

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS
MESTRADO PROFISSIONAL EM ACONSELHAMENTO GENÉTICO E GENÔMICA
HUMANA

Larissa Nascimento Antunes

**ESTUDOS MOLECULARES NA PERDA AUDITIVA DE HERANÇA AUTOSSÔMICA
RECESSIVA**

MOLECULAR STUDIES IN AUTOSOMAL RECESSIVE HEARING LOSS

São Paulo

2020

Larissa Nascimento Antunes

**ESTUDOS MOLECULARES NA PERDA AUDITIVA DE HERANÇA AUTOSSÔMICA
RECESSIVA**

MOLECULAR STUDIES IN AUTOSOMAL RECESSIVE HEARING LOSS

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

Exemplar corrigido – o original encontra-se disponível no Instituto de Biociências da USP.

A handwritten signature in blue ink that reads "Regina Célia Mingroni Netto". The signature is written in a cursive style.

Orientadora: Profa. Dra. Regina Célia Mingroni Netto

São Paulo
2020

Ficha catalográfica

Antunes, Larissa Nascimento

Estudos moleculares na perda auditiva
de herança autossômica recessiva

104 páginas

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

1. Perda auditiva hereditária 2. Surdez
recessiva 3. Sequenciamento de nova geração

Comissão Julgadora:

Prof(a) Dr(a).

Prof(a) Dr(a).

Profa. Dra. Regina Célia Mingroni Netto

Orientadora

Dedicatória

Aos meus pais, por todo o apoio.

“O que mais amo na ciência é que quanto mais aprendemos, menos respostas conseguimos. O máximo que conseguimos são perguntas melhores”.

John Green, *Tartarugas até lá embaixo*

Agradecimentos

À minha orientadora, Profa. Dra. Regina Célia Mingroni Netto, pela ótima orientação e pelos conselhos e oportunidades que tanto contribuíram para o meu desenvolvimento profissional.

Aos professores e profissionais envolvidos no programa de Mestrado em Aconselhamento Genético e Genômica Humana, por contribuírem para a formação de profissionais qualificados.

Às famílias que tornaram este estudo possível.

Aos funcionários do Departamento de Genética e Biologia Evolutiva, em especial, Ligia Vieira, Maraisa Sebastião, Mara Maria Pinheiro, Paulo Rogério de Camargo e Silvia Souza da Costa por todo o auxílio.

Aos funcionários do Centro de Pesquisas sobre o Genoma Humano e Células-Tronco, em especial, à Dra. Marília Scliar, pelo auxílio em questões de bioinformática, e à Meire Agüena e Daiane Franco, pelas corridas de sequenciamento.

Aos profissionais da DERDIC, UNIFESP e Hospital das Clínicas pelo apoio na avaliação clínica e audiológica dos pacientes da casuística.

À Dra. Karina Lezirovitz e ao Me. Alex Dias, pela contribuição com pacientes para a casuística desse estudo.

Aos meus colegas de curso, pela amizade, companhia e troca de conhecimentos.

Aos colegas do Laboratório de Genética Humana: André Bueno, Beatriz Schiavo, Bianca Santiago, Camila Martins, Jennifer Leôncio, Jennifer Paixão, Vinícius Borges e William Bertani pela companhia diária e, em especial, à Dra. Lilian Kimura por todos os ensinamentos em biologia molecular e por ser minha companhia, mesmo à distância, em meio ao isolamento social.

À minha amiga, Aline Pascoinelli, pelos conselhos em fonoaudiologia e por acompanhar minha trajetória há tantos anos.

Aos meus pais, Joana e Marcos, por sempre priorizarem minha educação e por todo o carinho.

Ao meu namorado, Caio Silveira, por todos os abraços, por sempre me incentivar a ir além e por não hesitar em tentar ajudar.

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

Ao CNPq, pelo auxílio financeiro por meio da bolsa de apoio técnico.

Resumo

A perda auditiva é um distúrbio sensorial muito frequente em seres humanos. Acredita-se que em países desenvolvidos cerca de 50% dos casos tenham origem genética. A perda auditiva de herança autossômica recessiva é a que mais exibe heterogeneidade de locus, sendo relacionada a 76 genes conhecidos e responsável por 70 a 80% dos casos hereditários não-sindrômicos. O locus DFNB1, que contém os genes *GJB2* e *GJB6*, é responsável pela maior parte dos casos que apresentam este padrão de herança. O sequenciamento de nova geração permite o sequenciamento simultâneo de diversos genes e sua utilização em condições geneticamente heterogêneas, como a surdez, tem se mostrado efetiva no diagnóstico molecular e é recomendada em pacientes com perda auditiva cuja triagem de alterações no locus DFNB1 tenha resultado normal. O objetivo desse estudo foi identificar as alterações moleculares que explicassem o quadro de perda auditiva em casuística do Laboratório de Genética Humana (LGH) do IB-USP selecionada por apresentar surdez de provável herança autossômica recessiva, por meio do sequenciamento massivo paralelo do exoma (WES). Na primeira parte do estudo, os probandos de 63 famílias brasileiras, 19 previamente classificados como “monoalélicos”, pois apresentavam variantes em genes relacionados a surdez autossômica recessiva em apenas um alelo, e 44 probandos selecionados com base na genealogia (nascidos de casais consanguíneos ou oriundos de famílias com dois ou mais afetados na irmandade, nascidos de pais ouvintes) - tiveram seu material genético analisado por meio do sequenciamento completo do exoma. Variantes causativas, que explicavam o quadro, em homozigose ou heterozigose composta, foram detectadas em 13 de 61 probandos (21,3%): seis do grupo “monoalélicos” e sete do grupo com suspeita de surdez autossômica recessiva por causa da genealogia. Dois casos não foram concluídos porque necessitam de reavaliação clínica e não foram incluídos no total. Foram identificadas 18 variantes diferentes consideradas causativas, sendo que oito nunca haviam sido descritas antes na literatura. Na segunda parte do estudo, foi realizada uma análise retrospectiva das famílias com surdez atendidas no LGH desde o ano 2000, que indicou 184 casos com suspeita inicial de herança autossômica recessiva com base na genealogia, dos quais 44 foram avaliados nesse estudo. Dos 75 probandos com

diagnóstico molecular conclusivo, 39 apresentaram surdez autossômica recessiva relacionada a alterações no locus DFNB1 e dois casos estavam associados a genes de surdez autossômica dominante. Os outros 34 casos restantes foram associados a variantes identificadas em 18 genes diferentes, sendo que os genes *OTOF*, *CDH23*, *MYO15A*, *USH2A* e *SLC26A4* apresentaram a maior contribuição nos casos com hipótese inicial de surdez autossômica recessiva. Na terceira parte do estudo, por fim, foi realizada uma estratégia de filtragem de variantes em homozigose em genes nunca relacionados à surdez em amostras de 25 probandos nascidos de casais consanguíneos, que indicou 19 variantes candidatas, das quais três eram de perda de função. Uma variante *missense* no gene *FGFR3* apresentou potencial de explicar o quadro de surdez, pois este gene já foi relacionado a um caso de síndrome de camptodactilia, estatura alta, escoliose e surdez, com herança autossômica recessiva. Uma variante de perda de função no gene *RGPD3* apresentou maior potencial de explicar o quadro de surdez, uma vez que um estudo da literatura indicou possível associação entre SNPs nesse gene com a morfologia da orelha. O sequenciamento do exoma se mostrou uma estratégia eficaz para o estudo da heterogeneidade genética da surdez, contribuindo com a detecção de novas variantes e promovendo melhoria no aconselhamento genético das famílias, além de permitir o estudo de novos genes candidatos a explicar o quadro de surdez.

Abstract

Hearing loss is a very frequent sensorial impairment in human beings. It is believed that in developed countries around 50% of cases are due to genetic causes. Autosomal recessive hearing loss is the one that exhibits greater locus heterogeneity, being related to 76 known genes and responsible for 70 to 80% of hereditary non-syndromic cases. The DFNB1 locus, which contains *GJB2* and *GJB6* genes, is responsible for most of the cases that present this inheritance pattern. Next generation sequencing allows the simultaneous sequencing of several genes and its use in genetically heterogeneous conditions, such as hearing loss, has been shown to be effective in molecular diagnosis and it is recommended for patients after screening for variants in the DFNB1 locus, with normal results. This study aimed to identify the variants that could explain hearing loss in a casuistic from the Human Genetics Laboratory (LGH) in IB-USP selected for having hearing loss of probable autosomal recessive inheritance, through whole exome sequencing (WES). In the first part of the study, the probands of 63 Brazilian families, 19 previously classified as “monoallelic”, as they had variants in genes related to autosomal recessive deafness identified in only one allele, and 44 probands selected based on pedigree criteria (either born from consanguineous couples or from families with two or more affected individuals in the sibship, born from hearing parents), had their genetic material analyzed through whole exome sequencing. Causative variants, classified as pathogenic or probably pathogenic, were detected in 13 of 61 probands (21.3%) in homozygosis or in compound heterozygosis: six from the “monoallelic” group and seven from the group with suspected autosomal recessive deafness because of the pedigree. Two cases have not been completed because clinical evaluation was needed, therefore, they were not included in the final. Eighteen different variants considered as causative were identified, eight of which had never been described in the literature. In the second part of the study, a retrospective analysis of families with hearing loss seen at LGH since 2000 indicated 184 cases with an initial hypothesis of autosomal recessive inheritance based on pedigree, of which 44 were evaluated in this study. Of the 75 probands with conclusive molecular diagnosis, 39 had autosomal recessive hearing loss related to variants in the DFNB1 locus and two cases harbored variants in genes associated with

autosomal dominant deafness. The other 34 remaining cases were associated with variants identified in 18 different genes, being *OTOF*, *CDH23*, *MYO15A*, *USH2A* and *SLC26A4* the genes showing the greatest contribution in cases of autosomal recessive deafness. In the third part of the study, finally, the strategy of filtering variants in homozygosity in genes never related to deafness in samples from 25 probands born from consanguineous couples indicated 19 candidate variants, of which three were loss of function variants. A missense variant in the *FGFR3* showed potential to explain hearing loss, because this gene has already been related to a camptodactyly, tall stature, and hearing loss syndrome, with autosomal recessive inheritance. A loss-of-function variant in the *RGPD3* gene showed greater potential to explain hearing loss, since a study in the literature indicated a possible association between SNPs in this gene and ear morphology. Whole exome sequencing proved to be an effective strategy for the study of the genetic heterogeneity of deafness, contributing to the detection of new variants and promoting improvement in the genetic counseling, in addition allowing the study of new candidate genes to explain deafness.

