduo IV:3 da genealogia.

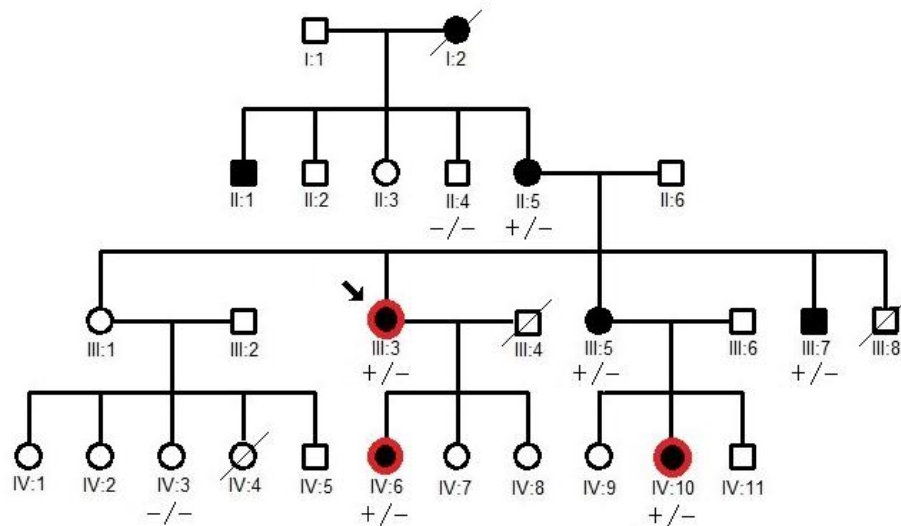


Figura 14: Genealogia da Família 6. Os três indivíduos afetados que foram selecionados para sequenciamento massivo paralelo do exoma estão circulos em vermelho. +/- indica a presença da mutação c.689C>T p.Ala230Val no gene *MYO7A* em heterozigose nos indivíduos afetados da família. -/- indica ausência da mutação.

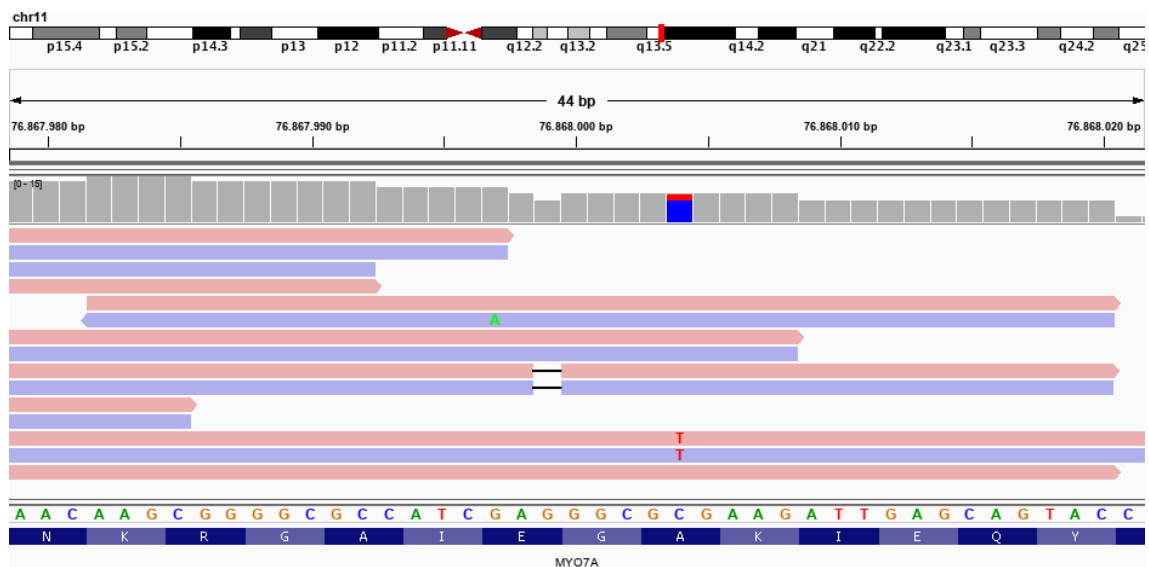


Figura 15: Arquivo BAM referente à região em que está a mutação c.689C>T p.Ala230Val no probando (indivíduo III:3 da genealogia) da Família 6. As duas *reads* com pontos em vermelho indicam a mutação c.689C>T p.Ala230Val no gene *MYO7A* e as demais sequências sem pontos em vermelho representam as 7 *reads* correspondentes ao sequenciamento do alelo selvagem.

5.1.2. Discussão

Miosinas classe VII são uma classe de miosinas não convencionais as quais consistem de duas isoformas codificadas por genes diferentes: *MYO7A* e *MYO7B* (<http://www.genecards.org/>). São caracterizadas pela presença de dois domínios FERM em sua extremidade C-terminal (Figura 16), e são essenciais para o crescimento de protrusões de actina, que estão presentes desde microvilosidades do intestino e do sistema fotorreceptor a estereocílios das células ciliadas da orelha interna (Friedman et. al., 1999; Wu et. al., 2011).

Embora numerosas mutações relacionadas a problemas auditivos e visuais tenham sido identificadas como alterando esses domínios FERM, pouco se sabe sobre as bases moleculares das interações desses domínios com outras moléculas. No entanto, é estabelecido que esses domínios são sítios de ligação a outras proteínas que ativam proteínas que os contêm (Li et. al., 2017).

A maior parte das mutações patogênicas neste gene estão relacionadas à síndrome de Usher (<http://deafnessvariation-database.org/letter/m>), um tipo de surdez sindrômica de herança autossômica recessiva caracterizada por perda auditiva sensorineural profunda ou parcial e perda de visão, com início na puberdade (Boughman et. al., 1983; Smith et. al., 1994). Tal síndrome pode ser classificada em quatro subtipos de acordo com a manifestação clínica. O tipo USH1 é caracterizado por perda auditiva congênita, profunda, sensorineural, defeitos no sistema vestibular e retinose pigmentar com manifestação na segunda década de vida. O tipo USH2 caracteriza-se por perda auditiva de leve a moderada, com manifestação de retinose pigmentar também na segunda década de vida e ausência de defeitos vestibulares (Moller et. al., 1989). O tipo USH3 tem como fenótipo a perda auditiva, defeitos no sistema vestibular e retinose pigmentar progressivos conforme o avanço da idade (Sankila et. al., 1995). O tipo USH4 é caracterizado por perda auditiva progressiva de moderada a severa, além de retinose pigmentar de início tardio. Não há comprometimento do sistema vestibular no tipo 4 (Khateb et. al., 2018). De acordo com o banco de dados *Deafness Variation Database*, há cerca de 300 mutações no gene *MYO7A* que tem relação com a síndrome de Usher.

Mutações no gene *MYO7A* também estão relacionadas com duas formas genéticas de surdez não sindrômica, uma de herança autossômica recessiva e outra de herança autossômica dominante, cujos loci foram denominados DFNB2 e DFNA11, respectivamente.

Alterações no gene *MYO7A* foram relacionadas pela primeira vez à perda auditiva não sindrômica por meio de um estudo com uma família tunisiana, que apresentava elevado número de casamentos consanguíneos. Foi realizado estudo de ligação com amostras de vinte e dois indivíduos desta família, os quais eram afetados por surdez não sindrômica de herança autossômica recessiva, de modo que a região mapeada a conter o gene

correspondeu ao braço curto do cromossomo 11. Tal região foi denominada de locus DFNB2 (Guilford et. al., 1994).

O gene *MYO7A* foi mapeado e numerado como locus DFNA11 em uma família japonesa com perda auditiva não síndrômica de herança autossômica dominante. Foi demonstrada uma deleção de nove pares de base no éxon 22 do gene *MYO7A*, a qual levou à deleção de três aminoácidos e o comprometimento da dimerização da proteína, de modo que o produto do alelo mutado prejudica a função do alelo selvagem, em um efeito dominante negativo (Liu et. al., 1997).

Até o momento, nove mutações diferentes no gene *MYO7A* foram implicadas em casos de perda auditiva não síndrômica de herança autossômica dominante (<http://deafnessvariation-database.org>).

A mutação c.689C>T (p. Ala230Val) no gene *MYO7A* por nós detectada foi descrita pela primeira vez por Leva et. al. (2006). Neste estudo, a modelagem molecular da proteína mutada indicou que a alteração de aminoácido ocorre no domínio motor da proteína (Figura 16). A posição 230 está localizada em uma região de alça no domínio motor. A substituição do aminoácido alanina por valina na posição 230 do domínio motor da miosina VIIA pode levar a interações estéricas desfavoráveis entre um gama metil na posição 230 e a cadeia lateral de um resíduo de isoleucina na posição 418 (Ile418). Supõe-se que a valina resultante da mutação de substituição Ala230Val desloca a Ile 418 de sua posição e deste modo altera a conformação na região de alça. No entanto, ainda não se sabe como a mutação Ala230Val causa a perda de audição. Embora o gene *MYO7A* seja expresso em uma variedade de tecidos, alterações da atividade de seu produto parecem ter efeitos apenas em alguns tecidos localizados nos olhos e na orelha interna (Leva et. al., 2006).

A mesma mutação foi descrita em um caso no Japão, de uma criança de cinco anos de idade com perda auditiva não síndrômica de herança autossômica dominante. Após exames físicos e otológicos não detectarem nenhuma anormalidade adicional na criança, o sequenciamento do exoma identificou a alteração c.689C>T em heterozigose no gene *MYO7A* no indivíduo, cuja família não possui histórico de perda auditiva. A mesma alteração não foi identificada nos pais da criança, e a mutação, neste caso, foi

considerada *de novo*, embora um possível mosaïcismo não tenha sido descartado (Kaneko et. al., 2017).

Devido à associação prévia da perda de audição a esta mutação descrita nos trabalhos de Leva et. al. (2006) e Kaneko et. al. (2017), consideramos que esta é causa de surdez não sindrômica de herança autossômica dominante na família 6.



Figura 16: Diagrama esquemático da estrutura proteica MYO7A, com o domínio motor na porção N-terminal e os dois domínios FERM na porção C-terminal. CC – Coiled Coil Domain (Domínio em espiral); IQ – Motivo de ligação à Calmodulina; MyTH4-cauda homóloga 4 da miosina; SH3-Domínio homólogo 3 –SRC. Fonte: Modificado de: (Jaij et.al., 2007).

5.2. Família 7

5.2.1. Resultados

Os estudos moleculares relacionados à família 7 foram iniciados durante o período da iniciação científica.

No início do estudo, contávamos com o sequenciamento do exoma de amostras de três indivíduos afetados da família. Em primeiro lugar, por meio do arquivo VCF, foi realizada a filtragem de variantes de acordo com a metodologia explicada no item 3.2.6 e, a seguir, foram filtradas as variantes em comum presentes nos três indivíduos afetados da família com exoma analisado (III:6 III:35 e IV:41; Figura 8). Essa estratégia revelou seis variantes candidatas (Tabela 2), cuja segregação foi estudada por sequenciamento de Sanger. Nenhuma destas seis variantes segregou de modo a explicar o quadro de surdez de herança autossômica dominante nesta família (Tabela 3).

Em virtude dessa exclusão, modificamos a estratégia de filtragem. Passamos, então, a filtrar variantes presentes em pelo menos dois dos três indivíduos com o exoma analisado. A filtragem resultou em 18 variantes selecionadas que estavam presentes no exoma de dois indivíduos (Tabela 4).

Para reduzir a lista de variantes candidatas ao estudo de segregação, realizamos, em paralelo, estudos de ligação com cálculos de *Lod score* em colaboração com o aluno de doutorado Vinícius M. Borges. Esse cálculo foi realizado com base nos resultados da genotipagem dos SNPs em *arrays*, de amostras de 8 indivíduos afetados (II:3, II:5, III:6, III:11, III:23, III:35, IV:18, IV:41

da genealogia da família). O valor mais alto obtido de *Lod score* de múltiplos pontos foi de 2,68, em uma região do braço curto do cromossomo 6 (Figura 17). Em virtude do resultado, selecionamos para sequenciamento de Sanger primeiramente as quatro variantes da Tabela 4 que estavam localizadas em genes do cromossomo 6, mais especificamente, nos genes *TRIM38*, *WDR46*, *RAB44* e *DST*. Os resultados da investigação destas mutações nos 16 afetados e nos 39 não afetados da família, por meio do sequenciamento de Sanger, assim como a idade de cada um dos indivíduos na data da coleta da amostra, estão apresentados na Tabela 5.

O sequenciamento de Sanger revelou o mesmo padrão de segregação das variantes presentes nos genes *TRIM38*, *WDR46*, *RAB44* e *DST* entre os indivíduos afetados. Elas estavam presentes nos mesmos 14 indivíduos afetados e ausentes nos mesmos dois indivíduos afetados da família (Tabela 5). Além disso, vários dos não afetados apresentam estas variantes (Tabela 5). Dentre estas variantes, a que tem menor número de portadores entre os não afetados é a presente no gene *TRIM38*, com dez indivíduos que a possuem e não manifestam surdez. Isso significa que esta variante seria a melhor candidata das quatro a explicar o quadro de perda auditiva na família do ponto de vista de sua segregação nos indivíduos não afetados.

Admitir que uma dessas variantes esteja relacionada ao quadro significa assumir que a variante teria penetrância incompleta. Um fator que complica essa análise é o fato de que a deficiência auditiva na família tem manifestação tardia, com a idade de manifestação variando entre 7 até 40 anos, com média aos 21 anos. Logo, a penetrância também deve variar na família em função da faixa etária dos indivíduos.

A idade de cada um dos não afetados que herdaram ao menos uma das quatro variantes é: III:8(55 anos), III:24(58 anos), III:26(57 anos), III:33(53 anos), IV:1(38 anos), IV:13(35 anos), IV:14(34 anos), IV:15(32 anos), IV:20(15 anos), IV:21(9 anos), IV:29(28 anos), IV:30(29 anos), IV:35(18 anos), IV:36(13 anos), IV:37(24 anos), IV:49(26 anos), IV:55(27 anos). Poderíamos supor que indivíduos com até cerca de quarenta anos de idade teriam ainda chance de vir a manifestar a perda auditiva, mas seria improvável que os indivíduos com mais de cinquenta anos venham a manifestar, a não ser que houvesse de fato penetrância incompleta.

O padrão de segregação observado não permite concluir se as variantes nesses quatro genes estão de fato relacionadas à surdez nessa família.

Nenhum desses quatro genes havia sido descrito previamente na literatura como sendo relacionados à perda auditiva (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/>).

Recentemente, foi enviada ao Centro de Pesquisa Sobre o Genoma Humano e Células-Tronco (CEGH-CEL) uma amostra adicional de um indivíduo afetado para sequenciamento massivo em paralelo do exoma (indivíduo IV:28 da genealogia).

Foi realizada a filtragem de variantes desse indivíduo isoladamente das demais amostras. O indivíduo não apresentou nenhuma variante candidata a estar diretamente relacionada à surdez. Também foi realizada uma filtragem de variantes em comum entre os indivíduos IV:28, IV:41 e III:35, uma vez que estes três indivíduos herdaram as quatro variantes que segregam em bloco no cromossomo 6. Partimos do pressuposto que o indivíduo III:6, que não herdou o bloco de variantes do cromossomo 6 poderia ter outra causa para a deficiência auditiva. Nenhuma variante em comum foi observada entre esses três indivíduos.

