

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

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 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 101 probandos de famílias com surdez de herança dominante revelou a presença da mutação c.2090T>G em mais três famílias, além das duas originalmente descritas no laboratório. Concluímos que a mutação explicou cerca de 3% 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 (idade do ancestral comum mais recente) 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* já descrita 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 estudos de ligação e 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 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 101 probands from families with autosomal dominant hearing loss revealed the presence of the mutation in four families, in addition to the two families originally ascertained in the laboratory. We concluded that this mutation explained about 3% 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 (age of the most recent common ancestor) 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 previously described, 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 linkage studies and 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 in 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).

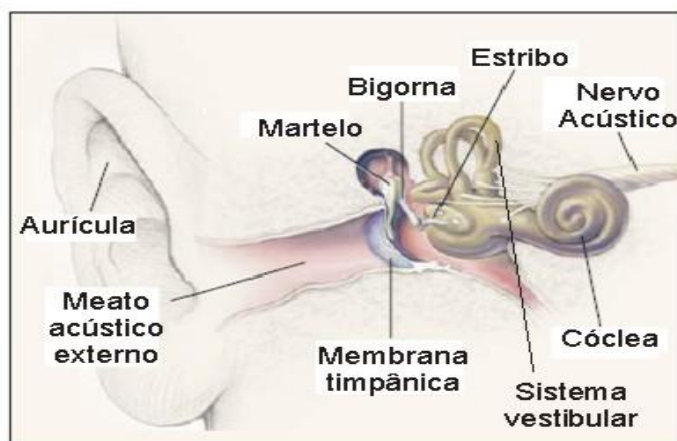


Figura 1: Esquema dos três compartimentos anatômicos do sistema auditivo: a orelha externa (aurícula), orelha média (cavidade timpânica com os três ossículos) e orelha interna (composta pela cóclea e pelo sistema vestibular). Fonte: Modificado de: (Willems, 2000).

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. Os estereocílios das células ciliadas internas e externas são unidos 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 síndrômica de herança autossômica recessiva. Mutações no gene *MYO7A* também podem estar relacionadas à surdez não síndrômica 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).

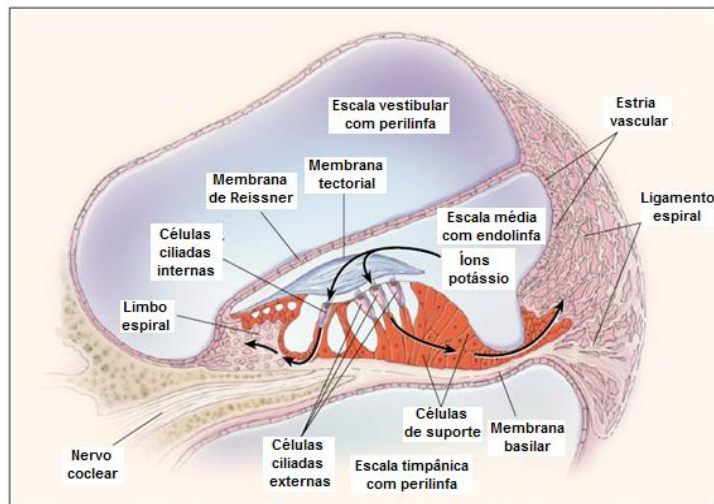


Figura 2: Esquema de um corte transversal da cóclea, indicando as três fileiras de células ciliadas externas e a fileira única de células ciliadas internas. Fonte: Modificado de: (Willems, 2000).

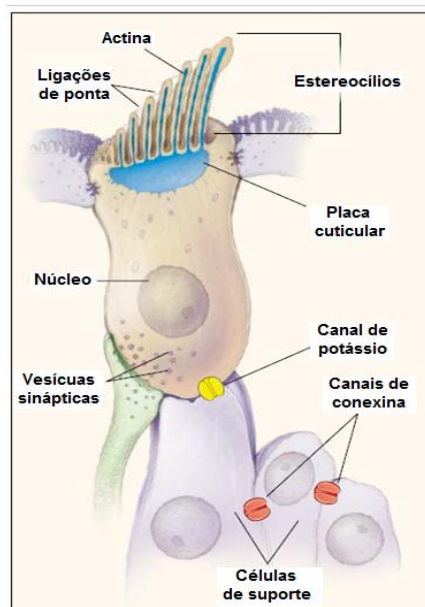


Figura 3: Célula ciliada com seu feixe de estereocílios dispostos em fileira. Fonte: Modificado de: (Wileems, 2000).

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), grave (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 ou idade, 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). Embora pouco se saiba sobre a incidência de CMV em países em desenvolvimento, a prevalência da infecção pelo vírus nestes países é maior em relação aos países desenvolvidos. Há poucos estudos sobre a epidemiologia do citomegalovírus no Brasil. No entanto, existem evidências de que a incidência da infecção em nosso país seja semelhante à de países em desenvolvimento. A prevalência varia com a idade materna, questões socioeconômicas e culturais das populações infectadas (Lobato-Silva, 2016). 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 locus, 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 locus é tão notável que quatro siglas foram criadas, derivadas da sigla DFN (do inglês DeaFNess), para numerar e designar os locus das diferentes formas de transmissão da surdez não sindrômica. Locus mapeados relacionados à herança autossômica dominante são denominados DFNA e os locus com transmissão autossômica recessiva são denominados DFNB. Em relação à herança ligada ao X, os locus 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 grave 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 locus 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 grave 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, na qual cerca de metade 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 síndrômica (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 sindrômico 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 protrusões 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 protrusões 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 *USH1C*, 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 síndrômica 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 síndrômica 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 (Dantas et al., 2018).

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 congênita 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 afetando 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 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 contém informações sobre as variantes identificadas em relação a um genoma de referência. A anotação desses arquivos inclui dados 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 também probabilidade de identificação desse tipo de variante 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 o primeiro painel 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 duas 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 correspondentes 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*	DFNB102	Behloul et. al., 2014
<i>FAM65B</i>	c.1021G>A p.Arg_34_Asp86delinsSS	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.Phe841Val	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.Arg736Thr	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 necessidade de elucidar a causa da perda auditiva em 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. Além disso, a ocorrência da mutação no gene MYO3A em algumas das famílias motivou o estudo da sua origem.

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 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 3% de famílias com a mutação na coleção de 101 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 (idade do ancestral comum mais recente) 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 3% 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>.
- Lobato-Silva, D. de F. (2016). Citomegalovírus: epidemiologia baseada em dados de soroprevalência. In *Revista Pan-Amazônica de Saúde* (Vol. 7, Issue esp, pp. 213–219). <https://doi.org/10.5123/s2176-62232016000500024>.

- 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., Biscone-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., Gracaini, 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., Hejtmancik, 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 DFNB82. *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., Kajiyama, 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., Riviuccio, 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>