1. INTRODUÇÃO

1.1 **Audição e perda auditiva**

A audição consiste na captação de ondas sonoras no ambiente e sua transformação em impulsos nervosos, sendo considerada um sentido complexo e um dos principais canais para a comunicação humana. A audição tem função primordial no processo de aprendizado da linguagem e desenvolvimento de memória, pensamento e raciocínio (WHO, 2020).

A orelha é a estrutura responsável por este processo e é dividida em três partes: externa, média e interna (Figura 1). A orelha externa é formada pelo pavilhão auditivo e pelo meato acústico (canal auditivo externo), sendo considerada uma proteção para as orelhas média e interna. Além disso, é responsável por captar, amplificar e conduzir as ondas sonoras até a orelha média (WILLIEMS, 2000).

A orelha média é composta pela cavidade timpânica e três ossículos: martelo, bigorna e estribo. As ondas sonoras atingem a membrana timpânica e a vibração é transmitida pelos ossículos da orelha média até a orelha interna, através da janela oval (WILLIEMS, 2000). Já a orelha interna é composta pelo labirinto anterior (cóclea), que compõe o sistema auditivo, e pelo labirinto posterior (vestíbulo e canais semicirculares), que fazem parte do sistema vestibular, responsável pelo equilíbrio (DROR; AVRAHAM, 2010).

A cóclea é formada por três tubos enrolados e sobrepostos em forma de caracol denominados de escalas vestibular, média e timpânica. Entre as escalas média e timpânica encontra-se o órgão de Corti, que, além de vários tipos de células de suporte, possui células ciliadas, divididas em internas e externas, responsáveis pela recepção da vibração das ondas sonoras e sua conversão em impulsos elétricos que serão levados para o córtex cerebral. Os estereocílios das células ciliadas externas se deformam ao contato com a membrana tectorial em consequência do estímulo acústico, contribuindo para a discriminação das frequências sonoras. Já as células ciliadas internas convertem os sinais mecânicos em elétricos, estabelecendo sinapses com os neurônios sensoriais (WILLIEMS, 2000).

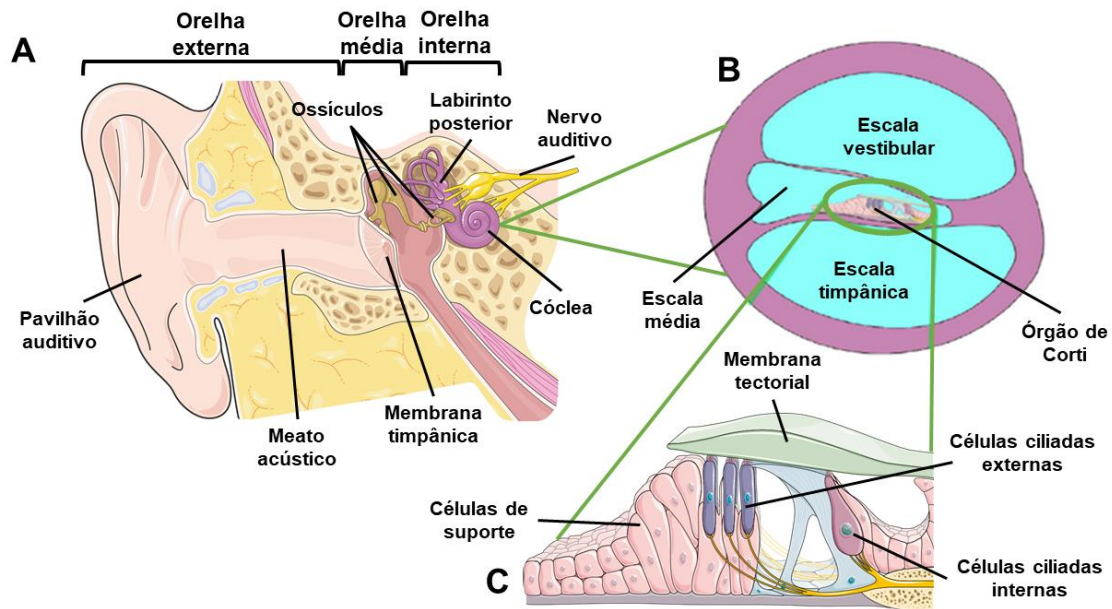


Figura 1 - Representação da orelha humana. (A) Divisão do órgão auditivo em orelhas externa, média e interna e seus componentes. (B) Corte transversal da cóclea, mostrando sua divisão em três compartimentos - escalas vestibular, média e timpânica - e a localização do órgão de Corti. (C) Detalhes do órgão de Corti indicando a membrana tectorial e as células ciliadas (externas e internas) flanqueadas por células de suporte. Figura autoral utilizando arcabouços do site SMART (<https://smart.servier.com/>).

Alterações em diferentes estruturas da orelha podem afetar a transmissão da informação, resultando em um quadro de deficiência auditiva (DROR; AVRAHAM, 2010). De acordo com a Organização Mundial da Saúde (2020), uma pessoa que não possui audição normal possui perda auditiva, geralmente classificada como leve ou moderada e que pode afetar uma ou ambas as orelhas. Já no caso de uma pessoa com perda severa (ou grave) ou profunda da audição, utilizava-se principalmente o termo surdez. Nos dias de hoje, os profissionais da audiologia preferem usar o termo perda auditiva para designar perdas de qualquer grau. No entanto, autores de artigos relacionados à genética da surdez e da perda auditiva algumas vezes ainda empregam os termos como sinônimos. No presente trabalho os termos serão utilizados como sinônimos, pois uma mesma alteração genética pode, em diferentes indivíduos, acarretar perda auditiva de diversos graus ou até mesmo surdez.

As perdas auditivas são um tipo de distúrbio sensorial muito frequente em seres humanos. Estima-se que 5% da população mundial apresente algum grau de perda auditiva, o que equivale a aproximadamente 466 milhões de pessoas, sendo 34 milhões de crianças (WHO, 2020). No Brasil, estimativas da incidência populacional de perda auditiva são difíceis de serem obtidas. No entanto, dados do censo de 2010 do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE) indicam que este quadro, em graus variados, estaria presente em cerca de 1,1% da população, ou seja, quase 2 milhões de pessoas.

Em países desenvolvidos, estima-se que entre 1-2 a cada 1.000 nascidos vivos apresentem algum grau de perda auditiva (MORTON; NANCE, 2006). Entre os poucos estudos publicados que estimam a frequência de nascidos vivos com perda auditiva na população brasileira utilizando dados de triagem auditiva neonatal, a maior parte conta com dados da região sudeste, especialmente do estado de São Paulo. Um estudo realizado em um hospital particular da cidade de São Paulo indicou uma incidência de 2,3 em 1.000 nascidos vivos com algum grau de perda auditiva (CHAPCHAP; SEGRE, 2001). Em outro estudo realizado em um hospital da rede pública da cidade de Bauru, a incidência estimada foi de 0,95 em 1.000 nascidos vivos (BEVILACQUA et al., 2010). Por fim, dados da triagem neonatal realizada em maternidades públicas da cidade de São Paulo coletados entre 2011 e 2015 sugeriram a estimativa de 1-2 bebês com deficiência auditiva a cada 1.000 nascimentos (MANZONI et al., 2015). Esses dados sugerem que a incidência de surdez ao nascimento no estado de São Paulo é similar às estimativas realizadas em países desenvolvidos.

Crianças e adultos com deficiência auditiva podem apresentar problemas como: dificuldade de aprendizado, baixo desempenho acadêmico, não desenvolvimento da fala, isolamento, solidão e frustração. Além disso, adultos com distúrbios auditivos apresentam maiores taxas de desemprego, hospitalização, depressão, demência e morte, quando comparados a adultos ouvintes (WHO, 2020).

Existem diferentes critérios para classificar a surdez de acordo com sua manifestação clínica. De acordo com a idade de manifestação é denominada pré-lingual, quando a manifestação ocorre antes do desenvolvimento da fala, e pós-lingual, quando a manifestação ocorre depois do desenvolvimento da fala. Quanto ao tipo, pode ser denominada de condutiva, se decorre de alterações estruturais nas orelhas externa ou

média que impedem a condução do som; sensorineural ou neurossensorial, se decorre de alterações em estruturas sensoriais na região interna do aparelho auditivo ou de alterações no sistema nervoso; e mista, quando decorre de uma combinação de fatores condutivos e neurossensoriais. Quanto à evolução, pode ser estacionária ou progressiva. Pode ser ainda unilateral ou bilateral, se afetar uma ou ambas as orelhas, respectivamente; simétrica ou assimétrica, se o grau de perda for igual ou diferente nas duas orelhas (SHEARER; HILDEBRAND; SMITH, 2017; ALFORD et al., 2014).