Realizamos então uma seleção de variantes em comum entre os indivíduos IV:28 e III:35. O resultado está apresentado na Tabela 6. Nenhuma das nove variantes está presente em gene de surdez conhecido. Também não identificamos nenhuma variante em comum entre os indivíduos IV:28 e IV:41.

O fato de que as quatro variantes no cromossomo 6 estavam presentes em 14 dos 16 afetados da família 7 nos motivou a analisar o arquivo BAM dos indivíduos afetados que tiveram exoma sequenciado, uma vez que a cobertura de algum(s) gene(s) de surdez conhecido presente no cromossomo 6 poderia não ser adequada e, conseqüentemente, a presença de eventuais mutações conhecidas ser erroneamente descartada. Tal análise foi realizada por meio do software *Integrative Genomics Viewer* (IGV) (<https://www.igv.org>). Foram analisados os arquivos BAM dos seguintes genes de surdez conhecidos presentes no cromossomo 6: *SERPINB6* (DFNB91), *DCDC2* (DFNB66), *RIPOR2* (DFNB104), *COL11A2* (DFNB53/DFNA13), *LHFPL5* (DFNB67), *CLIC5*

Tabela 2. As seis variantes em comum em 3/3 exomas (indivíduos afetados III:6, III:35 e IV:41), que foram selecionadas a partir do VCF da Família 7 com suas respectivas frequências nos principais bancos de dados genômicos e seus respectivos scores de previsão de patogenicidade de acordo com os pacotes utilizados. ND significa "não descrito", ou seja, a variante nunca foi descrita no banco de dados.

Gene	Refseq	Alteração DNA	Alteração proteica	dbSNP	1000 Genomes	6500 Exomes	ExAC	AbrAOM	ClinVAR	SIFT	Polyphen	Mutation Taster
CAMK2B	NM_001293170	c.1067C>T	p.Thr356Met	rs774876084	0	0	0	0	ND	Deleterious	Benign	Disease Causing
CRYBG3	NM_153605	c.7673C>T	p.Pro255Leu	rs74855154	0,0002	0,0003	0,0003	0	ND	Tolerated	Benign	Disease Causing
IMPG2	NM_016247	c.310C>T	p.His104Tyr	rs756636951	0	0	0,0082	0,00082	ND	Deleterious	Probably Damaging	Disease Causing
NME8	NM_016616	c.1509A>T	p.Lys503Asn	-	0	0	0	0	ND	Tolerated	Benign	Disease Causing
POLM	NM_013284	c.659G>C	p.Gly220Ala	rs28382644	0,0032	0,0052	0,0071	0,0049	ND	Deleterious	Probably Damaging	Disease Causing
PQLC3	NM_152391	c.176A>G	p.Tyr59Cys	rs145348720	0	0	0,0082	0	ND	Deleterious	Probably Damaging	Disease Causing

Tabela 3: Resultado do estudo de segregação das seis variantes que estão em comum em 3/3 exomas (indivíduos afetados III:6, III:35 e IV:41) da Família 7. Os indivíduos afetados da família que tiveram exoma analisado estão destacados em cor verde. S indica presença da variante em heterozigose; N indica ausência da variante.

Indivíduos afetados	Idade na data da coleta (anos)	Idade de manifestação (anos)	IMPG2 c.310C>T p.His104Tyr	NME8 c.150A>T p.Lys503Asn	CRYBG3 c.7673C>T p.Pro255Leu	PQLC3 c.176A>G p.Tyr59Cys	CAMK2B c.1067C>T p.Thr365Met	POLM c.659G>C p.Gly220Ala
II:1	77	40	S	N	S	S	S	N
II:3	88	40	S	S	S	N	S	S
II:5	86	40	S	S	S	S	N	S
II:7	85	40	S	S	S	S	S	S
II:10	90	10	S	S	S	N	S	S
III:6	58	20	S	S	S	S	S	S
III:10	51	40	S	N	S	S	N	N
III:11	56	Desconhecida	N	N	N	N	N	N
III:17	58	7	S	N	S	N	N	N
III:18	56	Desconhecida	S	S	S	N	S	S
III:23	47	6	N	S	N	N	S	S
III:29	57	7	S	S	S	N	S	S
III:35	49	8	S	N	S	S	S	S
IV:18	27	15	N	S	N	N	N	N
IV:28	23	22	N	N	N	N	N	N
IV:41	9	7	S	S	S	S	S	S

Tabela 4. As 18 variantes presentes em 2/3 exomas, que foram selecionadas a partir dos VCF da Família 7 com suas respectivas frequências nos principais bancos de dados genômicos e seus scores de previsões de patogenicidade de acordo com os pacotes utilizados. NA significa "não aplicável", ou seja, o programa de previsão não é capaz de prever a patogenicidade. ND significa "não descrito", ou seja, a variante nunca foi incluída no banco de dados.

Gene	RefSeq	Alteração DNA	Alteração proteica	dbSNP	1000 Genomes	6500 Exomes	ExAC	AbrAOM	ClinVAR	SIFT	Polyphen	Mutation Taster
ALG10	NM_032834	c.1130A>G	p.Tyr377Cys	-	0	0	0,008	0	ND	Deleterious	Probably Damaging	Disease Causing
ARMC5	NM_001105247	c.2444C>T	p.Ala815Val	-	0	0,0007	0	0	ND	Tolerated	Benign	Polymorphism
ASB8	NM_001319297	c.227G>A	p.Gly76Glu	-	0	0	0	0	ND	Deleterious	Benign	Disease Causing
CTR9	NM_014633	c.2590C>T	p.Arg864Cys	-	0	0	0	0	ND	Deleterious	Benign	Disease Causing
DST	NM_015548	c.6862C>A	p.Pro2288Thr	rs201412680	0	0,00008	0,0001	0	ND	Deleterious	Probably Damaging	Disease Causing
ETV7	NM_06135	c.241G>A	p.Glu81Lys	rs61757380	0,0028	0,0053	0,0035	0	ND	Deleterious	Possibly Damaging	Disease Causing
MAPK3	NM_002746	c.1018-4>C	-	-	0	0,0007	0	0	ND	NA	NA	Polymorphism
MSR1	NM_138715	c.1-5G>C	-	-	0,0012	0,0006	0,0007	0	ND	NA	NA	Disease Causing
MYOM1	NM_003803	c.2087G>T	p.Arg696Leu.	-	0	0	0,00001	0	ND	Deleterious	Probably Damaging	Disease Causing
POTEG	NM_001005356	c.1213C>T	p.Pro405Ser	rs146788089	0,0011	0	0,0031	0,0033	ND	Deleterious	Benign	Polymorphism
PPP4R2	NM_001318028	c.167A>G	p.Lys56Arg	rs11334840	0	0,005	0	0,005	ND	Deleterious	Benign	Disease Causing
RAB44	NM_001257357	c.1877C>T	p.Pro626Leu	-	0	0	0	0,00088	ND	Tolerated	Benign	Polymorphism
SPCS1	NM_014041	c.298A>G	p.Ile100Val	-	0	0	0	0	ND	Tolerated	Benign	Disease Causing
TBC1D0B	NM_015527	c.2047G>A	p.Val683Ile	rs188813224	0,0003	0,0006	0,0008	0,0008	ND	Tolerated	Benign	Polymorphism
TRIM38	NM_006355	c.1350dupC	p.Phe450fs	-	0	0	0	0	ND	Deleterious	Possibly Damaging	Disease Causing
TSNXAIP1	NM_001288994	c.1042C>T	p.Arg348Trp	rs140308084	0,0002	0,0002	0,0002	0	ND	Deleterious	Probably Damaging	Polymorphism
WDFY3	NM_014991	c.1469A>T	p.Thr490Ile	rs202188955	0	0,002	0,002	0	ND	Tolerated	Benign	Disease Causing
WDR46	NM_005452	c.1556G>A	p.Arg519Gln	rs772459571	0	0	0,008	0	ND	Tolerated	Possibly Damaging	Disease Causing

(DFNB103), *POLR1C* (TCOF3), *COL9A1* (STL4), *MYO6* (DFNB37/DNFA22), *CD164* (DFNA66) e *EYA4* (DFNA10). Não foi identificada nenhuma cobertura de *reads* inadequada para a identificação de mutações no BAM dos indivíduos analisados. Também investigamos na amostra do afetado IV-41, que teve exoma analisado, a possível presença de variações em número de cópia (CNVs) que pudesse explicar a perda auditiva nestes indivíduos. Esta análise foi realizada por meio do *Nexus Copy Number Software* (https://www.illumina.com/clinical_informatics/nexus_copy_number.html). Como resultado, não foram identificadas CNVs potencialmente patogênicas nesse indivíduo. Cumpre destacar que anteriormente havia sido realizada em uma amostra da família a técnica de *array* CGH (Design 22060 - Agilent Technologies) que havia revelado resultados normais.

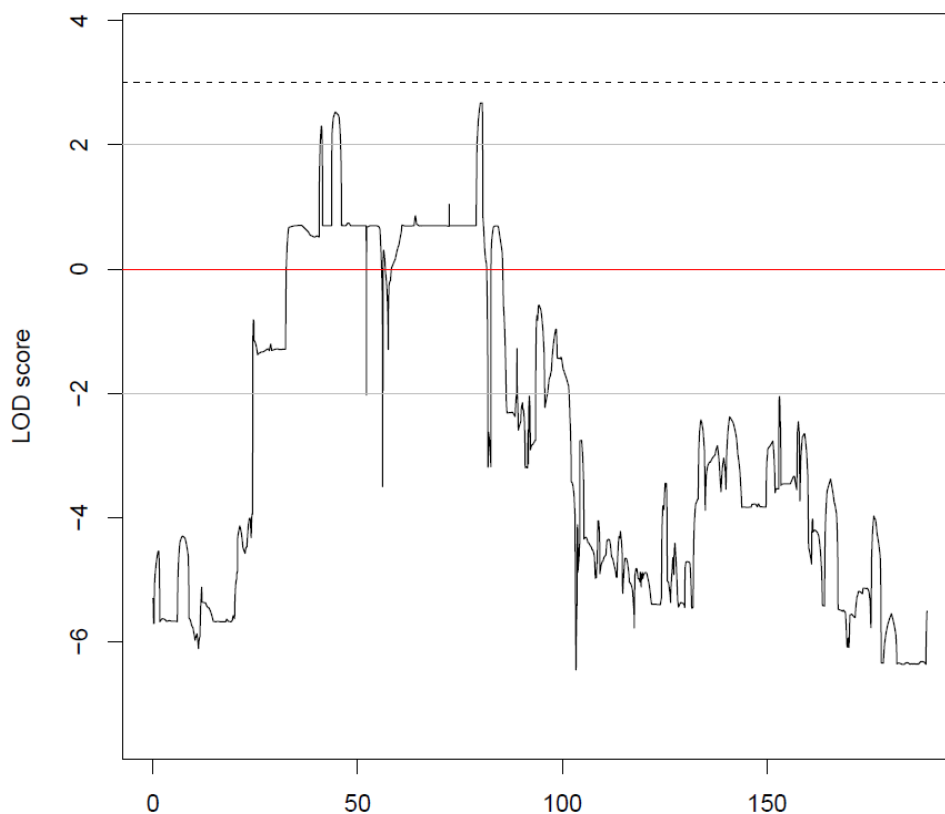


Figura 17: Resultado dos cálculos de *Lod scores* de múltiplos pontos do cromossomo 6 de 8 indivíduos afetados da Família 7 que foram genotipados por *array* de SNPs.

Tabela 5. Resultado do estudo de segregação das quatro variantes presentes no cromossomo 6 selecionadas que estavam presentes em 2/3 exomas nos 16 afetados e nos 39 não afetados, a idade de todos estes indivíduos na data da coleta e a idade de manifestação dos indivíduos afetados. Os indivíduos afetados que tiveram exoma analisado estão destacados em cor verde. Os indivíduos afetados e não afetados estão separados na tabela por uma linha dupla. S indica presença da variante em heterozigose; N indica ausência da variante.

Indivíduos	Idade na data da coleta (anos)	Idade de manifestação (anos)	TRIM38 c.1350dupC p.Phe450fs	WDR46 c.1556G>A p.Arg519Gln	RAB44 c.1877C>T p.Pro626Leu	DST c.6862C>A p.Pro2288Thr
Afetados						
II:1	77	40	S	S	S	S
II:3	88	40	S	S	S	S
II:5	86	40	S	S	S	S
II:7	85	40	S	S	S	S
II:10	90	10	S	S	S	S
III:6	58	20	N	N	N	N
III:10	51	40	S	S	S	S
III:11	56	Desconhecida	S	S	S	S
III:17	58	7	S	S	S	S
III:18	56	Desconhecida	S	S	S	S
III:23	47	6	S	S	S	S
III:29	57	7	N	N	N	N
III:35	49	8	S	S	S	S
IV:18	27	15	S	S	S	S
IV:28	23	22	S	S	S	S
IV:41	9	7	S	S	S	S
Não afetados						
II:6	86	-	N	N	N	N
II:11	86	-	N	N	N	N
III:8	55	-	S	S	S	S
III:20	54	-	N	N	N	N
III:24	58	-	S	S	S	S
III:26	57	-	S	S	S	S
III:31	56	-	N	N	N	N
III:33	53	-	S	S	S	S
III:39	49	-	N	N	N	N
III:41	47	-	N	N	N	N
III:43	30	-	N	N	N	N
IV:1	38	-	N	N	N	S
IV:11	30	-	N	N	N	N
IV:12	30	-	N	N	N	N
IV:13	35	-	S	S	S	N
IV:14	34	-	N	S	N	S
IV:15	32	-	N	S	N	S
IV:20	15	-	N	N	S	N
IV:21	9	-	N	N	N	S
IV:27	24	-	N	N	N	N
IV:29	28	-	S	S	S	N
IV:30	29	-	S	S	S	N
IV:31	35	-	N	N	N	N
IV:32	32	-	N	N	N	N
IV:34	33	-	N	N	N	N
IV:35	18	-	N	S	N	S
IV:36	13	-	S	S	S	S
IV:37	24	-	N	S	N	N
IV:38	20	-	N	N	N	N
IV:42	33	-	N	N	N	N
IV:46	30	-	N	N	N	N
IV:47	26	-	N	N	N	N
IV:48	16	-	N	N	N	N
IV:49	26	-	S	S	S	S
IV:53	31	-	N	N	N	N
IV:54	29	-	N	N	N	N
IV:55	27	-	N	N	S	N
IV:56	23	-	N	N	N	N
IV:58	57	-	S	N	N	N

Tabela 6. As nove variantes presentes em comum entre os exomas dos indivíduos IV:28 e III:35, que foram selecionadas a partir dos VCF da família 7 com seus respectivos scores de previsão de patogenicidade, de acordo com os pacotes utilizados, e suas respectivas frequências nos principais bancos de dados genômicos. ND significa "não detectado", ou seja, a variante nunca foi incluída no banco de dados genômico.