Existem diferentes sistemas propostos por diversos autores para a classificação da gravidade do quadro de perda auditiva. O sistema proposto por Lloyd e Kaplan (1978) é atualmente o mais utilizado. Os limiares auditivos são medidos em decibéis (dB), sendo que indivíduos considerados normais apresentam um limiar máximo de 25dB. A partir desse ponto são consideradas as seguintes classificações de perda auditiva: perdas leves com limiar entre 26 e 40dB, perdas moderadas com limiar entre 41 e 70dB, perdas severas (ou graves) com limiar entre 71 e 90dB e perdas profundas com limiar igual ou superior a 91dB.

A surdez pode ter como causa diversos fatores ambientais, genéticos ou ainda decorrer de uma combinação dos dois tipos em um mecanismo multifatorial. Em recém-nascidos e crianças, a maioria dos casos ambientais de surdez são decorrentes de doenças infecciosas como toxoplasmose, rubéola, citomegalovírus e herpes durante o período pré-natal, e pela meningite no período pós-natal. Além disso, prematuridade e certos distúrbios que podem ocorrer durante o período neonatal, como anoxia e hiperbilirrubinemia, também podem levar ao quadro de surdez (SMITH; BALE; WHITE, 2005; SHEARER; HILDEBRAND; SMITH, 2017).

Atualmente, a infecção congênita por citomegalovírus (CMV) é a causa mais comum de surdez de origem ambiental. Aproximadamente 90% dos recém-nascidos infectados são assintomáticos, o que dificulta o diagnóstico se não houver um programa de triagem. A prevalência é variável ao redor do mundo: enquanto em países desenvolvidos o citomegalovírus atinge cerca de 0,64% de todos os nascidos vivos, em países em desenvolvimento essa taxa varia entre 1 e 5%, demonstrando que cuidados neonatais e estratégias para a prevenção de infecção da população contribuem para a redução do número de casos. Estima-se que aproximadamente 30% dos indivíduos

classificados como sintomáticos e 10% dos classificados como assintomáticos desenvolvam algum grau de perda auditiva, que se manifesta logo após o nascimento ou durante a infância (GODERIS et al., 2014).

No Brasil, a maioria dos estudos foram realizados na região Sudeste, não retratando de forma exata o quadro do citomegalovírus no país todo. No entanto, os dados disponíveis mostram uma soroprevalência que varia entre 50 e 100% na população geral, a depender do estudo. Os valores são semelhantes aos da soroprevalência de países em desenvolvimento, o que indica que grande parte dos indivíduos teve contato com o agente infeccioso, pois convivem com condições precárias de higiene, saneamento básico, moradia e educação da população (LOBATO-SILVA, 2016).

Em adultos, grande parte dos casos de surdez pode ser decorrente de fatores ambientais, mas com grande contribuição da predisposição genética. A maioria dos casos ocorre por conta de processos degenerativos do envelhecimento do aparelho auditivo, conhecidos como presbiacusia (DROR; AVRAHAM, 2010; CUNNINGHAM; TUCCI, 2017). Estudos sugerem a existência de uma interação complexa, e ainda não totalmente compreendida, entre diversos fatores genéticos e ambientais que geram variações na idade de manifestação da presbiacusia, assim como em sua gravidade, nesses indivíduos (YAMASOBA et al., 2013).

Outra importante causa de surdez adquirida é a utilização de drogas ototóxicas, em especial de antibióticos aminoglicosídeos. Assim como na presbiacusia, existe uma interação entre fatores genéticos e ambientais, sendo que a alteração genética mais conhecida relacionada à predisposição a surdez neurossensorial induzida por aminoglicosídeos é a m.1555A>G no gene *MT-RNR1* (NC_012920), que codifica a subunidade 12S do RNAr (ESTIVILL et al., 1998).

A surdez de origem genética decorre de alterações em um ou mais genes ou em elementos regulatórios relacionados ao desenvolvimento, funcionamento e estrutura da orelha (DROR; AVRAHAM, 2010). A proporção de casos de origem genética varia dependendo do local, totalizando entre 50 e 60% dos casos em países desenvolvidos (MORTON; NANCE, 2006). No Brasil, foram poucos os levantamentos da proporção de casos de origem genética. Um estudo do final da década de 90 estimou que

correspondiam a cerca de 16% (BRAGA; OTTO; SPINELLI, 1999). No entanto, é esperado que essa fração seja maior atualmente, como resultado da diminuição do número de indivíduos com surdez decorrente de fatores ambientais em decorrência de melhorias nos cuidados com a saúde que ocorreram nos últimos anos, principalmente no estado de São Paulo. Além disso, dado que o estudo foi realizado em uma época em que testes genéticos não eram disponíveis, pode ter havido uma superestimativa da importância de fatores ambientais registrados nos prontuários dos pacientes.

1.2 Genética da perda auditiva

A surdez genética pode ser subdividida em *sindrômica* e *não-sindrômica*. Indivíduos com surdez *não-sindrômica* apresentam esta característica de forma isolada, sem outros sinais ou sintomas, e representam aproximadamente 70% dos casos.

São conhecidos aproximadamente 120 genes relacionados com a surdez de herança monogênica *não-sindrômica* (VAN CAMP; SMITH, 2020). As funções destes genes são variadas. Eles codificam proteínas do citoesqueleto, componentes da matriz extracelular, canais iônicos, proteínas de adesão, fatores de transcrição, proteínas estruturais dos estereocílios das células ciliadas cocleares e outros componentes importantes para o funcionamento adequado do aparelho auditivo (SHEARER; HILDEBRAND; SMITH, 2017).

Ainda quanto à surdez *não-sindrômica*, atualmente são conhecidos cerca de 76 genes associados com formas autossômicas recessivas, que correspondem a cerca de 70-80% dos casos genéticos e *não-sindrômicos*. Aproximadamente 45 genes estão associados a surdez autossômica dominante que representa aproximadamente 20-30% dos casos. Existem também cinco genes relacionados à surdez ligada ao cromossomo X e dois genes mitocondriais, *MT-RNR1* e *MT-TS1*, que, juntos, explicam cerca de 1-2% dos casos (SHEARER; HILDEBRAND; SMITH, 2017).

Os *lôcus* gênicos associados a surdez *não-sindrômica* foram representados por uma nomenclatura clássica: a sigla DFN (que se refere a *deafness* - “surdez” em inglês) seguida de uma classificação de acordo com o padrão de herança: DFNA para *lôcus* autossômicos com herança dominante, DFNB para *lôcus* autossômicos recessivos e

DFNX para loci ligados ao cromossomo X. Por fim, segue, após a sigla, um número que está relacionado à ordem cronológica na qual os loci foram identificados (SHEARER; HILDEBRAND; SMITH, 2017).

Os outros 30% dos casos de surdez genética compreendem os casos de surdez sindrômica, ou seja, a surdez é um dos sinais clínicos que o indivíduo pode apresentar, mas existem outros que podem acompanhá-la como, por exemplo, problemas de visão e malformações diversas que juntos constituem uma síndrome (SHEARER; HILDEBRAND; SMITH, 2017). A perda auditiva é reconhecida como uma das características em cerca de 400 síndromes, sendo algumas das mais comuns: síndrome de Pendred (OMIM #274600), síndrome de Usher (US1, OMIM #276900) e síndrome de Waardenburg (SW1, OMIM #193500) (HILGERT; SMITH; VAN CAMP, 2009).

A principal característica da surdez genética é a sua enorme heterogeneidade. Diferentes mecanismos de herança já foram associados a surdez (heterogeneidade de mecanismos de herança). Ainda, em cada possível mecanismo de herança, existem diferentes e numerosos loci associados à surdez (heterogeneidade de loci) e cada um destes loci apresenta diversas variantes patogênicas que podem causar o quadro (heterogeneidade alélica). Além disso, alguns genes, quando alterados, podem levar tanto à surdez de herança dominante e também recessiva, assim como surdez sindrômica e não-sindrômica (heterogeneidade de manifestação clínica), o que varia em função do tipo de mutação que ocorre. Por fim, não é possível associar a maioria dos genes com um quadro clínico específico. Existe grande variabilidade na idade de manifestação, grau da perda e estabilidade até mesmo entre indivíduos de uma mesma família que compartilham o mesmo defeito genético (SHEARER; HILDEBRAND; SMITH, 2017).

Como exemplo dessa heterogeneidade, podemos ressaltar o gene *MYO7A* que apresenta aproximadamente 520 variantes classificadas como patogênicas ou provavelmente patogênicas no banco de dados *Deafness Variation Database* (<https://deafnessvariationdatabase.org/gene/MYO7A>). Essas variantes estão associadas a quadros de surdez não-sindrômica de herança autossômica dominante no locus DFNA11 (OMIM #601317), surdez não-sindrômica de herança autossômica recessiva no locus DFNB2 (OMIM #600060) e síndrome de Usher tipo 1B (USH1, OMIM #276900).

1.2.1 Perda auditiva autossômica recessiva

A herança autossômica recessiva é a que mais exhibe heterogeneidade de locus, sendo relacionada a 76 genes conhecidos (Tabela 1) (VAN CAMP; SMITH, 2020). Na maioria dos casos, o quadro resultante em indivíduos que apresentam variantes patogênicas, em homozigose ou heterozigose composta, é o de perda auditiva pré-lingual, estacionária e classificada como de severa a profunda (SHEARER; HILDEBRAND; SMITH, 2017). Neste tipo de herança, as variantes patogênicas mais frequentes costumam ocorrer nos genes *GJB2*, *GJB6*, *SLC26A4*, *MYO15A*, *OTOF* e *CDH23* (HILGERT; SMITH; VAN CAMP, 2009).