Gene	RefSeq	Alteração DNA	Alteração proteica	dbSNP	1000 Genomes	6500 Exomes	ExAC	AbrAOM	ClinVAR	SIFT	Polyphen	Mutation Taster
ALG10	NM_032834	c.1130A>G	p.Tyr377Cys	-	0	0	0	0	ND	Tolerated	Probably Damaging	Disease Causing
ASPG	NM_00108064	c.1508C>T	p.Thr503Met	rs201499159	0,0008	0,000078	0,0007	0,0016	ND	Tolerated	Probably Damaging	Disease Causing
EPHA10	NM_001099439	c.1853G>A	p.Arg618His	rs185125332	0,0012	0,0042	0,0035	0,0074	ND	Deleterious	Probably Damaging	Disease Causing
FBXL4	NM_001278716	c.526C>T	p.Trp176Arg	rs201149065	0,0002	0,00007	0	0	Uncertain Significance	Deleterious	Probably Damaging	Disease Causing
NPNT	NM_001033047	c.1142C>T	p.Pro381Leu	rs143758714	0,0024	0,0037	0,0038	0,005	ND	Tolerated	Probably Damaging	Disease Causing
MAG	NM_002361	c.452C>T	p.Ala151Val	rs140308084	0,0024	0,0037	0,0044	0	ND	Tolerated	Probably Damaging	Disease Causing
ODF1	NM_024410	c.51G>C	p.Lys17Asn	-	0,002	0,0026	0,0027	0,0041	ND	Deleterious	Possibly Damaging	Disease Causing
RAD54B	NM_012415	c.2345A>G	p.Gln782Arg	rs14125112	0	0,0003	0,0005	0	ND	Deleterious	Probably Damaging	Disease Causing
VWA1	NM_022834	c.232G>A	p.Val78Met	-	0	0	0	0	ND	Deleterious	Probably Damaging	Disease Causing

5.2.2. Discussão

A presença de variantes candidatas em quatro genes do cromossomo 6 que segregaram com o fenótipo de surdez na maior parte dos afetados nos motivou a investigar sobre possíveis relações entre as funções de seus produtos com a de produtos de genes relacionados à perda de audição.

O gene *TRIM38*, localizado em 6p.22, tem expressão predominante nas hemácias e nos rins (<https://www.genecards.org/>). De acordo com o banco de dados *International Mouse Phenotyping Consortium* (<https://www.mousephenotype.org>), o gene *TRIM38* não se expressa na cóclea. A família de proteínas TRIM está relacionada a processos biológicos, como regulação da transcrição e vias de sinalização implicadas em processos inflamatórios e na imunidade inata (Uchil et. al., 2013). Deste modo, o gene *TRIM38* inibe excessos de resposta inflamatória do organismo, uma vez que seu produto inibe determinadas citocinas que podem desencadear doenças como artrite reumatóide, câncer e outras doenças inflamatórias (Hu et. al., 2014). No caso de pacientes com artrite reumatóide, a incidência de perda auditiva sensorioneural varia de 25 a 72% (Ramos et. al., 2014). Recentemente, um estudo revelou que a incidência de perda auditiva em pacientes com artrite reumatóide é de 66% (Tsirves et. al., 2019). Não houve menção em avaliação preliminar dos pacientes a artrite reumatoide. Seria interessante recontactar os pacientes e perguntar especificamente se há relatos de artrite reumatóide na família. A variante c.1350dupC não foi detectada por nenhum dos principais bancos de dados genômicos, o que indica que é rara, o que falaria a favor de ser causativa. Uma vez que esta variante é um *frameshift*, os pacotes de previsão não estimam a probabilidade de patogenicidade, mas mutações de quadro de leitura frequentemente acarretam perda de função da proteína. A variante c.1350dupC é a que está presente em um menor número de não afetados, sendo a melhor candidata do ponto de vista da segregação.

O gene *WDR46* localiza-se em 6p21.32. Sua expressão é acentuada nas glândulas adrenal, pituitária e baço (<https://www.genecards.org/>). De acordo com o banco de dados *International Mouse Phenotyping Consortium* (<https://www.mousephenotype.org>), o gene *WDR46* não se expressa na cóclea.

A proteína codificada por este gene está relacionada a respostas imunológicas (Herberg et. al., 1998). Altas concentrações da proteína WDR46 foram isoladas de indivíduos com regressão de melanoma, de modo que leucócitos destes pacientes apresentaram reações contra peptídeos que desencadeiam este tipo de câncer. Logo, foi proposto que o produto deste gene pode ter função imunológica e cumprir importante papel na destruição do tumor (Rosenberg et. al., 2002). A frequência da variante c.1556 G>A é próxima de zero nos principais bancos de dados genômicos, com exceção do *AbrAOM*, no qual ela não foi encontrada. Logo, do ponto de vista da frequência, esta variante não seria descartada como causa de perda auditiva, uma vez que é rara. A variante presente neste gene é considerada patogênica segundo o *Polyphen* e o *Mutation Taster*. No entanto, é considerada tolerável no *SIFT*. Isto poderia descartar a variante como responsável pela perda auditiva na família. Do ponto de vista da segregação, a variante c.1556 G>A está presente no maior número de não afetados em relação às outras três variantes, correspondendo ao pior resultado de estudo de segregação entre os quatro genes.

Pudemos observar com a revisão da literatura que os produtos dos genes *TRIM38* e *WDR46* têm relação com respostas imunológicas e inflamatórias. Outros genes de surdez conhecidos têm o seu produto direta ou indiretamente relacionados a processos inflamatórios. O gene *EYA4* (DFNA10) está localizado em 6q23.2, sendo um gene relacionado a surdez não síndrômica de herança autossômica dominante, cujo produto também tem relação com respostas inflamatórias (Wayne et. al., 2001). Okabe et. al. demonstraram por meio de estudo funcional em camundongos que a função de seu produto consiste na regulação de respostas imunológicas, por meio da desfosforilação de proteínas intermediárias de sinalização em resposta à invasão de patógenos (Okabe et. al., 2009). Dentre as proteínas de sinalização que interagem com o produto do gene *EYA4*, estão as quimiocinas, que são codificadas pelo gene *CXCL10*, o qual é expresso em monócitos. A quimiocina, ao ser estimulada por proteínas denominadas interferons, tem a função de recrutar células do sistema imunológico, como células T, células dendríticas, monócitos e macrófagos durante a resposta imune (Dufour et. al., 2002). No sistema auditivo, a função exata do produto do gene *EYA4* ainda não foi esclarecida (Varga et. al., 2019), embora tenha sido observada, por meio de

hibridização *in situ* na orelha interna de camundongos, expressão do gene *EYA4* durante o período embrionário e após o desenvolvimento do embrião destes camundongos, o que sugere a sua participação na manutenção do desenvolvimento e função coclear, mesmo após a formação do embrião (Wayne et. al., 2001). O gene *NLRP3* (DFNA34) já foi relacionado à surdez não síndrômica de herança autossômica dominante. Está localizado em 1q44 e é expresso em células do sistema imune, como monócitos e macrófagos. Há mutações de ganho de função nesse gene que desencadeiam o fenótipo de surdez, uma vez que tais alterações induzem uma resposta exagerada do sistema imune à invasão de patógenos na cóclea, causando inflamação na estrutura e conseqüente perda de audição (Nakanishi et. al., 2017). Portanto, genes candidatos relacionados à inflamação ou imunidade não seriam *a priori* descartados por causa de sua função.

O gene *RAB44* localiza-se em 6p21.2 e pertence à família de proteínas GTPases, as quais controlam o tráfego de substâncias na membrana intracelular por meio da constante mudança entre as formas ativas GTP e inativas GDP (Stenmark, 2009). Tem expressão predominante nas células sanguíneas, embora também seja expresso significativamente nos pulmões e na pele (<https://www.genecards.org/>). De acordo com o banco de dados *International Mouse Phenotyping Consortium* (<https://www.mousephenotype.org>), o gene *RAB44* não se expressa na cóclea. Embora este gene tenha sido encontrado em genomas de mamíferos, nenhum estudo sobre sua função havia sido realizado até o ano de 2017, quando um trabalho levou à identificação da proteína RAB44 como sendo um regulador negativo da diferenciação de osteoclastos, de modo que o silenciamento deste gene, por meio de pequenos RNAs de interferência (siRNAs), resulta no crescimento e no aumento de reabsorção óssea destas células, que são responsáveis pela remodelação e regeneração do tecido ósseo (Yamaguchi et. al., 2017).

Outros genes já relacionados com surdez têm funções relacionadas ao desenvolvimento do tecido ósseo. O gene *COL11A2* (DFNB53, DFNA13) está localizado em 6p21, e está relacionado à perda auditiva não síndrômica de herança autossômica recessiva e dominante. Seu produto é o colágeno tipo XI alfa 2, cuja função no sistema auditivo é contribuir com a estrutura da

membrana tectorial na cóclea. Um estudo funcional com camundongos demonstrou que mutações neste gene afetam o domínio de tripla hélice do colágeno. Como consequência, tais alterações desencadeiam malformação da membrana tectorial e resultam em perda de audição (McGuirt et. al., 1999). Tal gene foi também relacionado com crescimento ósseo, uma vez que defeitos no gene *COL11A2* promovem um crescimento exagerado dos ossos dos cotovelos e joelhos, além de problemas nas articulações em pessoas ou camundongos (Brunner et. al., 1994; Vikkula et. al., 1995). O gene *ATP6V1B1* pertence à família de enzimas bombeadoras de prótons V-ATPases. Localiza-se em 2p13.3 e está relacionado com perda auditiva sindrômica de herança autossômica recessiva associada a defeitos de reabsorção nos rins. O produto deste gene cumpre função de reabsorção de prótons, uma vez que bombeia íons de hidrogênio para manutenção do pH da endolinfa na cóclea e da urina nos rins (Karet et. al., 1999). Proteínas da família das V-ATPases também estão relacionadas à reabsorção óssea, promovendo a reabsorção de prótons nos osteoclastos e, conseqüentemente, a remodelagem dos ossos (Sun-Wada et. al., 2003). Essas informações, portanto, indicam que o gene *RAB44*, relacionado ao desenvolvimento de ossos, não seria também descartado pela sua função.

A frequência da variante c.1877C>T no gene *RAB44* é próxima de zero nos principais bancos de dados genômicos, com exceção do *ExAC*, no qual ela não foi detectada. Portanto, do ponto de vista da frequência esta variante também não seria descartada como causa de surdez devido à sua raridade na população. Contudo, tal alteração não é considerada patogênica pelos programas *Polyphen*, *SIFT* e *Mutation Taster*, o que não a indica como possível causa de perda auditiva na família.

O gene *DST* codifica uma proteína chamada de distonina e localiza-se em 6p12. O gene expressa-se na maioria dos tecidos. No entanto, sua expressão é predominante no sistema nervoso, músculo, pulmões, pele e próstata (<https://www.genecards.org/>). O produto deste gene tem como função ancorar filamentos intermediários do citoesqueleto a filamentos de actina. Defeitos neste gene resultam em desestabilidade da estrutura dos axônios e degeneração do tecido nervoso devido à perda da capacidade da ligação da distonina a filamentos de actina (Yang et. al., 1999). A função do produto do

gene *DST* está relacionada com a manutenção do citoesqueleto nas células do sistema nervoso central. O gene de surdez já conhecido *TRIOBP* (DFNB28) está localizado em 22q13.1 e está relacionado à perda auditiva não sindrômica de herança autossômica recessiva (Shahin et. al., 2006). Seu produto exerce uma função semelhante à da distonina, uma vez que participa da organização de citoesqueletos de actina. A proteína *TRIOBP* atua na organização de filamentos de actina dos estereocílios das células ciliadas da cóclea (Seipel et. al., 2001). Outros genes já relacionados à surdez também expressam proteínas relacionadas ao citoesqueleto, como é o caso dos genes das miosinas descritos na sessão 1.4. O gene da distonina (*DST*) poderia potencialmente ser candidato a gene relacionado à surdez em virtude de sua relação com o citoesqueleto. De acordo com o banco de dados *International Mouse Phenotyping Consortium* (<https://www.mousephenotype.org>), o gene *DST* se expressa na cóclea. No entanto, de acordo com tal banco de dados, sua expressão na orelha interna é considerada como não significativa. Além disso, em um estudo realizado por Liu et. al. (2014) foi analisada em camundongos a expressão de genes envolvidos no ciclo celular de células ciliadas, peculiares porque não se regeneram após danos em mamíferos. A análise da expressão de tais genes tem o potencial de identificação de alguns genes candidatos a serem manipulados futuramente para induzir regeneração de células ciliadas em mamíferos. Dos 85 genes já conhecidos por participarem do ciclo celular, 67 são expressos nas células ciliadas. O gene *DST* é um destes genes, que é expresso nas células ciliadas externas da cóclea do camundongo (Liu et. al., 2014).

Dos quatro genes do cromossomo 6 contendo variantes candidatas, o gene *DST* parece ser o melhor candidato a ter relação com o fenótipo da surdez, em virtude do seu padrão de expressão. A frequência da variante c.6862C>A é próxima de zero nos principais bancos de dados genômicos e no *AbrAOM* ela não ocorre. A variante é considerada patogênica de acordo com os principais pacotes de previsão. Portanto, a variante não seria descartada como possível causa de perda audição de acordo com sua frequência e previsão de patogenicidade. Contudo, a variante está presente em um número grande de indivíduos não afetados, o que seria uma evidência que esta alteração não seria responsável pela perda auditiva. Embora não possamos afirmar no

momento que alguma(s) das quatro variantes é causativa, poderíamos especular que pelo menos os dois indivíduos afetados que não herdaram as quatro mutações sejam fenocópia e que os que herdaram o haplótipo, mas não manifestaram seriam casos de penetrância incompleta. A fenocópia não é rara em grandes famílias com surdez. Nas famílias 1 e 2 descritas nessa dissertação, e cuja causa de perda auditiva é a mutação c.2090T>G no gene *MYO3A*, também ocorreram fenocópias.

O fato de que um bloco de variantes está presente em 14 dos 16 afetados sugere que a variante causativa possa estar mesmo localizada no cromossomo 6, ainda que não seja nenhuma das quatro candidatas aqui destacadas. Isso permitiria especular que há uma alteração nessa região que poderia explicar o quadro, que segrega em ligação com o bloco de quatro variantes aqui estudadas.

A região do cromossomo seis (Chr:6 25630336-25806209) que inclui os quatro genes com variantes que segregaram em bloco (*TRIM38*, *RAB44*, *WDR46*, *DST*) tem um tamanho de 175.986 pares de bases (<https://www.ensembl.org>). Dos genes já relacionados à surdez que estão presentes no cromossomo 6 (Figura 18), os genes *POLR1C* e *COL9A1* estão relacionados à surdez síndrômica (síndrome de Treacher Collins e síndrome de Stickler, respectivamente). A maior parte desses genes estão localizados no braço curto deste cromossomo. A inspeção dos arquivos BAM nas regiões correspondentes a esses genes não indicou alteração que pudesse ter escapado no processo de anotação que resultou no VCF.

O fato de que todas as variantes em comum entre os indivíduos IV:28, IV:41 e III:35 tenham sido excluídas pelo estudo de segregação indica, portanto, a possibilidade de mais de uma alteração ser responsável pelo quadro de perda auditiva na família. Outra hipótese seria a de que há uma variante causativa localizada em um íntron ou em alguma região regulatória do genoma, como promotor ou *enhancer*, regiões não avaliadas pelo sequenciamento do exoma, ou até mesmo uma pequena alteração de número de cópias, não detectada por *array* CGH realizado previamente (Rosenberg et al., 2016). Se for esse o caso, o estudo de ligação sugere que essa variante estaria possivelmente localizada no cromossomo 6, próxima ao conjunto das quatro variantes aqui destacadas.

Em resumo, embora não tenha sido possível identificar a causa genética de perda auditiva não sindrômica de herança autossômica dominante na Família 7, nossos resultados sugerem que o haplótipo contendo as quatro variantes estudadas nos genes *TRIM38*, *WDR46*, *RAB44* e *DST*, presentes no cromossomo 6 e que foram herdadas por 14 dos 16 afetados, podem ter relação com a segregação da alteração que causa surdez na família.

Caso uma das quatro variantes candidatas tenha de fato papel na surdez, a variante no gene *DST* parece a melhor candidata, em virtude da função da proteína e do seu padrão de expressão que inclui a cóclea.

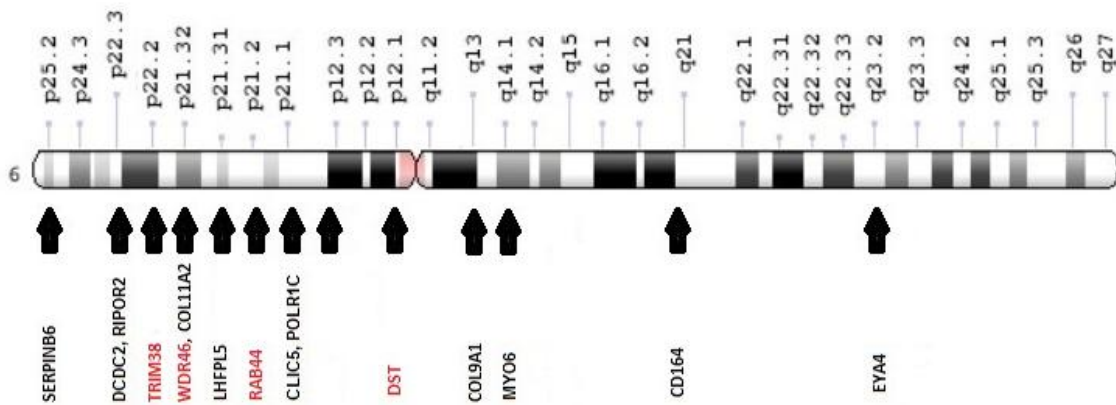


Figura 18: Diagrama que representa o cromossomo seis, indicando a localização de todos os genes relacionados à surdez que estão presentes neste cromossomo. Dentre eles, estão destacados em cor vermelha os quatro genes contendo variantes candidatas que segregaram em conjunto em vários dos indivíduos afetados da genealogia da Família 7. Fonte: Modificado de <http://ghr.nlm.nih.gov> (Genetics Home Reference - US National Library of Medicine).

Capítulo 6

Conclusões

A detecção da mutação c.2090T>G p.Leu697Trp no gene *MYO3A* no estudo de Dantas (2013) motivou a busca dessa alteração em outras famílias com surdez de herança autossômica dominante. Essa busca permitiu a identificação da mutação na família 2 aqui descrita e motivou a triagem da mutação em amostras adicionais de 101 probandos de famílias com surdez de herança autossômica dominante. A detecção da mutação em mais três amostras nos levou a estimar uma frequência de aproximadamente 5% de famílias com a mutação na coleção de 103 pedigrees analisados. Foram realizadas as análises de identidade por descendência (IBD) entre os indivíduos afetados das cinco famílias com a mesma mutação, e também análises de determinação e estimativas do tamanho do haplótipo compartilhado, além de estudos sobre a ancestralidade da mutação. Esses estudos permitiram concluir que há uma origem comum para a mutação nas cinco famílias e a idade da mutação foi estimada em 27,4 gerações. Foi verificada que a alteração ocorreu em um segmento cromossômico de ancestralidade europeia. No entanto, não é possível inferir com certeza se tal alteração surgiu na Europa e foi posteriormente introduzida no Brasil durante o período de colonização, ou se teve origem em território brasileiro em algum indivíduo de origem europeia. Todavia, a presença da mutação c.2090T>G em um indivíduo com perda auditiva na Holanda (<https://www.lovd.nl>) leva à suposição da introdução desta alteração no Brasil durante a ocupação holandesa no nordeste brasileiro na primeira metade do século XVII (1624-1654). Tal possibilidade é condizente com a possível rota da mutação da região nordeste até a região sudeste do Brasil, mais especificamente passando pelo norte do estado de Minas Gerais e pela Zona da Mata mineira.

O fato de as cinco famílias analisadas neste estudo revelarem um evento mutacional em ancestral comum indica a importância desse tipo de estudo sobre a idade e origem de mutações causadoras de doenças. Além disso, a frequência de 5% da mutação na coleção de 101 amostras

adicionais indica a relevância de investigar essa variante causativa de surdez na população brasileira principalmente nos casos com fenótipo e mecanismo de transmissão similar, ou ao menos, entre famílias que residem em regiões próximas à de origem das famílias estudadas.

Em relação às demais famílias em que buscamos identificar a causa genética responsável pela perda auditiva não sindrômica de herança autossômica dominante, a análise dos resultados do sequenciamento massivo em paralelo do exoma permitiu a identificação da causa molecular da surdez na Família 6, que é a mutação c.689C>T p.Ala230Val no gene *MYO7A*. A identificação da mutação c.689C>T remete à importância do sequenciamento de nova geração quanto à identificação de variantes causativas de distúrbios geneticamente heterogêneos como a surdez. Na família 7, não pudemos identificar a variante causativa da surdez, mas identificamos um haplótipo de variantes candidatas localizadas no cromossomo 6 que ocorreu em 14 dos 16 indivíduos afetados. Uma das hipóteses para explicar o achado é a de que a variante causativa está localizada neste cromossomo, próxima à região em que essas variantes segregam em conjunto. A não identificação do gene relacionado à perda auditiva na família 7 evidencia a possibilidade de a alteração causativa estar localizada em uma região não codificadora, por exemplo, promotora ou *enhancer*. Se este for o caso, o sequenciamento completo do genoma será a melhor alternativa para investigação da causa molecular de perda auditiva nesta família.

Embora não tenha sido identificada a alteração responsável pela surdez na família 7, globalmente, o nosso estudo confirma a importância do sequenciamento massivo paralelo na investigação molecular de doenças geneticamente heterogêneas como as perdas auditivas.

Capítulo 7

Referências

- Abe, S., Usami, S., Shinkawa, H., Kelley, P. M., & Kimberling, W. J. (2000). Prevalent connexin 26 gene (GJB2) mutations in Japanese. *Journal of Medical Genetics*, 37(1), 41–43. <https://doi.org/10.1136/jmg.37.141>.
- Abreu-Silva, R. S., Rincon, D., Horimoto, A. R. V. R., Sguillar, A. P., Ricardo, L. A. C., Kimura, L., ... Mingroni-Netto, R. C. (2011). The search of a genetic basis for noise-induced hearing loss (NIHL). *Annals of Human Biology*, 38(2), 210–218. <https://doi.org/10.3109/03014460.2010.513774>.
- Ahmed, Z. M., Smith, T. N., Riazuddin, S., Makishima, T., Ghosh, M., Bokhari, S., ... Wilcox, E. R. (2002). Nonsyndromic recessive deafness DFNB18 and Usher syndrome type IC are allelic mutations of USH1C. *Human Genetics*, 110(6), 527–531. <https://doi.org/10.1007/s00439-02-0732-4>.
- Albert, S., Blons, H., Jonard, L., Feldmann, D., Chauvin, P., Loundon, N., ... Denoyelle, F. (2006). SLC26A4 gene is frequently involved in nonsyndromic hearing impairment with enlarged vestibular aqueduct in Caucasian populations. *European Journal of Human Genetics: EJHG*, 14(6), 773–779. <https://doi.org/10.1038/sj.ejhg.5201611>.
- Alexander, D. H., Novembre, J., & Lange, K. (2009). Fast model-based estimation of ancestry in unrelated individuals. *Genome Research*, 19(9), 1655–1664. <https://doi.org/10.1101/gr.094052.109>.
- Alford, R. L., Arnos, K. S., Fox, M., Lin, J. W., Palmer, C. G., Pandya, A., ... Professional Practice and Guidelines Committee. (2014). American College of Medical Genetics and Genomics guideline for the clinical evaluation and etiologic diagnosis of hearing loss. *Genetics in Medicine: Official Journal of the American College of Medical Genetics*, 16(4), 347–355. <https://doi.org/10.1038/gim.2014.2>.
- Alves, L. U., Santos, S., Musso, C. M., Ezquina, S. A., Opitz, J. M., Kok, F., ... Mingroni-Netto, R. C. (2017). Santos syndrome is caused by mutation in the

WNT7A gene. *Journal of Human Genetics*, 62(12), 1073–1078. <https://doi.org/10.1038/jhg2017.86>.

Amendola, L. M., Jarvik, G. P., Leo, M. C., McLaughlin, H. M., Akkari, Y., Amaral, M. D., ... Rehm, H. L. (2016). Performance of ACMG-AMP Variant-Interpretation Guidelines among Nine Laboratories in the Clinical Sequencing Exploratory Research Consortium. *The American Journal of Human Genetics*, Vol. 99, p. 247. <https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2016.06.001>.

Avraham, K. (1997). Characterization of unconventional MYO6, the human homologue of the gene responsible for deafness in Snell's waltzer mice. *Human Molecular Genetics*, Vol. 6, pp. 1225–1231. <https://doi.org/10.1093/hmg/6.8.1225>.

Avraham, K. B., Hasson, T., Steel, K. P., Kingsley, D. M., Russell, L. B., Mooseker, M. S., ... Jenkins, N. A. (1995). The mouse Snell's waltzer deafness gene encodes an unconventional myosin required for structural integrity of inner ear hair cells. *Nature Genetics*, Vol. 11, pp. 369–375. <https://doi.org/10.1038/ng1295-369>.

Bampi, G. B., Bisso-Machado, R., Hünemeier, T., Gheno, T. C., Furtado, G. V., Veliz-Otani, D., ... Rede Neurogenetica. (2017). Haplotype Study in SCA10 Families Provides Further Evidence for a Common Ancestral Origin of the Mutation. *Neuromolecular Medicine*, 19(4), 501–509. <https://doi.org/10.1007/s12017-017-8464-8>.

Belyantseva, I. A., Boger, E. T., Naz, S., Frolenkov, G. I., Sellers, J. R., Ahmed, Z. M., ... Friedman, T. B. (2005). Myosin-XVa is required for tip localization of whirlin and differential elongation of hair-cell stereocilia. *Nature Cell Biology*, 7(2), 148–156. <https://doi.org/10.1038/ncb1219>.

Bevilacqua, M. C., de Freitas Alvarenga, K., Costa, O. A., & Moret, A. L. M. (2010). The universal newborn hearing screening in Brazil: From identification to intervention. *International Journal of Pediatric Otorhinolaryngology*, Vol. 74, pp. 510–515. <https://doi.org/10.1016/j.ijporl.2010.02.009>.

- Boeda, B., El-Amraoui, A., Bahloul, A., Goodyear, R., Daviet, L., Blanchard, S., ... Peti, C. (2002). Myosin VIIa, harmonin and cadherin 23, three Usher I gene products that cooperate to shape the sensory hair cell bundle. *The EMBO Journal*, Vol. 21, pp. 6689–6699. <https://doi.org/10.1093/emboj/cdf689>.
- Boughman, J. A., Vernon, M., & Shaver, K. A. (1983). Usher syndrome: definition and estimate of prevalence from two high-risk populations. *Journal of Chronic Diseases*, 36(8), 595–603. [https://doi.org/10.1016/0021-9681\(83\)90147-9](https://doi.org/10.1016/0021-9681(83)90147-9).
- Braga, M. C. C., Otto, P. A., & Spinelli, M. (1999). Recurrence Risks in Cases of Nonsyndromic Deafness. *The Brazilian Journal of Dismorphology and Speech-Hearing Disorders*, (2) p. 33–40. Recuperado de http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S141547572002000200004&lng=en&tlng=en.
- Brunner, H. G., van Beersum, S. E., Warman, M. L., Olsen, B. R., Ropers, H. H., & Mariman, E. C. (1994). A Stickler syndrome gene is linked to chromosome 6 near the COL11A2 gene. *Human Molecular Genetics*, 3(9), 1561–1564. <https://doi.org/10.1093/hmg/3.9.1561>.
- Bruzzone, R., White, T. W., & Paul, D. L. (1996). Connections with connexins: the molecular basis of direct intercellular signaling. *European Journal of Biochemistry / FEBS*, 238(1), 1-27. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.19960001q.x>.
- Bueno, A. S., Nunes, K., Dias, A. M. M., Alves, L. U., Mendes, B. C. A., Sampaio-Silva, J., Meyer, D., Lezirovitz, K., Mingroni-Netto, R. C. (2019). *Frequency and origin of the c.2090T>G p.Leu697Trp MYO3A mutation associated with autosomal dominant hearing loss* (manuscrito em fase final de preparação).
- Campbell, D. A., McHale, D. P., Brown, K. A., Moynihan, L. M., Houseman, M., Karbani, G., ... Mueller, R. F. (1997). A new locus for non-syndromal, autosomal recessive, sensorineural hearing loss (DFNB16) maps to human chromosome 15q21-q22. *Journal of Medical Genetics*, 34(12), 1015–1017. <https://doi.org/10.1136/jmg.34.12.1015>.

- Cardozo, M. D. S. S., & Da S. S. Cardozo, M. (1945). Formação do Brasil contemporâneo: colônia. By Caio Prado Júnior. São Paulo: Livraria Martins Editora, Rua 15 de Novembro 135, 1942. Pp. 388; illus., 1 map. Paper.). *The Americas*, Vol. 1, pp. 508–509. <https://doi.org/10.2307/978798>.
- Chapchap, M. J., & Segre, C. M. (2001). Universal newborn hearing screening and transient evoked otoacoustic emission: new concepts in Brazil. *Scandinavian Audiology*, 51, 33-36. <https://doi.org/10.1080/010503901750166600>.
- Chen, J., Chen, J., Zhu, Y., Liang, C., & Zhao, H.-B. (2014). Deafness induced by Connexin 26 (GJB2) deficiency is not determined by endocochlear potential (EP) reduction but is associated with cochlear developmental disorders. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, Vol. 448, pp. 28–32. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2014.04.016>.
- Choi, M., Scholl, U. I., Ji, W., Liu, T., Tikhonova, I. R., Zumbo, P., ... Lifton, R. P. (2009). Genetic diagnosis by whole exome capture and massively parallel DNA sequencing. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, Vol. 106, pp. 19096–19101. <https://doi.org/10.1073/pnas.0910672106>.
- Dahl, E., Manthey, D., Chen, Y., Schwarz, H. J., Chang, Y. S., Lalley, P. A., ... Willecke, K. (1996). Molecular cloning and functional expression of mouse connexin-30, a gap junction gene highly expressed in adult brain and skin. *The Journal of Biological Chemistry*, 271(30), 17903–17910. <https://doi.org/10.1074/jbc.271.30.17903>.
- Dantas, V. de G. L. (2013). *Estudos Moleculares na perda auditiva de herança autossômica dominante* (Phd; R. C. Mingroni-Netto, Ed.). University of São Paulo. Recuperado de: <https://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/41/41131/tde-25032014-172000/en.php>.
- 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>.