O primeiro locus associado a surdez não síndrômica foi o *DFNB1*, localizado na região cromossômica 13q12.11 (GUILFORT et al., 1994). Neste locus estão presentes os genes *GJB2*, que codifica a proteína conexina 26 (KELSELL et al., 1997), e *GJB6*, que codifica a proteína conexina 30 (GRIFA et al., 1999). Ambas são proteínas relacionadas à comunicação celular através de junções intercelulares (do tipo fenda ou *gap*) por onde ocorre a reciclagem de íons de potássio nos fluidos da cóclea (BRUZZONE, WHITE, PAUL, 1996).

Variantes no gene *GJB2* são a maior causa de surdez não-síndrômica de herança autossômica recessiva em grande parte das populações, chegando a concentrar mais de 50% dos casos com esse mecanismo de herança em algumas populações de origem europeia. Cerca de 70% dos casos de alteração nesse gene estão relacionados a uma variante específica, a c.35delG ou c.35del (p.Gly12Valfs*2; NM_004004) (HILGERT; SMITH; VAN CAMP, 2009). No Brasil, a frequência de heterozigotos com a c.35delG foi estimada em 1% (SARTORATO et al., 2000). No entanto, apesar de ser amplamente associado à surdez autossômica recessiva, nesse gene também existem variantes que foram relacionadas a quadros de herança autossômica dominante, incluindo casos síndrômicos (KELSELL et al., 1997; HILGERT; SMITH; VAN CAMP, 2009).

Inicialmente, havia um número maior do que o esperado de indivíduos com uma única variante patogênica detectada no gene *GJB2*, após realização de estudos por sequenciamento convencional da porção de código desse gene, o que levou à investigação de regiões cromossômicas vizinhas e à identificação de duas deleções que

incluem, ao menos parcialmente, o gene *GJB6*: del(*GJB6*-D13S1830) com 309 kb e del(*GJB6*-D13S1854) com 232 kb. A existência de uma variante patogênica em *GJB2* em *trans* com uma das duas deleções leva a um quadro de surdez, assim como a presença dessas deleções em homozigose. Inicialmente acreditava-se em uma possível herança digênica, resultado da interação dos produtos gênicos dos genes *GJB2* e *GJB6* (DEL CASTILLO et al., 2005). Mais recentemente, foram obtidas evidências da existência de um elemento regulatório em *cis*, localizado em uma região de sobreposição das diferentes deleções já descritas próximas aos genes *GJB2* e *GJB6* em indivíduos com perda auditiva. Esse elemento, quando deletado, acarretaria a perda de expressão do *GJB2* (WILCH et al., 2010). Em um estudo realizado por Rodriguez-Paris e Schrijver (2009), não foi detectada expressão do gene *GJB2* em indivíduos com perda auditiva portadores da deleção del(*GJB6*-D13S1830) em *trans* com uma variante patogênica em *GJB2*, indicando que o quadro de perda auditiva seria decorrente da completa falta de expressão do RNAm do gene da conexina 26.

Um estudo realizado em uma coorte de 300 indivíduos não aparentados mostrou que a variante c.35delG é importante causa de surdez não-sindrômica na população brasileira, pois cerca de 7,5% dos indivíduos a apresentaram em homozigose. Mutações bialélicas patogênicas em *GJB2/GJB6* explicaram 11% dos casos incluídos neste estudo (BATISSOCO et al., 2009). Considerando a alta prevalência destas variantes na população brasileira é prioritário estabelecer uma rotina laboratorial simples que inclua o sequenciamento do gene *GJB2* e o teste de detecção das deleções próximas ao gene *GJB6* antes que se prossiga com o estudo em outros genes. Essa rotina é a recomendada pelo *American College of Medical Genetics and Genomics* (ACMG) em casos de surdez não-sindrômica com suspeita de padrão de herança recessivo, antes que sejam feitos estudos mais aprofundados por meio de técnicas de sequenciamento de nova geração (ALFORD et al., 2014).

Tabela 1 - Genes já associados à surdez não-sindrômica de herança autossômica recessiva (Adaptado de Van Camp; Smith, 2020).

Gene	Lócus	Referência
<i>GJB2</i>	DFNB1A	Kelsell et al., 1997
<i>GJB6</i>	DFNB1B	Del Castillo et al., 2002
<i>MYO7A</i>	DFNB2	Liu et al., 1997; Weil et al., 1997
<i>MYO15A</i>	DFNB3	Wang et al., 1998
<i>SLC26A4</i>	DFNB4	Li et al., 1998
<i>TMIE</i>	DFNB6	Naz et al., 2002
<i>TMC1</i>	DFNB7/11	Kurima et al., 2002
<i>TMPRSS3</i>	DFNB8/10	Scott et al., 2001
<i>OTOF</i>	DFNB9	Yasunaga et al., 1999
<i>CDH23</i>	DFNB12	Bork et al., 2001
<i>GIPC3</i>	DFNB15/72/95	Ain et al., 2007; Rehman et al., 2011; Charizopoulou et al., 2011
<i>STRC</i>	DFNB16	Verpy et al., 2001
<i>USH1C</i>	DFNB18	Ouyang et al., 2002; Ahmed et al., 2002
<i>OTOG</i>	DFNB18B	Schraders et al., 2012
<i>TECTA</i>	DFNB21	Mustapha et al., 1999
<i>OTOA</i>	DFNB22	Zwaenepoel et al., 2002
<i>PCDH15</i>	DFNB23	Ahmed et al., 2003
<i>RDX</i>	DFNB24	Khan et al., 2007
<i>GRXCR1</i>	DFNB25	Schraders et al., 2010
<i>GAB1</i>	DFNB26	Yousaf et al., 2018
<i>TRIOBP</i>	DFNB28	Shahin et al., 2006; Riazuddin et al., 2006
<i>CLDN14</i>	DFNB29	Wilcox et al., 2001
<i>MYO3A</i>	DFNB30	Walsh et al., 2002
<i>WHRN</i>	DFNB31	Mburu et al., 2003
<i>CDC14A</i>	DFNB32/105	Delmaghani et al., 2016; Imtiaz et al., 2017
<i>ESRRB</i>	DFNB35	Collin et al., 2008
<i>ESPN</i>	DFNB36	Naz et al., 2004
<i>MYO6</i>	DFNB37	Ahmed et al., 2003
<i>HGF</i>	DFNB39	Schultz et al., 2009
<i>ILDR1</i>	DFNB42	Borck et al., 2011
<i>ADCY1</i>	DFNB44	Santos-Cortez et al., 2014
<i>CIB2</i>	DFNB48	Riazuddin et al., 2012
<i>MARVELD2</i>	DFNB49	Riazuddin et al., 2006
<i>COL11A2</i>	DFNB53	Chen et al., 2005
<i>PDZD7</i>	DFNB57	Booth et al., 2015
<i>PJVK</i>	DFNB59	Delmaghani et al., 2006
<i>SLC22A4</i>	DFNB60	Ben Said et al., 2016
<i>SLC26A5</i>	DFNB61	Liu et al., 2003
<i>LRTOMT/COMT2</i>	DFNB63	Ahmed et al., 2008; Du et al., 2008

Tabela 1 - Continuação

Gene	Lócus	Referência
<i>DCDC2</i>	DFNB66	Grati et al., 2015
<i>LHFPL5</i>	DFNB66/67	Tlili et al., 2005; Shabbir et al., 2006; Kalay et al., 2006
<i>S1PR2</i>	DFNB68	Santos-Cortez et al., 2016
<i>PNPT1</i>	DFNB70	von Ameln et al., 2012
<i>BSND</i>	DFNB73	Riazuddin et al., 2009
<i>MSRB3</i>	DFNB74	Waryah et al., 2009; Ahmed et al., 2011
<i>SYNE4</i>	DFNB76	Horn et al., 2013
<i>LOXHD1</i>	DFNB77	Grillet et al., 2009
<i>TPRN</i>	DFNB79	Rehman et al., 2010; Li et al., 2010
<i>GPSM2</i>	DFNB82	Walsh et al., 2010
<i>PTPRQ</i>	DFNB84	Schraders et al., 2010
<i>OTOGL</i>	DFNB84	Yariz et al., 2012
<i>TBC1D24</i>	DFNB86	Rehman et al., 2014
<i>ELMOD3</i>	DFNB88	Jaworek et al., 2013
<i>KARS</i>	DFNB89	Santos-Cortez et al., 2013
<i>SERPINB6</i>	DFNB91	Sirmaci et al., 2010
<i>CABP2</i>	DFNB93	Schrauwen et al., 2012
<i>NARS2</i>	DFNB94	Simon et al., 2015
<i>MET</i>	DFNB97	Mujtaba et al., 2015
<i>TSPEAR</i>	DFNB98	Delmaghani et al., 2012
<i>TMEM132E</i>	DFNB99	Li et al., 2015
<i>PIIP5K2</i>	DFNB100	Yousaf et al., 2018
<i>GRXCR2</i>	DFNB101	Imtiaz et al., 2014
<i>EPS8</i>	DFNB102	Behloul et al., 2014
<i>CLIC5</i>	DFNB103	Seco et al., 2014
<i>FAM65B</i>	DFNB104	Diaz-Horta et al., 2014
<i>EPS8L2</i>	DFNB106	Dahmani et al., 2015
<i>WBP2</i>	DFNB107	Buniello et al., 2016
<i>ROR1</i>	DFNB108	Diaz-Horta et al., 2016
<i>ESRP1</i>	DFNB109	Rohacek et al., 2017
<i>COCH</i>	DFNB110	Janssens de Varebeke et al., 2018
<i>MPZL2</i>	DFNB111	Wesdorp et al., 2018
<i>BDP1</i>	DFNB112	Giroto et al., 2013
<i>CEACAM16</i>	DFNB113	Booth et al., 2018
<i>GRAP</i>	DFNB114	Li et al., 2019
<i>SPNS2</i>	DFNB115	Ingham et al., 2019
<i>CLDN9</i>	-	Sineni et al., 2019

1.3 Estudo molecular da surdez genética

A técnica de sequenciamento de DNA pelo método de Sanger foi desenvolvida na década de 70 (SANGER; NICKLEN; COULSON, 1977). Com o passar dos anos, diversas alterações foram realizadas para aperfeiçoá-la, levando à sua automatização na década de 90 (HEATHER; CHAIN, 2016). Com o aumento da eficiência, o sequenciamento de Sanger se tornou o padrão ouro para os testes moleculares diagnósticos (MOORTHIE; MATTOCKS; WRIGHT, 2011), o que permitiu a disponibilização de testes moleculares para surdez que incluíam a triagem de algumas variantes ou genes específicos (SHEARER; SMITH, 2012).