Davis, H., & Silvermann, S. R (1970). *Hearing Deafness*. Holt Rineheart & Winston.

Recuperado de:

https://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_nlinks&ref=8421255&pid=S0034-7299200700010001000012&lng=en.

de Farias, A. A., Nunes, K., Lemes, R. B., Moura, R., Fernandes, G. R., Melo, U. S., ... Santos, S. (2018). Origin and age of the causative mutations in KLC2, IMPA1, MED25 and WNT7A unravelled through Brazilian admixed populations. *Scientific Reports*, 8(1), 16552. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-35022-1>.

Delaneau, O., Marchini, J., & Zagury, J.-F. (2011). A linear complexity phasing method for thousands of genomes. *Nature Methods*, 9(2), 179–181. <https://doi.org/10.1038/nmeth.1785>.

del Castillo, F. J., Rodríguez-Ballesteros, M., Alvarez, 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>.

del Castillo, I., Villamar, M., Moreno-Pelayo, M. A., del Castillo, F. J., Alvarez, A., Tellería, D., ... Moreno, F. (2002). A deletion involving the connexin 30 gene in nonsyndromic hearing impairment. *The New England Journal of Medicine*, 346(4), 243–249. <https://doi.org/10.1056/NEJM0a012052>.

de Kok, Y. J., van der Maarel, S. M., Bitner-Glindzicz, M., Huber, I., Monaco, A. P., Malcom, S., Pembrey, M. E., Roopers, H. H., Cremers, F. P. (1995). Association between X-linked mixed deafness and mutations in the POU domain gene POUF34. *Science*, 267(5198), 685-688. [http://doi.org/10.1016/0168-9525\(95\)90481-6](http://doi.org/10.1016/0168-9525(95)90481-6).

de Leng, W. W. J., Gadellaa-van Hooijdonk, C. G., Barendregt-Smouter, F. A. S., Koudijs, M. J., Nijman, I., Hinrichs, J. W. J., ... Lolkema, M. P. (2016). Targeted Next Generation Sequencing as a Reliable Diagnostic Assay for the Detection of Somatic Mutations in Tumours Using Minimal DNA Amounts from Formalin

Fixed Paraffin Embedded Material. *PloS One*, 11(2), e0149405. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0149405>. eCollection 2016.

de Mello, E. C. (2011). *O negócio do Brasil*. Companhia das Letras. Recuperado de: <https://www.companhidasletras.com.br/php?codigo=80174>.

Denoyelle, F., Marlin, S., Weil, D., Moatti, L., Chauvin, P., Garabédian, E. N., & Petit, C. (1999). Clinical features of the prevalent form of childhood deafness, DFNB1, due to a connexin-26 gene defect: implications for genetic counselling. *The Lancet*, 353(9161), 1298–1303. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(98\)11071-1](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(98)11071-1).

Denoyelle, F., Weil, D., Maw, M. A., Wilcox, S. A., Lench, N. J., Allen-Powell, D. R., ... Petit, C. (1997). Prelingual deafness: high prevalence of a 30delG mutation in the connexin 26 gene. *Human Molecular Genetics*, 6(12), 2173–2177. <https://doi.org/10.1093/hmg/6.12.2173>.

Dillio, A. A., Farhan, S. M. K., Ghani, M., Sato, C., Liang, E., Zhang, M., ... Hegele, R. A. (2018). Targeted Next-generation Sequencing and Bioinformatics Pipeline to Evaluate Genetic Determinants of Constitutional Disease. *Journal of Visualized Experiments: JoVE*, (134). <https://doi.org/10.3791/57266>.

Dosé, A. C., Ananthanarayanan, S., Moore, J. E., Corsa, A. C., Burnside, B., & Yengo, C. M. (2008). The kinase domain alters the kinetic properties of the myosin IIIA motor. *Biochemistry*, 47(8), 2485–2496. <https://doi.org/10.1021/bi7021574>.

Dosé, A. C., & Burnside, B. (2000). Cloning and chromosomal localization of a human class III myosin. *Genomics*, 67(3), 333–342. <https://doi.org/10.1006/geno.2000.6256>.

Dosé, A. C., & Burnside, B. (2002). A class III myosin expressed in the retina is a potential candidate for Bardet-Biedl syndrome. *Genomics*, 79(5), 621–624. <https://doi.org/10.1006/geno.2002.6749>.

Dosé, A. C., Hillman, D. W., Wong, C., Sohlberg, L., Lin-Jones, J., & Burnside, B. (2003). Myo3A, one of two class III myosin genes expressed in vertebrate retina, is localized to the calycal processes of rod and cone photoreceptors and

is expressed in the sacculus. *Molecular Biology of the Cell*, 14(3), 1058–1073. <https://doi.org/10.1091/mbc.e02-06-0317>.

Douville, P. J., Atanasoski, S., Tobler, A., Fontana, A., & Schwab, M. E. (1994). The brain-specific POU-box gene Brn4 is a sex-linked transcription factor located on the human and mouse X chromosomes. *Mammalian Genome: Official Journal of the International Mammalian Genome Society*, 5(3), 180–182. <https://doi.org/10.1007/bf00352353>.

Dror, A. A., & Avraham, K. B. (2010). Hearing impairment: a panoply of genes and functions. *Neuron*, 68(2), 293–308. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2010.10.011>.

Dufour, J. H., Dziejman, M., Liu, M. T., Leung, J. H., Lane, T. E., & Luster, A. D. (2002). IFN-gamma-inducible protein 10 (IP-10; CXCL10)-deficient mice reveal a role for IP-10 in effector T cell generation and trafficking. *Journal of Immunology*, 168(7), 3195–3204. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.168.7.3195>.

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*, Vol. 62, pp. 27–35. <https://doi.org/10.1086/301676>.

Everett, L. A., Glaser, B., Beck, J. C., Idol, J. R., Buchs, A., Heyman, M. 'ayan, ... Green, E. D. (1997). Pendred syndrome is caused by mutations in a putative sulphate transporter gene (PDS). *Nature Genetics*, Vol. 17, pp. 411–422. <https://doi.org/10.1038/ng1297-411>.

Figueiredo, T., Melo, U. S., Pessoa, A. L. S., Nobrega, P. R., Kitajima, J. P., Rusch, H., ... Santos, S. (2016). A homozygous loss-of-function mutation in inositol monophosphatase 1 (IMPA1) causes severe intellectual disability. *Molecular Psychiatry*, 21(8), 1125–1129. <https://doi.org/10.1038/mp.2015.150>.

Fokkema, I. F. A. C., den Dunnen, J. T., & Taschner, P. E. M. (2005). LOVD: easy creation of a locus-specific sequence variation database using an “LSDB-in-a-box” approach. *Human Mutation*, 26(2), 63–68. <https://doi.org/10.1002/humu.21438>.

- Friedman, T. B., Sellers, J. R., & Avraham, K. B. (1999). Unconventional myosins and the genetics of hearing loss. *American Journal of Medical Genetics*, Vol. 89, pp. 147-157. [https://doi.org/10.1002/\(sici\)1096-8628\(19990924\)89:3<147::aid-ajmg5>3.0.co;2-6](https://doi.org/10.1002/(sici)1096-8628(19990924)89:3<147::aid-ajmg5>3.0.co;2-6).
- Gandía, M., Del Castillo, F. J., Rodríguez-Álvarez, F. J., Garrido, G., Villamar, M., Calderón, M., ... del Castillo, I. (2013). A novel splice-site mutation in the GJB2 gene causing mild postlingual hearing impairment. *PloS One*, 8(9), e73566. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0073566>.
- Gandolfo, L. C., Bahlo, M., & Speed, T. P. (2014). Dating rare mutations from small samples with dense marker data. *Genetics*, 197(4), 1315–1327. <https://doi.org/10.1534/genetics.114.164616>.
- Gao, X., & Dai, P. (2014). Impact of next-generation sequencing on molecular diagnosis of inherited non-syndromic hearing loss. *Journal of Otology*, Vol. 9, pp. 122–125. <https://doi.org/10.1016/j.joto.2014.11.003>.
- Gibson, F., Walsh, J., Mburu, P., Varela, A., Brown, K. A., Antonio, M., ... Brown, S. D. (1995). A type VII myosin encoded by the mouse deafness gene shaker-1. *Nature*, 374(6517), 62–64. <https://doi.org/10.1038/374062a0>.
- Gilliver, M., Ching, T. Y. C., & Sjahalam-King, J. (2013). When expectation meets experience: Parents' recollections of and experiences with a child diagnosed with hearing loss soon after birth. *International Journal of Audiology*, Vol. 52, pp. S10–S16. <https://doi.org/10.3109/14992027.2013.825051>.
- Gogarten, S. M., Bhangale, T., Conomos, M. P., Laurie, C. A., McHugh, C. P., Painter, I., ... Laurie, C. C. (2012). GWASTools: an R/Bioconductor package for quality control and analysis of genome-wide association studies. *Bioinformatics*, Vol. 28, pp. 3329–3331. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bts610>.
- Grati, M. 'hamed, 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, G. E., Scott, D. A., McDonald, J. M., Woodworth, G. G., Sheffield, V. C., & Smith, R. J. (1999). Carrier rates in the midwestern United States for GJB2 mutations causing inherited deafness. *JAMA: The Journal of the American Medical Association*, 281(23), 2211–2216. <https://doi.org/10.1001/jama.281.23.2211>.
- Guilford, P., Ayadi, H., Blanchard, S., Chaib, H., Le Paslier, D., Weissenbach, J., ... Petit, C. (1994). A human gene responsible for neurosensory, non-syndromic recessive deafness is a candidate homologue of the mouse sh-1 gene. *Human Molecular Genetics*, 3(6), 989–993. <https://doi.org/10.1093/hmg/3.6.989>.
- Hasson, T., Walsh, J., Cable, J., Mooseker, M. S., Brown, S. D., & Steel, K. P. (1997). Effects of shaker-1 mutations on myosin-VIIa protein and mRNA expression. *Cell Motility and the Cytoskeleton*, 37(2), 127–138. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0169\(1997\)37:2<127::AID-CM5>3.0.CO;2-5](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0169(1997)37:2<127::AID-CM5>3.0.CO;2-5).
- Herberg, J. A., Beck, S., & Trowsdale, J. (1998). TAPASIN , DAXX , RGL2 , HKE2 and four new genes (BING 1 , 3 to 5) form a dense cluster at the centromeric end of the MHC 1 1Edited by J. Karn. *Journal of Molecular Biology*, Vol. 277, pp. 839–857. <https://doi.org/10.1006/jmbi.1998.1637>.
- Hilgert, N., Smith, R. J. H., & Van Camp, G. (2009). Forty-six genes causing nonsyndromic hearing impairment: which ones should be analyzed in DNA diagnostics? *Mutation Research*, 681(2-3), 189–196. <https://doi.org/10.1016/j.mrrev.2008.08.002>.
- Hillman, D. W., Bost-Usinger, L. M., and Burnside, B. (1996). A potential vertebrate homologue of Drosophila NINAC. *Molecular Biology of the Cell*, 7, 39. Recuperado de <https://www.google.com>.
- Hoppman, N., Aypar, U., Brodersen, P., Brown, N., Wilson, J., & Babovic-Vuksanovic, D. (2013). Genetic testing for hearing loss in the United States should include deletion/duplication analysis for the deafness/infertility locus at 15q15.3. *Molecular Cytogenetics*, 6(1), 19. <https://doi.org/10.1186/1755-8166-6-19>.

- Hu, M.-M., Yang, Q., Zhang, J., Liu, S.-M., Zhang, Y., Lin, H., ... Shu, H.-B. (2014). TRIM38 inhibits TNF α - and IL-1 β -triggered NF- κ B activation by mediating lysosome-dependent degradation of TAB2/3. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 111(4), 1509–1514. <https://doi.org/10.1073/pnas.1318227111>.
- Institute for Quality and Efficiency in Health Care (IQWiG, Germany). November, 2017). Hearing loss and deafness: Normal hearing and impaired hearing. Retrieved november, 2019, from informedhealth.org website: <https://www.informedhealth.org/normal-hearing-and-impaired-hearing.2609.en.html?part=ursachen-li>.
- Jaijo, T., Aller, E., Beneyto, M., Najera, C., Graziano, C., Turchetti, D.,...Milan, J. M. (2007). MYO7A mutation screening in Usher syndrome type I patients from diverse origins. *Journal of Medical Genetics*, 44(3), e71. <https://doi.org/10.1136/jmg.2006.045337>.
- Johnson, K. R., Yu, H., Ding, D., Jiang, H., Gagnon, L. H., & Salvi, R. J. (2010). Separate and combined effects of Sod1 and Cdh23 mutations on age-related hearing loss and cochlear pathology in C57BL/6J mice. *Hearing Research*, Vol. 268, pp. 85–92. <https://doi.org/10.1016/j.heares.2010.05.002>.
- Kalhammer, G., & Bähler, M. (2000). Unconventional myosins. *Essays in Biochemistry*, 35, 33–42. <https://doi.org/10.1042/bse035003>.
- Kaneko, Y., Nakano, A., Arimoto, Y., Nara, K., Mutai, H., & Matsunaga, T. (2017). The first sporadic case of DFNA11 identified by next-generation sequencing. *International Journal of Pediatric Otorhinolaryngology*, 100, 183–186. <https://doi.org/10.1016/j.ijporl.2017.07.007>.
- Karet, F. E., Finberg, K. E., Nelson, R. D., Nayir, A., Mocan, H., Sanjad, S. A., ... Lifton, R. P. (1999). Mutations in the gene encoding B1 subunit of H⁺-ATPase cause renal tubular acidosis with sensorineural deafness. *Nature Genetics*, 21(1), 84–90. <https://doi.org/10.1038/5022>.

- Kazmierczak, P., & Müller, U. (2012). Sensing sound: molecules that orchestrate mechanotransduction by hair cells. *Trends in Neurosciences*, 35(4), 220–229. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2011.10.007>.
- Kelsell, D. P., Dunlop, J., Stevens, H. P., Lench, N. J., Liang, J. N., Parry, G., ... Leigh, I. M. (1997). Connexin 26 mutations in hereditary non-syndromic sensorineural deafness. *Nature*, Vol. 387, pp. 80–83. <https://doi.org/10.1038/387080a0>.
- Khateb, S., Kowalewski, B., Bedoni, N., Damme, M., Pollack, N., Saada, A., ... Sharon, D. (2018). A homozygous founder missense variant in arylsulfatase G abolishes its enzymatic activity causing atypical Usher syndrome in humans. *Genetics in Medicine*, Vol. 20, pp. 1004–1012. <https://doi.org/10.1038/gim.2017.227>.
- Kikuchi, T., Kimura, R. S., Paul, D. L., & Adams, J. C. (1995). Gap junctions in the rat cochlea: immunohistochemical and ultrastructural analysis. *Anatomy and Embryology*, 191(2), 101–118. <https://doi.org/10.1007/bf00186783>.
- Kim, S. Y., Kim, A. R., Kim, N. K. D., Lee, C., Kim, M. Y., Jeon, E.-H., ... Choi, B. Y. (2016). Unraveling of Enigmatic Hearing-Impaired GJB2 Single Heterozygotes by Massive Parallel Sequencing. *Medicine*, Vol. 95, p. e3029. <https://doi.org/10.1097/md.0000000000003029>.
- Kimberlin, D. W., Jester, P. M., Sánchez, P. J., Ahmed, A., Arav-Boger, R., Michaels, M. G., ... Whitley, R. J. (2015). Valganciclovir for symptomatic congenital cytomegalovirus disease. *New England Journal of Medicine*, Vol. 372(10), pp.933-943. <http://doi.org/10.1056/NEJMoa1404599>.
- Komaba, S., Inoue, A., Maruta, S., Hosoya, H., & Ikebe, M. (2003). Determination of Human Myosin III as a Motor Protein Having a Protein Kinase Activity. *Journal of Biological Chemistry*, Vol. 278, pp. 21352–21360. <https://doi.org/10.1074/jbc.m300757200>.
- Lautermann, J., ten Cate, W. J., Altenhoff, P., Grümmer, R., Traub, O., Frank, H., ... Winterhager, E. (1998). Expression of the gap-junction connexins 26 and 30 in

the rat cochlea. *Cell and Tissue Research*, 294(3), 415–420. <https://doi.org/10.1007/s004410051192>.

Leal, A., Huehne, K., Bauer, F., Sticht, H., Berger, P., Suter, U., ... Rautenstrauss, B. (2009). Identification of the variant Ala335Val of MED25 as responsible for CMT2B2: molecular data, functional studies of the SH3 recognition motif and correlation between wild-type MED25 and PMP22 RNA levels in CMT1A animal models. *Neurogenetics*, 10(4), 375–376. <https://doi.org/10.1007/s10048-009-0183-3>.

Legan, P. K., Rau, A., Keen, J. N., & Richardson, G. P. (1997). The mouse tectorins. Modular matrix proteins of the inner ear homologous to components of the sperm-egg adhesion system. *The Journal of Biological Chemistry*, 272(13), 8791–8801. <https://doi.org/10.1074/jbc.272.13.8791>.

Les Erickson, F., Corsa, A. C., Dose, A. C., & Burnside, B. (2003). Localization of a class III myosin to filopodia tips in transfected HeLa cells requires an actin-binding site in its tail domain. *Molecular Biology of the Cell*, 14(10), 4173–4180. <https://doi.org/10.1091/mbc.e02-10-0656>.

Leva, F. D., Di Leva, F., D'Adamo, P., Cubellis, M. V., D'Eustacchio, A., Errichiello, M., ... Marciano, E. (2006). Identification of a Novel Mutation in the Myosin VIIA Motor Domain in a Family with Autosomal Dominant Hearing Loss (DFNA11). *Audiology and Neurotology*, Vol. 11, pp. 157–164. <https://doi.org/10.1159/000091199>.

Lewis, M. A., Nolan, L. S., Cadge, B. A., Matthews, L. J., Schulte, B. A., Dubno, J. R., ... Dawson, S. J. (2018). Whole exome sequencing in adult-onset hearing loss reveals a high load of predicted pathogenic variants in known deafness-associated genes and identifies new candidate genes. *BMC Medical Genomics*, 11(1), 77. <https://doi.org/10.1186/s12920-018-0395-1>.

Liang, Y., Wang, A., Belyantseva, I. A., Anderson, D. W., Probst, F. J., Barber, T. D., ... Fridell, R. A. (1999). Characterization of the human and mouse unconventional myosin XV genes responsible for hereditary deafness DFNB3 and shaker 2. *Genomics*, 61(3), 243–258. <https://doi.org/10.1006/geno.1999.5976>.

- Li, J., He, Y., Weck, M. L., Lu, Q., Tyska, M. J., & Zhang, M. (2017). Structure of Myo7b/USH1C complex suggests a general PDZ domain binding mode by MyTH4-FERM myosins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *114*(19), E3776–E3785. <https://doi.org/10.1073/pnas.1702251114>.
- Lim, D. J. (1986). Functional structure of the organ of Corti: a review. *Hearing Research*, Vol. 22, pp. 117–146. [https://doi.org/10.1016/0378-5955\(86\)90089-4](https://doi.org/10.1016/0378-5955(86)90089-4).
- Lin, H. W., Schneider, M. E., & Kachar, B. (2005). When size matters: the dynamic regulation of stereocilia lengths. *Current Opinion in Cell Biology*, *17*(1), 55–61. <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2004.12.005>.
- Lin, X., Tang, W., Ahmad, S., Lu, J., Colby, C. C., Zhu, J., & Yu, Q. (2012). Applications of targeted gene capture and next-generation sequencing technologies in studies of human deafness and other genetic disabilities. *Hearing Research*, Vol. 288, pp. 67–76. <https://doi.org/10.1016/j.heares.2012.01.004>.
- Liu, H., Pecka, J. L., Zhang, Q., Soukup, G. A., Beisel, K. W., & He, D. Z. Z. (2014). Characterization of transcriptomes of cochlear inner and outer hair cells. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, *34*(33), 11085–11095. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1690-14.2014>.
- Liu, X.-Z., Walsh, J., Mburu, P., Kendrick-Jones, J., M Jamie T, Steel, K. P., & Brown, S. D. M. (1997). Mutations in the myosin VIIA gene cause non-syndromic recessive deafness. *Nature Genetics*, Vol. 16, pp. 188–190. <https://doi.org/10.1038/ng0697-188>.
- Li, X. C., Everett, L. A., Lalwani, A. K., Desmukh, D., Friedman, T. B., Green, E. D., & Wilcox, E. R. (1998). A mutation in PDS causes non-syndromic recessive deafness. *Nature Genetics*, *18*(3), 215–217. <https://doi.org/10.1038/ng0398-215>.
- Lynch, S. R., & Puglisi, J. D. (2001). Structural origins of aminoglycoside specificity for prokaryotic ribosomes. *Journal of Molecular Biology*, *306*(5), 1037-1058. <https://doi.org/10.1006/jmbi.2000.4420>.

- Macedo-Souza, L. I., Kok, F., Santos, S., Amorim, S. C., Starling, A., Nishimura, A., ... Zatz, M. (2005). Spastic paraplegia, optic atrophy, and neuropathy is linked to chromosome 11q13. *Annals of Neurology*, 57(5), 730–737. <https://doi.org/10.1002/ana.20478>.
- Magi, A., Benelli, M., Marseglia, G., Nannetti, G., Scordo, M. R., & Torricelli, F. (2010). A shifting level model algorithm that identifies aberrations in array-CGH data. *Biostatistics*, Vol. 11, pp. 265–280. <https://doi.org/10.1093/biostatistics/kxp051>.
- Manzoni, C. R. C. T., Ferreira, C. A., Almeida, S. M. V. T., Tedesco, M. R. M. (abril, 2016). Triagem auditiva neonatal na cidade de São Paulo. Retrieved november, 2019, from Biblioteca Virtual em Saúde – Secretaria Municipal de Saúde de São Paulo website: <https://pesquisa.bvsalud.org/sms/resource/pt/sms-12023>.
- Maples, B. K., Gravel, S., Kenny, E. E., & Bustamante, C. D. (2013). RFMix: a discriminative modeling approach for rapid and robust local-ancestry inference. *American Journal of Human Genetics*, 93(2), 278–288. <https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2013.06.020>.
- Marazita, M. L., Ploughman, L. M., Rawlings, B., Remington, E., Arnos, K. S., & Nance, W. E. (1993). Genetic epidemiological studies of early-onset deafness in the U.S. school-age population. *American Journal of Medical Genetics*, Vol. 46, pp. 486–491. <https://doi.org/10.1002/ajmg.1320460504>.
- Martniere, G. (1991). *A implantação das estruturas de Portugal na América* (J. & M. A. H. de O. Serrão, Ed.). Estampa.
- Mata-Machado, B. (1991). *História do Sertão Noroeste de Minas Gerais 1690-1930*. Imprensa Oficial.
- McGuirt, W. T., Prasad, S. D., Griffith, A. J., Kunst, H. P., Green, G. E., Shpargel, K. B., ... Smith, R. J. (1999). Mutations in COL11A2 cause non-syndromic hearing loss (DFNA13). *Nature Genetics*, 23(4), 413–419. <https://doi.org/10.1038/70516>.
- Mecklenburg, K. L., Freed, S. A., Raval, M., Quintero, O. A., Yengo, C. M., & O'Tousa, J. E. (2015). Invertebrate and vertebrate class III myosins interact with

MORN repeat-containing adaptor proteins. *PloS One*, 10(3), e0122502. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0122502>.

Melchionda, S., Ahituv, N., Bisceglia, L., Sobe, T., Glaser, F., Rabionet, R., ... Gasparini, P. (2001). MYO6, the Human Homologue of the Gene Responsible for Deafness in Snell's Waltzer Mice, Is Mutated in Autosomal Dominant Nonsyndromic Hearing Loss. *The American Journal of Human Genetics*, Vol. 69, pp. 635–640. <https://doi.org/10.1086/323156>.

Mermall, V. (1998). Unconventional Myosins in Cell Movement, Membrane Traffic, and Signal Transduction. *Science*, Vol. 279, pp. 527–533. <https://doi.org/10.1126/science.279.5350.527>.

Möller, C. G., Kimberling, W. J., Davenport, S. L., Priluck, I., White, V., Biscione-Halterman, K., ... Grissom, T. J. (1989). Usher syndrome: an otoneurologic study. *The Laryngoscope*, 99(1), 73–79. <https://doi.org/10.1288/00005537-198901000-00014>.

Montell, C., & Rubin, G. M. (1988). The *Drosophila ninaC* locus encodes two photoreceptor cell specific proteins with domains homologous to protein kinases and the myosin heavy chain head. *Cell*, 52(5), 757–772. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(88\)90413-8](https://doi.org/10.1016/0092-8674(88)90413-8).

Moore, B., Hu, H., Singleton, M., De La Vega, F. M., Reese, M. G., & Yandell, M. (2011). Global analysis of disease-related DNA sequence variation in 10 healthy individuals: implications for whole genome-based clinical diagnostics. *Genetics in Medicine: Official Journal of the American College of Medical Genetics*, 13(3), 210–217. <https://doi.org/10.1097/GIM.0b013e31820ed321>.

Morell, R. J., Kim, H. J., Hood, L. J., Goforth, L., Friderici, K., Fisher, R., ... Dumon, J. (1998). Mutations in the Connexin 26 Gene (GJB2) among Ashkenazi Jews with Nonsyndromic Recessive Deafness. *New England Journal of Medicine*, Vol. 339, pp. 1500–1505. <https://doi.org/10.1056/nejm199811193392103>.

Morton, C. C., & Nance, W. E. (2006). Newborn Hearing Screening — A Silent Revolution. *New England Journal of Medicine*, Vol. 354, pp. 2151–2164. <https://doi.org/10.1056/nejmra050700>.

- Nakanishi, H., Kawashima, Y., Kurima, K., Chae, J. J., Ross, A. M., Pinto-Patarroyo, G., ... Griffith, A. J. (2017). mutation and cochlear autoinflammation cause syndromic and nonsyndromic hearing loss DFNA34 responsive to anakinra therapy. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 114(37), E7766–E7775. <https://doi.org/10.1073/pnas.1702946114>.
- Ng, K. P., Kambara, T., Matsuura, M., Burke, M., & Ikebe, M. (1996). Identification of Myosin III as a Protein Kinase†. *Biochemistry*, Vol. 35, pp. 9392–9399. <https://doi.org/10.1021/bi960181a>.
- Ng, S. B., Turner, E. H., Robertson, P. D., Flygare, S. D., Bigham, A. W., Lee, C., ...Shendure, J. (2009). Targeted capture and massively parallel sequencing of 12 human exomes. *Nature*, 461(7261), 272-276. <https://doi.org/10.1038/nature08250>.
- Nunes, K., Zheng, X., Torres, M., Moraes, M. E., Piovezan, B. Z., Pontes, G. N., ... Meyer, D. (2016). HLA imputation in an admixed population: An assessment of the 1000 Genomes data as a training set. *Human Immunology*, Vol. 77, pp. 307–312. <https://doi.org/10.1016/j.humimm.2015.11.004>.
- Odrionitz, F., & Kollmar, M. (2007). Drawing the tree of eukaryotic life based on the analysis of 2,269 manually annotated myosins from 328 species. *Genome Biology*, 8(9), R196. <https://doi.org/10.1186/gb-2007-8-9-r196>.
- Okabe, Y., Sano, T., & Nagata, S. (2009). Regulation of the innate immune response by threonine-phosphatase of Eyes absent. *Nature*, 460(7254), 520–524. <https://doi.org/10.1038/nature08138>.
- Oliveira, M. F. M. (2000). *Formação Social e Econômica do Norte de Minas* (L. Rodrigues, Ed.). Unimontes.
- Olusanya, B. O., & Newton, V. E. (2007). Global burden of childhood hearing impairment and disease control priorities for developing countries. *The Lancet*, 369(9569), 1314–1317. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(07\)60602-3](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(07)60602-3).
- Oza, A. M., DiStefano, M. T., Hemphill, S. E., Cushman, B. J., Grant, A. R., Siegert, R. K., ... ClinGen Hearing Loss Clinical Domain Working Group. (2018). Expert

specification of the ACMG/AMP variant interpretation guidelines for genetic hearing loss. *Human Mutation*, 39(11), 1593–1613. <https://doi.org/10.1002/humu.23630>.

Pak, W. L. (1979). *Neurogenetics, Genetic Approaches to the Nervous System.* North-Holland, New York: Elsevier.

Pallares-Ruiz, N., Blanchet, P., Mondain, M., Claustres, M., & Roux, A.-F. (2002). A large deletion including most of GJB6 in recessive non syndromic deafness: a digenic effect? *European Journal of Human Genetics: EJHG*, 10(1), 72–76. <https://doi.org/10.1038/sj.ejhg.5200762>.

Pascual-Ramos, V., Contreras-Yáñez, I., Rivera-Hoyos, P., Enríquez, L., & Ramírez-Anguiano, J. (2014). Cumulative disease activity predicts incidental hearing impairment in patients with rheumatoid arthritis (RA). *Clinical Rheumatology*, 33(3), 315–321. <https://doi.org/10.1007/s10067-014-2485-6>.

Paskulin, D. D., Giacomazzi, J., Achatz, M. I., Costa, S., Reis, R. M., Hainaut, P., ... Ashton-Prolla, P. (2015). Ancestry of the Brazilian TP53 c.1010G>A (p.Arg337His, R337H) Founder Mutation: Clues from Haplotyping of Short Tandem Repeats on Chromosome 17p. *PloS One*, 10(11), e0143262. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0143262>.