Esta estratégia se mostrou efetiva em alguns casos, nos quais existe um gene candidato com grande probabilidade de causar o quadro. Por exemplo, são recomendados o sequenciamento do gene *GJB2* em indivíduos com suspeita de surdez não-sindrômica de herança autossômica recessiva e o sequenciamento do gene *SLC26A4* em indivíduos com suspeita de síndrome de Pendred (ALFORD et al., 2014).

Apesar de sua disponibilidade, por muitos anos os testes genéticos para surdez foram considerados não prioritários. As limitações das técnicas disponíveis somadas à alta heterogeneidade da surdez genética tornavam o sequenciamento de todos os genes já associados a este quadro uma alternativa de alto custo e, por um longo período de tempo, considerada inviável (SHEARER; SMITH, 2012).

No início dos anos 2000, em uma tentativa de superar as limitações das técnicas de sequenciamento, iniciou-se uma corrida para o desenvolvimento de novas tecnologias com maior capacidade de sequenciamento, maior velocidade de processamento e menor custo (MOORTHIE; MATTOCKS; WRIGHT, 2011).

O sequenciamento simultâneo de todos os genes associados ao quadro de surdez só foi possível com o desenvolvimento do sequenciamento de nova geração (MOORTHIE, MATTOCKS; WRIGHT, 2011; SHEARER; SMITH, 2012). Além de revalorizar os testes genéticos para surdez, essa tecnologia também auxiliou na descoberta de novos genes que não haviam sido previamente relacionados com essa característica e, conseqüentemente, contribuiu para aumentar os conhecimentos sobre a surdez genética (SHEARER et al., 2011).

Até 2010, os esforços de diversos laboratórios em identificar genes de surdez levaram a um total de 60 genes mapeados ao longo de duas décadas. Por outro lado, apenas nos primeiros cinco anos de uso do sequenciamento de nova geração, entre 2010 e 2015, foram identificados cerca de 21 novos genes relacionados a surdez não-sindrômica. Juntamente com a maior rapidez na identificação de novos genes, alguns obstáculos existentes em técnicas convencionais foram contornados, como a necessidade de grandes famílias e fenótipos pouco variáveis para a realização dos estudos que se baseavam principalmente em mapeamento genético por ligação (ATIK et al., 2015a).

O sequenciamento de nova geração (*Next Generation Sequencing* - NGS), também conhecido como sequenciamento massivo paralelo, consiste no sequenciamento de milhões de fragmentos de DNA simultaneamente (YOHE; THYAGARAJAN, 2017). Esta técnica tem sido adotada em diversos laboratórios de genética clínica por não restringir o estudo a um único gene ou variante e sim permitir o sequenciamento de múltiplos genes, do exoma ou até mesmo do genoma completo em um curto espaço de tempo (WRIGHT; FITZPATRICK; FIRTH, 2018).

De maneira geral, o sequenciamento massivo paralelo consiste em três etapas: o preparo da biblioteca, o sequenciamento propriamente dito e a análise bioinformática. Durante o preparo da biblioteca ocorre o preparo do DNA para a utilização no sequenciador e o enriquecimento das regiões alvo, ou seja, das regiões que se deseja sequenciar, por exemplo, alguns genes específicos no caso de um painel gênico ou o exoma completo (YOHE; THYAGARAJAN, 2017).

Esta técnica é muito útil principalmente em detectar alterações causativas de doenças do tipo variantes de nucleotídeo único (SNVs) e pequenas inserções e/ou duplicações (indels), em situações nas quais sequenciar todos os genes candidatos pelo método tradicional de Sanger não é uma escolha viável. Quanto menos específico é um fenótipo, maiores as chances deste poder ser causado por uma variante que pode estar presente em diversos genes diferentes. A surdez monogênica pode ser causada por alterações em diversos loci, que resultam em características clínicas indistinguíveis; assim, o teste simultâneo de todos os genes conhecidos pode acelerar o processo de identificação das variantes patogênicas causativas. Dessa forma, em condições como a

surdez, após exclusão do locus DFNB1, é preferível que seja realizado o sequenciamento de um grande número de genes, por meio do uso de um painel ou também por meio do sequenciamento completo do exoma (WRIGHT; FITZPATRICK; FIRTH, 2018).

O estudo molecular por meio de técnicas de sequenciamento de nova geração passou a ser recomendado nas diretrizes do ACMG para avaliação da perda auditiva em pacientes cuja triagem do locus DFNB1 tenha resultado normal. São propostos estudos utilizando painéis gênicos, sequenciamento completo do exoma e até mesmo sequenciamento completo do genoma, conforme apresentado na Figura 2 (ALFORD et al., 2014).

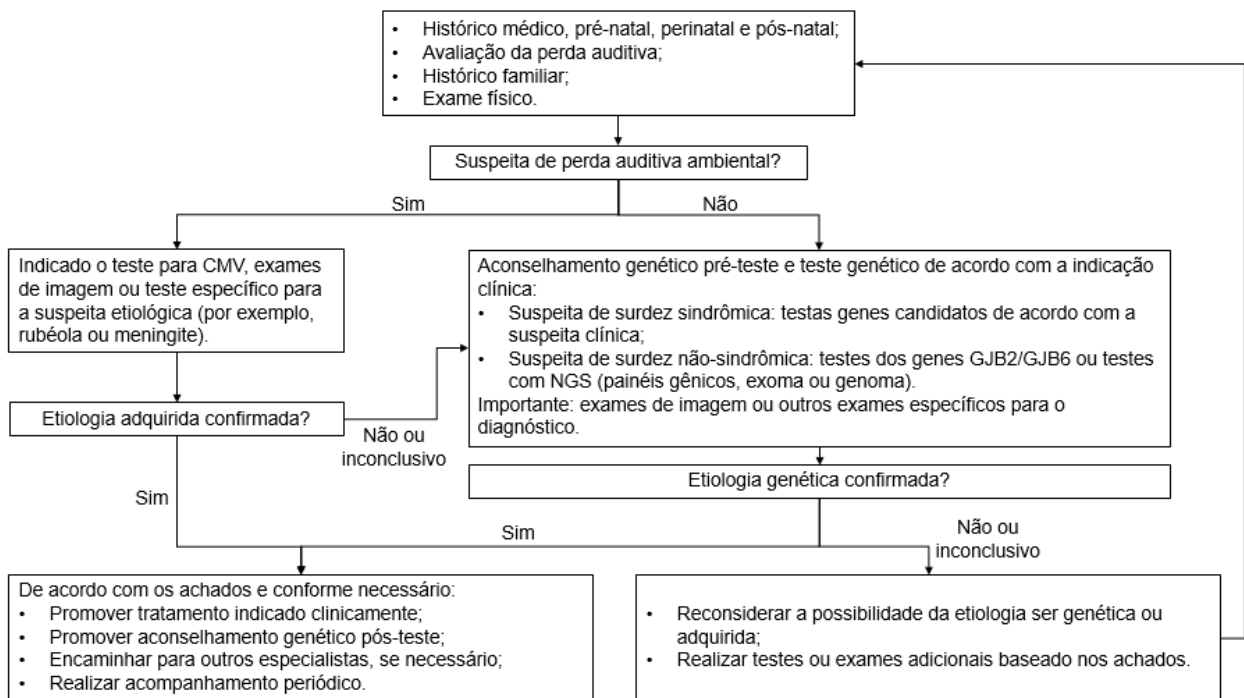


Figura 2 - Abordagem para a avaliação genética da perda auditiva proposta pelo ACMG. Adaptado de Alford et al., 2014.

A maior vantagem na realização do sequenciamento completo do exoma consiste no fato de que pouco mais de 1% do genoma é sequenciado e atualmente é onde se encontram cerca de 85% das variantes patogênicas (SHEARER et al., 2011).

O custo do sequenciamento completo do exoma é menor quando comparado ao sequenciamento completo do genoma, assim como a quantidade de dados a serem

interpretados (SHEARER et al., 2011). Além disso, diferentemente de um painel gênico, é vantajoso por permitir identificar novos genes relacionados a um fenótipo que não foram descritos previamente e identificar mecanismos de herança novos. Por fim, com a descoberta de novos genes, é necessário apenas revisitar os resultados de um exoma já realizado para a análise específica destes novos genes, não sendo necessário refazer o sequenciamento (WRIGHT; FITZPATRICK; FIRTH, 2018).