Porter, J. A., & Montell, C. (1993). Distinct roles of the *Drosophila* ninaC kinase and myosin domains revealed by systematic mutagenesis. *The Journal of Cell Biology*, Vol. 122, pp. 601–612. <https://doi.org/10.1083/jcb.122.3.601>.

Posey, J. E. (2019). Genome sequencing and implications for rare disorders. *Orphanet Journal of Rare Diseases*, 14(1), 153. <https://doi.org/10.1186/s13023-019-1127-0>.

Prezant, T. R., Agopian, J. V., Bohlman, M. C., Bu, X., Oztas, S., Qiu, W. Q., ... Rotter, J. I. (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>.

Probst, F. J. B., Fridell, R. A., Raphael, Y., Saunders, T. L., Wang, A., Liang, Y., ... Camper, S. A. (1998). Correction of Deafness in shaker-2 Mice by an

Unconventional myosin in a BAC Transgene. *Science*, Vol. 280, pp. 1444-1447. <https://doi.org/10.1007/978-3-663-10968-6>.

Rabionet, R., Gasparini, P., & Estivill, X. (2000). Molecular genetics of hearing impairment due to mutations in gap junction genes encoding beta connexins. *Human Mutation*, 16(3), 190–202. [https://doi.org/10.1002/1098-1004\(20009\)16:3<190::AID-HUMU2>3.0.CO;2-I](https://doi.org/10.1002/1098-1004(20009)16:3<190::AID-HUMU2>3.0.CO;2-I).

Rabionet, R., Morales-Peralta, E., López-Bigas, N., Arbonés, M. L., & Estivill, X. (2006). A novel G21R mutation of the GJB2 gene causes autosomal dominant non-syndromic congenital deafness in a Cuban family. *Genetics and Molecular Biology*, Vol. 29, pp. 443–445. <https://doi.org/10.1590/s1415-47572006000300006>.

Reid, F. M., Vernham, G. A., & Jacobs, H. T. (1994). A novel mitochondrial point mutation in a maternal pedigree with sensorineural deafness. *Human Mutation*, Vol. 3, pp. 243–247. <https://doi.org/10.1002/humu.1380030311>.

Richard, G., Rouan, F., Willoughby, C. E., Brown, N., Chung, P., Ryyänen, M., ... Russell, L. (2002). Missense mutations in GJB2 encoding connexin-26 cause the ectodermal dysplasia keratitis-ichthyosis-deafness syndrome. *American Journal of Human Genetics*, 70(5), 1341–1348. <https://doi.org/10.1086/339986>.

Richards, S., Aziz, N., Bale, S., Bick, D., Das, S., Gastier-Foster, J., ... ACMG Laboratory Quality Assurance Committee. (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: Official Journal of the American College of Medical Genetics*, 17(5), 405–424. <https://doi.org/10.1038/gim.2015.30>.

Rodriguez-Paris, J., & Schrijver, I. (2009). The digenic hypothesis unraveled: the GJB6 del(GJB6-D13S1830) mutation causes allele-specific loss of GJB2 expression in cis. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 389(2), 354–359. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2009.08.152>.

- Rodriguez-Paris, J., Tamayo, M. L., Gelvez, N., & Schrijver, I. (2011). Allele-specific impairment of GJB2 expression by GJB6 deletion del(GJB6-D13S1854). *PLoS One*, 6(6), e21665. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0021665>.
- Rosenberg, C., Freitas, É. L., Uehara, D. T., M T B, Costa, S. S., Oiticica, J., ... Mingroni-Netto, R. C. (2016). Genomic copy number alterations in non-syndromic hearing loss. *Clinical Genetics*, Vol. 89, pp. 473–477. <https://doi.org/10.1111/cge.12683>.
- Rosenberg, S. A., Tong-On, P., Li, Y., Riley, J. P., El-Gamil, M., Parkhurst, M. R., & Robbins, P. F. (2002). Identification of BING-4 cancer antigen translated from an alternative open reading frame of a gene in the extended MHC class II region using lymphocytes from a patient with a durable complete regression following immunotherapy. *Journal of Immunology*, 168(5), 2402–2407. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.168.5.2402>.
- Sakaguchi, H., Tokita, J., Müller, U., & Kachar, B. (2009). Tip links in hair cells: molecular composition and role in hearing loss. *Current Opinion in Otolaryngology & Head and Neck Surgery*, 17(5), 388–393. <https://doi.org/10.1097/MOO.0b013e3283303472>.
- Salles, F. T., Merritt, R. C., Manor, U., Dougherty, G. W., Sousa, A. D., Moore, J. E., ... Kachar, B. (2009). Myosin IIIa boosts elongation of stereocilia by transporting espin 1 to the plus ends of actin filaments. *Nature Cell Biology*, Vol. 11, pp. 443–450. <https://doi.org/10.1038/ncb1851>.
- Sanger, F., Nicklen, S., Coulson, A. R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *National Academy of Sciences*, 74(12), 5463-5467. PMID:271968.
- Sankila, E. M., Pakarinen, L., Kääriäinen, H., Aittomäki, K., Karjalainen, S., Sistonen, P., & de la Chapelle, A. (1995). Assignment of an Usher syndrome type III (USH3) gene to chromosome 3q. *Human Molecular Genetics*, 4(1), 93–98. <https://doi.org/10.1093/hmg/4.1.93>.
- Santos, S. C., Pardono, E., da Costa, M. I. F., de Melo, A. N., Graciani, Z., de Albuquerque e Souza, A. C., ...Otto, P. A. (2008). A previously undescribed

syndrome combining fibular agenesis/hypoplasia, oligodactylous clubfeet, anonychia/ungual hypoplasia, and other defects. *American Journal of Medical Genetics Part A*, Vol. 146A, pp. 3126-3131. <https://doi.org/10.1002/ajmg.a.32580>.

Saunders, C. J., Miller, N. A., Soden, S. E., Dinwiddie, D. L., Noll, A., Alnadi, N. A., ... Kingsmore, S. F. (2012). Rapid whole-genome sequencing for genetic disease diagnosis in neonatal intensive care units. *Science Translational Medicine*, 4(154), 154ra135. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.3004041>.

Seipel, K., O'Brien, S. P., Iannotti, E., Medley, Q. G., Streuli, M. (2001). Tara, a novel F-actin binding protein, associates with the Trio guanine nucleotide exchange factor and regulates actin cytoskeletal organization. *Journal of Cell Science*, 114, 389–399. PMID:1148140.

Seki, Y., Miyasaka, Y., Suzuki, S., Wada, K., Yasuda, S. P., Matsuoka, K., ... Kikkawa, Y. (2017). A novel splice site mutation of myosin VI in mice leads to stereociliary fusion caused by disruption of actin networks in the apical region of inner ear hair cells. *PloS One*, 12(8), e0183477. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.018.3477>.

Self, T., Mahony, M., Fleming, J., Walsh, J., Brown, S. D., & Steel, K. P. (1998). Shaker-1 mutations reveal roles for myosin VIIA in both development and function of cochlear hair cells. *Development*, 125(4), 557–566. PMID:9435277.

Shahin, H., Walsh, T., Sobe, T., Sa'ed, J. A., Rayan, A. A., Lynch, E. D., ... Kanaan, M. (2006). Mutations in a Novel Isoform of TRIOBP That Encodes a Filamentous-Actin Binding Protein Are Responsible for DFNB28 Recessive Nonsyndromic Hearing Loss. *The American Journal of Human Genetics*, Vol. 78, pp. 144–152. <https://doi.org/10.1086/499495>.

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*, Vol. 107, pp. 21104–21109. <https://doi.org/10.1073/pnas.1012989107>.

- Shearer, A. E., Hildebrand, M. S., Sloan, C. M., & Smith, R. J. H. (2011). Deafness in the genomics era. *Hearing Research*, 282(1-2), 1–9. <https://doi.org/10.1016/j.heares.2011.10.001>.
- Shearer, A. E., Hildebrand, M. S., & Smith, R. J. H. (2017). Hereditary Hearing Loss and Deafness Overview. In M. P. Adam, H. H. Ardinger, R. A. Pagon, S. E. Wallace, L. J. H. Bean, K. Stephens, & A. Amemiya (Eds.), *GeneReviews*. Seattle (WA): University of Washington, Seattle. PMID:20301607.
- Shearer, A. E., & Smith, R. J. H. (2015). Massively Parallel Sequencing for Genetic Diagnosis of Hearing Loss: The New Standard of Care. *Otolaryngology--Head and Neck Surgery: Official Journal of American Academy of Otolaryngology-Head and Neck Surgery*, 153(2), 175–182. <https://doi.org/10.1177/0194599815591156>.
- Sheppard, S., Biswas, S., Li, M. H., Jayaraman, V., Slack, I., Romasko, E. J., ... Krantz, I. D. (2018). Utility and limitations of exome sequencing as a genetic diagnostic tool for children with hearing loss. *Genetics in Medicine: Official Journal of the American College of Medical Genetics*, 20(12), 1663–1676. <https://doi.org/10.1038/s41436-018-0004-x>.
- Siemens, J., Kazmierczak, P., Reynolds, A., Sticker, M., Littlewood-Evans, A., & Muller, U. (2002). The Usher syndrome proteins cadherin 23 and harmonin form a complex by means of PDZ-domain interactions. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, Vol. 99, pp. 14946–14951. <https://doi.org/10.1073/pnas.232579599>.
- Slatko, B. E., Gardner, A. F., & Ausubel, F. M. (2018). Overview of Next-Generation Sequencing Technologies. *Current Protocols in Molecular Biology*, Vol. 122, p. e59. <https://doi.org/10.1002/cpmb.59>.
- Sloan-Heggen, C. M., & Smith, R. J. H. (2016). Navigating genetic diagnostics in patients with hearing loss. *Current Opinion in Pediatrics*, 28(6), 705–712. <https://doi.org/10.1097/MOP.0000000000000410>.

- Smith, R. J. H., Bale, J. F., & White, K. R. (2005). Sensorineural hearing loss in children. *The Lancet*, Vol. 365, pp. 879–890. [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(05\)71047-3](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(05)71047-3).
- Smith, R. J. H., Berlin, C. I., Hejtmančík, J. F., Keats, B. J. B., Kimberling, W. J., Lewis, R. A., ... Tranebjærg, L. (1994). Clinical diagnosis of the Usher syndromes. *American Journal of Medical Genetics*, Vol. 50, pp. 32–38. <https://doi.org/10.1002/ajmg.1320500107>.
- Snoeckx, R. L., Huygen, P. L. M., Feldmann, D., Marlin, S., Denoyelle, F., Waligora, J., ... Van Camp, G. (2005). GJB2 mutations and degree of hearing loss: a multicenter study. *American Journal of Human Genetics*, 77(6), 945–957. <https://doi.org/10.1086/497996>.
- Song, M. H., Lee, H. K., Choi, J. Y., Kim, S., Bok, J., & Kim, U.-K. (2010). Clinical evaluation of DFN3 patients with deletions in the POU3F4 locus and detection of carrier female using MLPA. *Clinical Genetics*, 78(6), 524–532. <https://doi.org/10.1111/j.1399-0004.2010.01426.x>.
- Steel, K. P., & Brown, S. D. M. (1994). Genes and deafness. *Trends in Genetics*, Vol. 10, pp. 428–435. [https://doi.org/10.1016/0168-9525\(94\)90113-9](https://doi.org/10.1016/0168-9525(94)90113-9).
- Stenmark, H. (2009). Rab GTPases as coordinators of vesicle traffic. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 10(8), 513–525. <https://doi.org/10.1038/nm2728>.
- Sun-Wada, G.-H., Yoshimizu, T., Imai-Senga, Y., Wada, Y., & Futai, M. (2003). Diversity of mouse proton-translocating ATPase: presence of multiple isoforms of the C, d and G subunits. *Gene*, Vol. 302, pp. 147–153. [https://doi.org/10.1016/s0378-1119\(02\)01099-5](https://doi.org/10.1016/s0378-1119(02)01099-5).
- Tang, X., Yang, L., Zhu, Y., Liao, Z., Wang, J., Qian, Y., ... Guan, M.-X. (2007). Very low penetrance of hearing loss in seven Han Chinese pedigrees carrying the deafness-associated 12S rRNA A1555G mutation. *Gene*, 393(1-2), 11–19. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2007.01.001>.

- Teer, J. K., & Mullikin, J. C. (2010). Exome sequencing: the sweet spot before whole genomes. *Human Molecular Genetics*, Vol. 19, pp. R145–R151. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddq333>.
- Toriello, H. V., Smith, S. D., Bolz, H. J., (2016). Hereditary Hearing Loss and Its Syndromes Third Edition. *European Journal of Human Genetics: EJHG*, 24(11), 1650. <https://doi.org/10.1038/ejhg.2016.67>.
- Tsirves, G. K., Voulgari, P. V., Pelechas, E., Asimakopoulos, A. D., & Drosos, A. A. (2019). Cochlear involvement in patients with systemic autoimmune rheumatic diseases: a clinical and laboratory comparative study. *European Archives of Oto-Rhino-Laryngology: Official Journal of the European Federation of Oto-Rhino-Laryngological Societies : Affiliated with the German Society for Oto-Rhino-Laryngology - Head and Neck Surgery*, 276(9), 2419–2426. <https://doi.org/10.1007/s00405-019-05487-5>.
- Uchil, P. D., Hinz, A., Siegel, S., Coenen-Stass, A., Pertel, T., Luban, J., & Mothes, W. (2013). TRIM protein-mediated regulation of inflammatory and innate immune signaling and its association with antiretroviral activity. *Journal of Virology*, 87(1), 257–272. <https://doi.org/10.1128/JVI.01804-12>.
- Van Camp, G., Willems, P. J., & Smith, R. J. (1997). Nonsyndromic hearing impairment: unparalleled heterogeneity. *American Journal of Human Genetics*, 60(4), 758–764. PMID:9106521.
- Varga, L., Danis, D., Skopkova, M., Masindova, I., Slobodova, Z., Demesova, L., ... Gasperikova, D. (2019). Novel EYA4 variant in Slovak family with late onset autosomal dominant hearing loss: a case report. *BMC Medical Genetics*, 20(1), 84. <https://doi.org/10.1186/s12881-019-0806-y>.
- Verpy, E., Leibovici, M., Zwaenepoel, I., Liu, X. Z., Gal, A., Salem, N., ... Petit, C. (2000). A defect in harmonin, a PDZ domain-containing protein expressed in the inner ear sensory hair cells, underlies Usher syndrome type 1C. *Nature Genetics*, 26(1), 51–55. <https://doi.org/10.1038/79171>.
- Vikkula, M., Mariman, E. C., Lui, V. C., Zhidkova, N. I., Tiller, G. E., Goldring, M. B., ... Ropers, H. H. (1995). Autosomal dominant and recessive

osteochondrodysplasias associated with the COL11A2 locus. *Cell*, 80(3), 431–437. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(95\)90493-x](https://doi.org/10.1016/0092-8674(95)90493-x).