A interpretação dos resultados é um processo meticuloso já que o sequenciamento resulta na identificação de diversas variantes com potencial a explicar o quadro clínico e podem existir diferenças no processo de curadoria das variantes entre laboratórios (YOHE; THYAGARAJAN, 2017). Na tentativa de reduzir essa heterogeneidade, o ACMG criou em 2015 um sistema com recomendações para a classificação das variantes em cinco categorias, de acordo com o seu significado clínico: benignas, provavelmente benignas, variantes de efeito desconhecido (VUS), provavelmente patogênicas e patogênicas (RICHARDS et al., 2015). Ainda existem críticas a este sistema de classificação por alguns autores, principalmente devido à falta de refinamento de alguns dos critérios (NYKAMP et al., 2017) e a persistência de ausência de consenso na classificação em parte dos casos (PEPIN et al., 2016). Contudo, a criação do sistema da ACMG foi um grande passo para a classificação de variantes e é utilizado por diversos profissionais como referência.

Posteriormente, foi publicado um artigo (OZA et al., 2018) contendo adaptações das regras previamente descritas pelo ACMG para a interpretação de variantes (RICHARDS et al., 2015) a serem utilizadas no contexto específico da surdez genética. Nesta publicação são mantidas três das regras previamente descritas, mas recomenda-se que quatro delas sejam removidas e 21 regras apresentam especificidades para se ajustarem a particularidades encontradas em genes relacionados à surdez. Assim, espera-se que as interpretações sejam padronizadas e que os pacientes submetidos a testes genéticos sejam melhor orientados.

O primeiro estudo utilizando técnicas de sequenciamento de nova geração aplicado à surdez foi publicado em 2010 por pesquisadores do *Molecular Otolaryngology and Renal Research Laboratories* da Universidade de Iowa. Os autores utilizaram um painel multigênico para pesquisa molecular denominado OtoSCOPE (SHEARER et al.,

2010). Neste estudo, o painel contava com 54 genes relacionados à surdez. No entanto, o painel tem sido atualizado periodicamente conforme novos genes são descritos. Atualmente, o painel se encontra na versão 8 e conta com 152 genes relacionados à surdez síndrômica e não-síndrômica.

Em um grande estudo utilizando o painel OtoSCOPE, 1119 amostras de pacientes com perda auditiva foram analisadas. Foram utilizadas a versão 4 do painel, que contava com 66 genes, em 408 amostras, e a versão 5 do painel, que contava com 89 genes, em 711 amostras. Neste estudo foi identificada a causa da perda auditiva em 440 indivíduos (39%), sendo as variantes patogênicas encontradas em 49 genes (SLOAN-HEGGEN et al., 2016).

Estudos que utilizaram tecnologias de sequenciamento de nova geração para estudo molecular da surdez mostraram variabilidade nas taxas de detecção das variantes causativas. Em uma revisão de estudos que utilizaram painéis gênicos, as taxas de detecção variaram de 10% a 83%, sendo o valor médio igual a 41% (SMITH; SHEARER, 2015).

Em um estudo realizado em nosso laboratório, utilizando um painel de 99 genes relacionados à perda auditiva, as variantes causativas foram detectadas em 41 dos 91 indivíduos (45,1%), dos quais 34 (37,4%) apresentaram variantes classificadas como patogênicas ou provavelmente patogênicas de acordo com os critérios do ACMG. Dentre os indivíduos com suspeita de perda auditiva de herança autossômica recessiva, a taxa de detecção de variantes causativas foi de 32,4% - 12 dos 37 casos (DIAS, 2018).

Em uma revisão de estudos que utilizaram o sequenciamento completo do exoma, a taxa de detecção média de variantes causativas foi de 56% para casos de surdez não-síndrômica (WRIGHT; FITZPATRICK; FIRTH, 2018). As variabilidades das taxas de detecção podem estar relacionadas não só às técnicas utilizadas, mas aos critérios de inclusão dos pacientes e genes primariamente excluídos, como é possível observar nos diferentes estudos que realizaram o sequenciamento completo do exoma na Tabela 2.

Tabela 2 - Taxas de detecção de variantes causativas em estudos que utilizaram o sequenciamento completo do exoma no diagnóstico molecular da perda auditiva. AR: autossômico recessivo; NS: não-sindrômico; S: síndrômico; N: tamanho da amostra.

Referência	População	Critérios de inclusão	Triagem prévia	N	Taxa global de detecção
Díaz-Horta et al., 2012	Turcos/ Iranianos	AR/NS	DFNB1	20	60%
Atik et al., 2015b	Turcos	AR/NS	DFNB1 e m.1555A>G	22	63,63%
Kim et al., 2015	Coreanos	Casos isolados	DFNB1	11	45,40%
Bademci et al., 2016	Multiétnico	AR/NS	DFNB1	160	56%
Churbanov et al., 2016	Russos	AR/NS	DFNB1	7	42%
Yan et al., 2016	Multiétnico	NS	DFNB1	342	15%
Seco et al., 2017	Holandeses	Sem critérios específicos	DFNB1 em 40% dos casos	200	33,5%
Likar et al., 2018	Caucasianos	Dois grupos: S e NS	DFNB1 no grupo NS	49 (17 S e 32 NS)	30,6% (47% S e 21,8% NS)
Sheppard et al., 2018	Multiétnico	Sem critérios específicos	N/A	43	39,5%
Noman et al., 2019	Paquistaneses	AR/NS	N/A	7	42%
Sang et al., 2019	Chineses	AR/NS	N/A	33	48,50%
Zou et al., 2019	Chineses	Casos isolados	DFNB1, SLC26A4 e MT-RNR1	38	26%

Uma das desvantagens do sequenciamento do exoma é que o aumento da sensibilidade do teste, cobrindo um maior número de regiões do genoma em comparação com um painel gênico, pode resultar na diminuição da cobertura e em uma menor especificidade em algumas das regiões interessantes relacionadas à surdez genética. Em contrapartida, aumentando-se o número de regiões analisadas, aumenta-se o poder de diagnóstico, inclusive permitindo a identificação de variantes patogênicas em genes relacionados a condições que não eram o foco do estudo (WRIGHT; FITZPATRICK; FIRTH, 2018).

A detecção de variantes com elevado potencial de patogenicidade em genes que não são o foco do estudo inicialmente inclui principalmente aquelas que indicam

predisposição para condições com manifestação na idade adulta, como o câncer, e reações adversas a algumas drogas (WRIGHT; FITZPATRICK; FIRTH, 2018). De acordo com o ACMG, existem 59 genes associados a doenças que podem conter variantes com alta penetrância, e com intervenções possíveis, que deveriam ter as variantes patogênicas sempre reportadas aos consulentes (KALIA et al., 2016). Inicialmente, o ACMG utilizava o termo “achados incidentais” para designar essas variantes. Após uma revisão concluiu-se que se a análise destes genes estava ocorrendo intencionalmente o termo “incidental” não fazia sentido e o termo “achados secundários” passou a ser utilizado (KALIA et al., 2016). No entanto, a análise destas variantes e a necessidade de reportá-las ainda é alvo de enorme controvérsia.

A *European Society of Human Genetics* utiliza o termo “achados não solicitados”, por acreditar que a técnica utilizada no sequenciamento de nova geração já sugere que dados relacionados ao diagnóstico em questão serão gerados, portanto, estes não seriam incidentais (VAN EL et al., 2013). Logo, o recomendável seria a ocorrência de aconselhamento pré-teste, no qual se discutisse a real necessidade de um teste genético mais abrangente - evitando esses achados - e esclarecendo o que são os achados não solicitados, assim como as possibilidades de ocorrência e suas consequências para os indivíduos (MATTHIJS et al., 2016).

De forma geral, a recomendação da *European Society of Human Genetics* é a de que os laboratórios elaborem um protocolo, com o auxílio de um comitê de ética, no qual fique claro se é oferecida a opção do consulente saber sobre “achados não solicitados” e sobre o *status* de portador heterozigótico de variantes patogênicas de doenças com padrão autossômico recessivo. Ao oferecer esta opção, o laboratório fica responsável pela logística de aconselhamento pré-teste e discussão com os consulentes das possíveis implicações dos resultados (MATTHIJS et al., 2016).

1.4 Aconselhamento genético e perda auditiva

A definição de aconselhamento genético mais utilizada foi a proposta por Fraser (1974) e endossada pela *American Society of Human Genetics* (ASHG) em 1975, descrevendo o aconselhamento genético como um “processo de comunicação que lida

com os problemas humanos associados à ocorrência ou ao risco de recorrência de uma doença genética em uma família”, descrição que é ainda hoje utilizada pelos profissionais da área.

De acordo com a *American Society of Human Genetics* (1975), o processo do aconselhamento genético requer profissionais qualificados auxiliando um indivíduo ou família: na compreensão do diagnóstico, prognóstico e possíveis tratamentos disponíveis; na compreensão sobre a hereditariedade da condição e do possível risco de recorrência; no conhecimento de alternativas disponíveis para a reprodução diante do risco de recorrência e também de ações que podem ser tomadas de acordo com os objetivos, crenças e valores dos indivíduos.

A identificação de variantes patogênicas em indivíduos com suspeita de surdez genética leva à definição da etiologia e a um melhor entendimento sobre a causa por parte da família, podendo acarretar benefício emocional, diminuindo sentimentos de ansiedade e culpa. Além disso, é possível realizar testes genéticos para identificar possíveis portadores das variantes patogênicas, identificando indivíduos com probabilidade de apresentar o quadro de surdez no futuro ou que possuem chances de ter prole com o quadro (ARNOS, 2003).

Esse esclarecimento é importante não somente em grandes famílias com diversos indivíduos afetados, mas também em casos isolados (ARNOS, 2003). O aconselhamento genético se torna importante principalmente devido ao caráter heterogêneo da surdez, pois existem diversos padrões possíveis de herança, o que pode alterar as probabilidades de recorrência.