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: Official Journal of the American College of Medical Genetics*, 16(12), 945–953. <https://doi.org/10.1038/gim.2014.65>.

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 GPM2 as the cause of nonsyndromic hearing loss DFNB2. *American Journal of Human Genetics*, 87(1), 90–94. <https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2010.05.010>.

Walsh, T., Walsh, V., Vreugde, S., Hertzano, R., Shahin, H., Haika, S., ... Avraham, K. B. (2002). From flies' eyes to our ears: Mutations in a human class III myosin cause progressive nonsyndromic hearing loss DFNB30. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, Vol. 99, pp. 7518–7523. <https://doi.org/10.1073/pnas.102091699>.

Walsh, V. L., Raviv, D., Dror, A. A., Shahin, H., Walsh, T., Kanaan, M. N., ... King, M.-C. (2011). A mouse model for human hearing loss DFNB30 due to loss of function of myosin IIIA. *Mammalian Genome: Official Journal of the International Mammalian Genome Society*, 22(3-4), 170–177. <https://doi.org/10.1007/s00335-010-9310-6>.

Wang, A., Liang, Y., Fridell, R. A., Probst, F. J., Wilcox, E. R., Touchman, J. W., ... Friedman, T. B. (1998). Association of unconventional myosin MYO15 mutations with human nonsyndromic deafness DFNB3. *Science*, 280(5368), 1447–1451. <https://doi.org/10.1126/science.280.5368.1447>.

Wang, Q. J. (2004). Y-linked inheritance of non-syndromic hearing impairment in a large Chinese family. *Journal of Medical Genetics*, Vol. 41, pp. e80–e80. <https://doi.org/10.1136/jmg.2003.012799>.

- Wayne, S., Robertson, N. G., DeClau, F., Chen, N., Verhoeven, K., Prasad, S., ... Smith, R. J. (2001). Mutations in the transcriptional activator EYA4 cause late-onset deafness at the DFNA10 locus. *Human Molecular Genetics*, 10(3), 195–200. <https://doi.org/10.1093/hmg/10.3.195>.
- Weil, D., Blanchard, S., Kaplan, J., Guilford, P., Gibson, F., Walsh, J., ... Weston, M. D. (1995). Defective myosin VIIA gene responsible for Usher syndrome type 1B. *Nature*, 374(6517), 60–61. <https://doi.org/10.1038/374060a0>.
- Weil, D., Levy, G., Sahly, I., Levi-Acobas, F., Blanchard, S., El-Amraoui, A., ... Petit, C. (1996). Human myosin VIIA responsible for the Usher 1B syndrome: a predicted membrane-associated motor protein expressed in developing sensory epithelia. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 93(8), 3232–3237. <https://doi.org/10.1073/pnas.93.8.3232>.
- Willems, P. J. (2000). Genetic Causes of Hearing Loss. *New England Journal of Medicine*, Vol. 342, pp. 1101–1109. <https://doi.org/10.1056/nejm200004133421506>.
- Wu, L., Pan, L., Wei, Z., & Zhang, M. (2011). Structure of MyTH4-FERM domains in myosin VIIa tail bound to cargo. *Science*, 331(6018), 757–760. <https://doi.org/10.1126/science.1198848>.
- Yamaguchi, Y., Sakai, E., Okamoto, K., Kajiya, H., Okabe, K., Naito, M., ... Tsukuba, T. (2017). Rab44, a novel large Rab GTPase, negatively regulates osteoclast differentiation by modulating intracellular calcium levels followed by NFATc1 activation. *Cellular and Molecular Life Sciences: CMLS*, 75(1), 33–48. <https://doi.org/10.1007/s00018-017-2607-9>.
- Yamasoba, T., Lin, F. R., Someya, S., Kashio, A., Sakamoto, T., & Kondo, K. (2013). Current concepts in age-related hearing loss: epidemiology and mechanistic pathways. *Hearing Research*, 303, 30–38. <https://doi.org/10.1016/j.heares.2013.01.021>.
- Yan, D., Tekin, M., Blanton, S. H., & Liu, X. Z. (2013). Next-Generation Sequencing in Genetic Hearing Loss. *Genetic Testing and Molecular Biomarkers*, Vol. 17, pp. 581–587. <https://doi.org/10.1089/gtmb.2012.0464>.

- Yang, Y., Bauer, C., Strasser, G., Wollman, R., Julien, J. P., & Fuchs, E. (1999). Integrators of the cytoskeleton that stabilize microtubules. *Cell*, *98*(2), 229–238. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(00\)81017-x](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(00)81017-x).
- Yohe, S., & Thyagarajan, B. (2017). Review of Clinical Next-Generation Sequencing. *Archives of Pathology & Laboratory Medicine*, *141*(11), 1544–1557. <https://doi.org/10.5858/arpa.2016-0501-RA>.
- Yu, I.-M., Planelles-Herrero, V. J., Sourigues, Y., Moussaoui, D., Sirkia, H., Kikuti, C., ... Houdusse, A. (2017). Myosin 7 and its adaptors link cadherins to actin. *Nature Communications*, *8*, 15864. <https://doi.org/10.1038/ncomms15864>.
- Yu, W.-M., & Goodrich, L. V. (2014). Morphological and physiological development of auditory synapses. *Hearing Research*, Vol. 311, pp. 3–16. <https://doi.org/10.1016/j.heares.2014.01.007>.
- Zanchetta, S., Ohara, K., Rodrigues, P. T., Carvalho, E. L., & Richieri-Costa, A. (2000). “New” autosomal-dominant infantile sensorineural non-progressive high-frequency hearing loss: report on a Brazilian family. *American Journal of Medical Genetics*, *95*(1), 13–16. [https://doi.org/10.1002/1096-8628\(20001106\)95:1<13::aid-ajmg4>3.0.co:2-t](https://doi.org/10.1002/1096-8628(20001106)95:1<13::aid-ajmg4>3.0.co:2-t).
- 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. (2017). Hypothesis of K⁺-Recycling Defect Is Not a Primary Deafness Mechanism for Cx26 (GJB2) Deficiency. *Frontiers in Molecular Neuroscience*, Vol. 10. <https://doi.org/10.3389/fnmol.2017.00162>.
- Zhao, Y., Riviaccio, M. A., Lutz, S., Scemes, E., & Brosnan, C. F. (2006). The TLR3 ligand polyI: C downregulates connexin 43 expression and function in astrocytes by a mechanism involving the NF-kappaB and PI3 kinase pathways. *Glia*, *54*(8), 775–785. <https://doi.org/10.1002/glia.20418>.

Zheng, X., Levine, D., Shen, J., Gogarten, S. M., Laurie, C., & Weir, B. S. (2012). A high-performance computing toolset for relatedness and principal component analysis of SNP data. *Bioinformatics*, Vol. 28, pp. 3326–3328. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bts606>.

Zhu, Y., Zong, L., Mei, L., & Zhao, H.-B. (2015). Connexin26 gap junction mediates miRNA intercellular genetic communication in the cochlea and is required for inner ear development. *Scientific Reports*, 5, 15647. <https://doi.org/10.1038/srep15647>.

Capítulo 8

Anexos

Anexo 1 . As 40 variantes filtradas a partir do VCF da Família 6 (presentes em ao menos dois dos exomas) com seus respectivos scores de previsão de patogenicidade de acordo com os pacotes utilizados e suas respectivas frequências nos principais bancos de dados genômicos. As quatro variantes em comum nos três exomas estão destacadas em cor verde. A única variante filtrada que está presente em gene de surdez conhecido está destacada em cor amarela.

Gene	RefSeq	Alteração DNA	Alteração proteica	dbSNP	1000 Genomes	6500 Exomes	ExAC	AbrAOM	ClinVAR	SIFT	Polyphen	Mutation Taster
<i>B4GALNT3</i>	NM_1735953	c.2593A>C	p.Ile865Leu	-	0	0	0	0	ND	Deleterious	Benign	Disease Causing
<i>IBA57</i>	NM_001010867	c.528G>C	p.Gln176His	-	0	0	0	0	ND	Tolerated	Possibly Pathogenic	Polymorphism
<i>USP13</i>	NM_003940	c.25delG>C	p.G9fs	-	0	0	0	0	ND	NA	NA	NA
<i>ZNF528</i>	NM_032423	c.173T>C	p.Ser58Phe	-	0	0	0	0	ND	Deleterious	Benign	Polymorphism
<i>MYO7A</i>	NM_000260	c.689C>T	p.Ala230Val	rs797044512	0	0	0	0	Pathogenic	Deleterious	Probably Pathogenic	Disease Causing
<i>CACNA1E</i>	NM_001205294	c.3008C>T	p.Thr1003Ala	rs74127835	0,006	0,005	0,003	0,005	ND	Tolerated	Possibly Pathogenic	Polymorphism
<i>CALCR</i>	NM_005795	c.742G>C	p.Glu248Gln	-	0	0	0	0	ND	Tolerated	Possibly Pathogenic	Polymorphism
<i>CCDC34</i>	NM_030771	c.699A>T	p.Lys233Asn	rs140981229	0,0002	0	0,0001	0	ND	Tolerated	Probably Pathogenic	Disease Causing
<i>CCDC189</i>	NM_001014979	c.298G>C	p.Glu100Gln	rs200933996	0,0004	0,0001	0,0001	0	ND	Deleterious	Possibly Pathogenic	Poymorphism
<i>CDIPT</i>	NM_001286585	c.94A>G	p.Met32Val	rs766385869	0	0	0,0001	0	ND	Tolerated	Benign	Disease Causing
<i>CNTNAP4</i>	NM_138994	c.2287A>T	p.Ile763Phe	rs112577515	0,0084	0,0085	0,0082	0,0082	ND	Tolerated	Benign	Disease Causing
<i>COL18A1</i>	NM_030582	c.517A>G	p.Gly173Ser	rs62000960	0,0016	0,002	0,003	0,0041	Uncertain Significance	Tolerated	Benign	Polymorphism
<i>ERMP1</i>	NM_024895	c.860_86INSACT	p.Leu287delin sLL	-	0	0	0	0	ND	NA	NA	NA

continua

Gene	RefSeq	Alteração DNA	Alteração proteica	dbSNP	1000 Genomes	6500 Exomes	ExAC	AbrAOM	ClinVAR	SIFT	Polyphen	Mutation Taster
IGSF6	NM_005849	c.383C>T	p.Ala128Val	rs147257312	0,00002	0,0003	0,0013	0,0008	ND	Deleterious	Possibly Damaging	Polymorphism
KCNC2	NM_001260498	c.1810A>G	p.Thr604Ala	rs199579079	0,0002	0	0,0001	0	ND	Tolerated	Benign	Disease Causing
KLHL35	NM_001039548	c.66_67insG AG	p.His23delinsFA P	rs756778027	0	0	0	0	ND	NA	NA	NA
MROH6	NM_001100878	c.638A>C	p.Asn213Thr	rs188278492	0,0046	0,0016	0,0008	0,0026	ND	Deleterious	Probably Damaging	Polymorphism
MTA2	NM_004739	c.1238C>T	p.Ala413Val	rs937412200	0	0	0	0	ND	Tolerated	Benign	Disease Causing
MTDH	NM_178812	c.307C>G	p.Leu103Val	rs188271601	0,0073	0,004	0,0049	0,005	ND	Tolerated	Benign	Disease Causing
OSGIN2	NM_001126111	c.73G>C	p.Glu25Gln	-	0	0	0	0	ND	Tolerated	Benign	Disease Causing
PAK1	NM_002576	c.550_551in sATG	p.A81delinsDA	rs149665907	0,0009	0	0	0,009	ND	NA	NA	NA
PHC1	NM_004426	c.2110G>A	p.Ala704Thr	rs144307674	0,0032	0,0024	0,0023	0,0024	Likely Benign	Tolerated	Benign	Polymorphism
PIKFYVE	NM_015040	c.1807C>G	p.Gln603Glu	rs1050977023	0	0	0	0,0024	ND	Tolerated	Benign	Disease Causing
PIKFYVE	NM_015040	c.4774G>A	p.Gly1592Arg	rs148994064	0,0034	0,0002	0,003	0	ND	Tolerated	Benign	Disease Causing
PDZD9	NM_173806	c.279DeIT	p.Asn93fs	rs766335923	0	0,0026	0,0014	0,0008	ND	NA	NA	NA
RFXP1	NM_001253728	c.607C>A	p.Arg203Ser	rs751003500	0	0	0	0	ND	Tolerated	Benign	Polymorphism
SLC7A14	NM_020049	c.821C>T	p.Thr274Ile	rs116040996	0,0009	0,0019	0,002	0	ND	Deleterious	Probably Pathogenic	Disease Causing
SRCAP	NM_006662	c.8755C>T	p.Leu2919Phe	rs149217909	0,0007	0,0013	0,0013	0,0008	Likely Benign	Deleterious	Benign	Polymorphism
SYVN1	NM_172230	c.204A>T	p.Gln68His	rs745787810	0	0	0	0	ND	Deleterious	Possibly Pathogenic	Disease Causing

continua

Gene	RefSeq	Alteração DNA	Alteração proteica	dbSNP	1000 Genomes	6500 Exomes	ExAC	AbrAOM	ClinVAR	SIFT	Polyphen	Mutation Taster
TOP1MT	NM_001258447	c.661G>C	p.Asp221His	rs143769145	0,0036	0,004	0,0011	0,0074	ND	Deleterious	Probably Damaging	Disease Causing
TMEM192	NM_001100389	c.371G>A	p.Arg124Gln	rs200827928	0	0,0006	0,0003	0,0023	ND	Tolerated	Possibly Pathogenic	Polymorphism
VEZT	NM_017599	c.622G>A	p.Ala208Thr	rs73374297	0,0092	0,0083	0,0023	0,0032	ND	Tolerated	Benign	Disease Causing
VN1R1	NM_020633	c.248C>T	p.Thr63Met	rs372495902	0,0002	0	0	0	ND	Deleterious	Probably Damaging	Polymorphism
VPS13B	NM_017890	c.3811A>T	p.Thr1271Ser	rs142674934	0,0006	0,005	0,0006	0,0057	ND	Tolerated	Possibly Damaging	Disease Causing
VPS13B	NM_017890	c.7787C>T	p.Ser2596Phe	rs145208175	0,0006	0,005	0,0006	0,0057	ND	Deleterious	Probably Damaging	Disease Causing
ZCCHC2	NM_017742	c.1708T>G	p.Leu570Val	rs746716197	0	0	0	0,0024	ND	Deleterious	Benign	Polymorphism
ZFHX4	NM_024721	c.1177G>C	p.Glu393Gln	rs189444720	0,0011	0,003	0,0016	0,0024	ND	Tolerated	Possibly Pathogenic	Disease Causing
ZKSCAN5	NM_001318082	c.443G>A	p.Arg148Gln	rs752105052	0	0	0	0	ND	Tolerated	Benign	Polymorphism
ZNF605	NM_001164715	c.308G>A	p.Tyr103Cys	rs116985064	0	0	0	0	ND	Tolerated	Probably Damaging	Polymorphism
ZNF646	NM_014699	c.3431C>T	p.Pro1144Leu	rs113926102	0,002	0,004	0,0032	0,0024	ND	Tolerated	Benign	Polymorphism