A maior dificuldade no aconselhamento genético de indivíduos surdos é a comunicação. Portanto, é importante que os profissionais tenham consciência de que algumas alternativas serão necessárias, como linguagem de sinais, leitura labial, leitura/escrita e até mesmo a assistência de amplificadores de som e intérpretes ou aplicativos de conversão de sons em comunicação escrita. O profissional deve indagar previamente à consulta qual forma de comunicação é preferível (ISRAEL et al., 1992). Contudo, uma alternativa muito utilizada tem sido um acompanhante para atuar como intérprete do consulente.

É importante ressaltar que a percepção de surdez pode ser diferente entre os indivíduos. Uma parcela da população surda se identifica com uma comunidade específica que não vê sua condição como uma deficiência ou limitação e possui costumes, comportamentos e valores únicos: a comunidade surda (LANE, 2005). Indivíduos que fazem parte dessa comunidade tendem a ter uma visão negativa do aconselhamento genético, já que a definição etiológica da surdez genética poderia levar a uma redução no número de crianças surdas e, conseqüentemente, ameaçaria sua comunidade (MIDDLETON; HEWISON; MUELLER, 1998).

Considerando esses fatores, é importante que os profissionais envolvidos no processo de aconselhamento genético tenham cuidado com termos como “risco”, “deficiência” e “tratamento”, pois nem todo indivíduo surdo enxerga sua condição como uma deficiência (SHEARER; HILDEBRAND; SMITH, 2017).

Uma parcela dos indivíduos surdos interessados no aconselhamento genético e em saber sobre a origem de sua condição estão mais preocupados com as questões médicas, sociais ou educacionais e não pensam em questões relacionadas a planejamento familiar, reprodução e prevenção (SHEARER; HILDEBRAND; SMITH, 2017).

Indivíduos ouvintes ou que possuem perdas auditivas mais leves são os que costumam se preocupar mais com o diagnóstico pré-natal. Já os indivíduos com perdas auditivas graves ou profundas e que se identificam como da comunidade surda tendem a descartar esta hipótese. No entanto, o desejo do planejamento familiar costuma ser maior nos dois grupos quando existe um quadro sindrômico na família, como a síndrome de Usher (TANEJA et al., 2004).

Uma avaliação genética com exame físico detalhado é de grande importância para auxiliar na identificação de possíveis síndromes até então não diagnosticadas. A preocupação com a gravidade da surdez pode fazer passar despercebidas outras alterações presentes que, em alguns casos, podem se manifestar tardiamente, como na síndrome de Usher, por exemplo, na qual a retinose pigmentar pode aparecer anos depois da surdez. Com a identificação do quadro sindrômico, seguido do aconselhamento genético adequado, é possível realizar o planejamento educacional e familiar, assim

como o manejo adequado de condições associadas à síndrome específica (SCHEIN; MILLER, 2008).

Outro ponto importante é a orientação sobre fatores de risco, como drogas ototóxicas, já que algumas mutações mitocondriais estão relacionadas a propensão à perda auditiva após o uso de antibióticos aminoglicosídeos (DROR; AVRAHAM, 2010).

2. OBJETIVOS

O objetivo deste estudo é identificar as alterações moleculares que explicam o quadro de perda auditiva em casuística do Laboratório de Genética Humana do IB-USP selecionada por apresentar surdez de provável herança autossômica recessiva, por meio do sequenciamento massivo paralelo do exoma (WES).

Os objetivos específicos deste estudo são:

- Identificar novas variantes com potencial patogênico em genes já associados à surdez;
- Avaliar a eficácia do sequenciamento do exoma em identificar a causa genética da surdez em casuística selecionada com padrão presumidamente autossômico recessivo;
- Identificar novos genes candidatos a explicar a surdez;
- Avaliar a contribuição dos diferentes genes relacionados à surdez recessiva em uma amostra da população brasileira;
- Melhorar a eficiência do aconselhamento genético dos afetados e de seus familiares.

5. CONCLUSÕES

Dentre os 63 probandos com amostras submetidas ao sequenciamento completo do exoma, foram encontradas variantes causativas em genes previamente associados à surdez em 13 indivíduos, sendo seis pertencentes ao grupo “monoalélicos” e sete pertencentes ao grupo com suspeita de surdez autossômica recessiva com base na genealogia. A taxa de detecção no grupo de probandos com suspeita de surdez

autossômica recessiva pela genealogia se mostrou abaixo da observada em outros estudos que utilizaram o sequenciamento completo do exoma para detectar variantes causativas em grupos com suspeita de surdez decorrente deste tipo de herança. Fatores como a triagem prévia de alguns locos antes da realização do sequenciamento completo do exoma, os critérios de inclusão de probandos na casuística dos estudos e a qualidade do sequenciamento de nova geração realizado podem ter influenciado este resultado.

Foi possível identificar oito novas variantes classificadas como patogênicas ou provavelmente patogênicas em genes já previamente relacionados à perda auditiva que não haviam sido previamente descritas em bancos de dados. Além disso, foram identificados dois casos de possível surdez sindrômica e um caso com hipótese de surdez sindrômica segue em aberto, evidenciando a importância de uma reavaliação clínica detalhada nos probandos, que podem desenvolver características fenotípicas importantes no decorrer da vida.

A análise retrospectiva das famílias com surdez atendidas no LGH desde o ano 2000 indicou 184 casos com suspeita inicial de herança autossômica recessiva. Apenas 60 casos, que não tiveram variantes patogênicas identificadas na triagem inicial, ainda não puderam ser incluídos em estudos mais amplos que utilizassem o sequenciamento de nova geração. Dos 124 casos restantes, 75 receberam diagnóstico molecular. Além da já reconhecida importante contribuição do gene *GJB2* na surdez autossômica recessiva, foi observada uma maior contribuição das alterações nos genes *OTOF*, *CDH23*, *MYO15A*, *USH2A* e *SLC26A4* na amostra.

Em relação a filtragem de variantes em homozigose em genes não relacionados previamente à surdez na prole de casais consanguíneos, foi possível identificar 19 variantes em 17 probandos. Não foram detectadas variantes no mesmo gene em mais de uma família diferente. A variante c.1618A>G no gene *FGFR3* chamou a atenção por ter sido classificada como provavelmente patogênica pelos critérios ACMG e por esse gene estar relacionado à síndrome de CATSHL, que apresenta a perda auditiva como um dos sinais clínicos. Além disso, há uma família descrita na literatura com padrão autossômico recessivo, sendo recomendada a reavaliação do probando para investigar alterações que poderiam estar associadas à síndrome. Variantes que resultam em provável perda de função foram identificadas em homozigose nos genes *CSH2* e *RGPD3*.

A variante c.3909dup no gene *RGPD3* é a que apresentou maior potencial, entre as variantes de perda de função, de explicar o quadro de surdez, considerando que estudos de associação com SNPs neste gene indicaram uma possível relação com o aparelho auditivo.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALFORD, R. A.; ARNOS, K. S.; FOX, M.; LIN, J. W.; PALMER, C. G.; PANDYA, A.; REHM, H. L.; ROBIN, N. H.; SCOTT, D. A.; YOSHINAGA-ITANO, C. American College of Medical Genetics and Genomics guideline for the clinical evaluation and etiologic diagnosis of hearing loss. **Genetics in Medicine**, v.16, n. 4, p.347-355, 2014.
- AMERICAN SOCIETY OF HUMAN GENETICS. Genetic Counseling. **American Journal of Human Genetics**, v. 27, p. 240-242, 1975.
- ARNOS, K. S. The implications of genetic testing for deafness. **Ear & Hearing**, v. 24, n. 4, p. 324-331, 2003.
- ATIK, T.; BADEMCI, G.; DIAZ-HORTA, O.; BLANTON, S. H.; TEKIN, M. Whole-exome sequencing and its impact in hereditary hearing loss. **Genetics Research**, v. 94, n. 4, p. 1-8, 2015a.
- ATIK, T.; ONAY, H.; AYKUT, A.; BADEMCI, G.; KIRAZLI, T.; TEKIN, M.; OZKINAY, F. Comprehensive analysis of deafness genes in families with autosomal recessive nonsyndromic hearing loss. **PLOS One**, v. 10, n. 10, 1-11, 2015b.
- BABANEJAD, M.; FATTAHI, Z.; BAZAZZADEGAN, N.; NISHIMURA, C.; MEYER, N.; NIKZAT, N.; SOHRABI, E.; NAJMABADI, A.; JAMALI, P.; HABIBI, F.; SMITH, R. J. H.; KAHRIZI, K.; NAJMABADI, H. A comprehensive study to determine heterogeneity of autosomal recessive nonsyndromic hearing loss in Iran. **American Journal of Medical Genetics**, v. 158A, n. 10, p.2485-2492, 2012.
- BADEMCI, G.; FOSTER II, J.; MAHDIEH, N.; BONYADI, M.; DUMAN, D.; CENGIZ, F. B.; MENENDEZ, I.; DIAZ-HORTA, O.; SHIRKAVAND, A.; ZEINALI, S.; SUBASIOGLU, A.; TOKGOZ-YILMAZ, S.; HERNANDEZ, F. H.; SORDO, M. L. A.; DOMINGUEZ-ABURTO, J.; HERNANDEZ-ZAMORA, E.; MONTENEGRO, P.; PAREDEZ, R.; MORETA, G.; VINUEZA, R.; VILLEGAS, F.; BENITEZ, S. M.; GUO, S.; BOZAN, N.; TOS, T.; INCESULU, S.; SENNAROGLU, G.; BLANTON, S. H.; AKAY, H. O.; YILDIRIM-BAYLAN, M.; TEKIN, M. Comprehensive analysis via exome sequencing uncovers genetic etiology in autosomal recessive non-syndromic deafness in a large multiethnic cohort. **Genetics in Medicine**, v. 18, n. 4, p.364-371, 2016.
- BARTTER, F. C.; PRONOVE, P.; GILL, J. R.; MC CARDLE, R. C.; DILLER, E. Hyperplasia of the juxtaglomerular complex with hyperaldosteronism and hypokalemic alkalosis: a new syndrome. **The American Journal of Medicine**, v. 33, n. 6, p. 811-828, 1962.
- BATISSOCO, A. C.; ABREU-SILVA, R. S.; BRAGA, M. C. C.; LEZIROVITZ, K.; DELLA-ROSA, V.; ALFREDO T JR; OTTO, P. A.; MINGRONI-NETTO, R. C. Prevalence of *GJB2* (Connexin-26) and *GJB6* (Connexin-30) mutations in a cohort of 300 Brazilian hearing-impaired individuals: implications for diagnosis and genetic counseling. **Ear and Hearing**, v. 30, n. 1, p. 1-7, 2009.
- BEVILACQUA, M. C.; ALVARENGA, K. F.; COSTA, O. A.; MORET, A. L. M. The universal newborn hearing screening in Brazil: from identification to intervention. **International Journal of Pediatric Otorhinolaryngology**, v. 74, n. 5, p. 510-515, 2010.
- BRAGA, M. C. C.; OTTO, P. A.; SPINELLI, M. Recurrence risks in cases of nonsyndromic deafness. **The Brazilian Journal of Dysmorphology and Speech-Hearing Disorders**, v. 2, p. 33-40, 1999.

- BRUZZONE, R.; WHITE, T. W., PAUL, D. L. Connections with connexins: The molecular basis of direct intercellular signaling. **European Journal of Biochemistry**, v.238, n. 1, p. 1-27, 1996.
- CHAPCHAP, M. J.; SEGRE, C. M. Universal newborn hearing screening and transient evoked otoacoustic emission: new concepts in Brazil. **Scandinavian Audiology Supplement**, v. 53, p. 33-36, 2001.
- CHURBANOV, A. Y.; KARAFET, T. M.; MOROZOV, I. V.; MIKHALSKAIA, V. Y.; ZYTSAR, M. V.; BONDAR, A. A.; POSUKH, O.L. Whole exome sequencing reveals homozygous mutations in *RAI1*, *OTOF* and *SLC26A4* genes associated with nonsyndromic hearing loss in Altain families (South Siberia). **PLOS One**, v. 11, n. 4, p. 1-17, 2016.
- CUNNINGHAM, L. L.; TUCCI, D. L. Hearing loss in adults. **The New England Journal of Medicine**, v. 377, n. 25, p. 2465-2473, 2017.
- DEL CASTILLO, F, J.; RODRÍGUEZ-BALLESTEROS, M.; ÁLVAREZ, A.; HITCHIN, T.; LEONARDI, E.; OLIVEIRA, C. A.; AZAIEZ, H.; BROWNSTEIN, Z.; AVENARIUS, M. R.; MARLIN, S.; PANDYA, A.; SHAHIN, H.; SIEMERING, K. R.; WEIL, D.; WUYTS, W.; AGUIRRE, L. A.; MARTÍN, Y.; MORENO-PELAYO, M. A.; VILLAMAR, M.; AVRAHAM, K.B.; DHL, H. H. N.; KANAAN, M.; NANCE, W. E.; PETIT, C.; SMITH, R. J. H.; VAN CAMP, G.; SARTORATO, E. L.; MURGIA, A.; MORENO, F.; DEL CASTILLO, I. 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 Human Genetics**, v. 42, n. 7, p. 588-594, 2005.
- DIAS, A. M. M. **Estudo da heterogeneidade genética da surdez por sequenciamento de nova geração**. 2018. 108 f. Dissertação (Mestrado Profissional em Aconselhamento Genético e Genômica Humana - Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, São Paulo.
- DIAS, A. M. M.; LEZIROVITZ, K.; NICASTRO, F. S.; MENDES, B. C. A.; MINGRONI-NETTO, R. C. Further evidence for loss-of-function mutations in the *CEACAM16* gene causing nonsyndromic autosomal recessive hearing loss in humans. **Journal of Human Genetics**, v. 64, n. 3, p. 257-260, 2018.
- DIAZ-HORTA, O.; DUMAN, D.; FOSTER II, J.; SIRMACI, A.; GONZALEZ, M.; MAHDIEH, N.; FOTOUHI, N.; BONYADI, M.; CENGIZ, F. B.; MENENDEZ, I.; ULLOA, R. H.; EDWARDS, Y. J. K.; ZUCKNER, S.; BLANTON, S.; TEKIN, M. Whole-exome sequencing efficiently detects rare mutations in autosomal recessive nonsyndromic hearing loss. **PLOS One**, v. 7, n. 11, p. 1-5, 2012.
- DROR, A. A.; AVRAHAM, K. B. Hearing impairment: a panoply of genes and functions. **Neuron**, v. 68, n. 2, p. 293-308, 2010.
- DUMAN, D.; TEKIN, M. Autosomal recessive nonsyndromic genes: a review. **Frontiers in Bioscience**, v. 17, p. 2213-2236, 2012.
- ESTIVILL, X.; GOVEA, N.; BARCELÓ, A.; PERELLÓ, E.; BADENAS, C.; ROMERO, E.; MORAL, L.; SCOZZARI, R.; D'URBANO, L.; ZEVIANI, M.; TORRONI, A. 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**, v. 62, n. 1, p. 27-35, 1998.

- FARRER, L. A.; GRUNDFAST, K. M.; AMOS, J.; ARNOS, K. S.; ASHER, J. H.; BEIGHTON, P.; DIEHL, S. R.; FEZ, J.; FOY, C.; FRIEDMAN, T. B.; GREENBERG, J.; HOTH, C.; MARAZITA, M.; MILUNSKY, A.; MORELL, R.; NANCE, W.; NEWTON, V.; RAMESAR, R.; AGUSTIN, T. B. S.; SKARE, J.; STEVENS, C. A.; WAGNER, R. G.; WILCOX, E. R.; WINSHIP, I.; READ, A. P. Waardenburg syndrome (WS) type I is caused by defects at multiple loci, one of which is near ALPP on chromosome 2: first report of the WS consortium. **American Journal of Human Genetics**, v. 50, n. 5, p. 902–13, 1992.
- FRASER, F. C. Genetic counseling. **American Journal of Human Genetics**, v. 26, n. 5, p. 636-659, 1974.
- GODERIS, J.; DE LEENHEER, E.; SMETS, K.; VAN HOECKE, H.; KEYMEULEN, A.; DHOOGHE, I. Hearing loss and congenital CMV infection: a systematic review. **Pediatrics**, v. 134, n. 5, p. 972-982, 2014.
- GRIFA, A.; WAGNER, C. A.; D'AMBROSIO, L.; MELCHIONDA, S.; BERNARDI, F.; LOPEZ-BRIGAS, N.; RABIONET, R.; ARBONES, M.; MONICA, M. D.; ESTIVILL, X.; ZELANTE, L.; LANG, F.; GASPARINI, P. Mutations in *GJB6* cause nonsyndromic autosomal dominant deafness at DFNA3 locus. **Nature Genetics**, v. 23, p. 16-19, 1999.
- GUILFORT, P.; ARAB, S. B.; BLANCHARD, S.; LEVILLIERS, J.; WEISSENBACH, J.; BELKAHIA, A.; PETIT, C. A non-syndromic form of neurosensory, recessive deafness maps to the pericentromeric region of chromosome 13q. **Nature Genetics**, v. 6, n. 1, p. 24-28, 1994.
- HEATHER, J. M.; CHAIN, B. The sequence of sequencers: The history of sequencing DNA. **Genomics**, v. 107, n. 1, p. 1-8, 2016.
- HEHIR-KWA, J. Y.; PFUNDT, R.; VELTMAN, J. A. Exome sequencing and whole genome sequencing for the detection of copy number variation. **Expert Review of Molecular Diagnostics**, v. 15, n. 8, p.1023-1032, 2015.
- HILGERT, N.; SMITH, R. J. H.; VAN CAMP, G. Forty-six genes causing nonsyndromic hearing impairment: which ones should be analyzed in DNA diagnostics? **Mutation Research**, v. 681, n. 2-3, p. 189-196, 2009.
- HOLLISTER, D. W.; KLEIN, S. H.; DEJAGER, H. J.; LACHMAN, R. S.; RIMOIN, D. L. The lacrimo-auriculo-dento-digital syndrome. **The Journal of Pediatrics**, v. 83, n. 3, p. 438-444, 1973.
- ISRAEL, J.; CUNNINGHAM, M.; THUMANN, H.; ARNOS, K. S. Genetic counseling for deaf adults: communication/language and cultural considerations. **Journal of Genetic Counseling**, v. 1, n. 2, p. 136-153, 1992.
- KALIA, S. S.; ADELMAN, K.; BALE, S. J.; CHUNG, W. K.; ENG, C.; EVANS, J. P.; HERMAN, G. E.; HUFNAGEL, S. B.; KLEIN, T. E.; KORF, B. R.; MCKELVEY, K. D.; ORMOND, K. E.; RICHARDS, C. S.; VLANGOS, C. N.; WATSON, M.; MARTIN, C. L.; MILLER, D. T. Recommendations for reporting of secondary findings in clinical exome and genome sequencing, 2016 update (ACMG SF v2.0): a policy statement of the American College of Medical Genetics and Genomics. **Genetics in Medicine**, v. 19, n. 2, p. 249-255, 2016.
- KELSELL, D. P.; DUNLOP, J.; STEVENS, H. P.; LENCH, N. J.; LIANG, J. N.; PARRY, G.; MUELLER, R. F.; LEIGH, I. M. Connexin 26 mutations in hereditary non-syndromic sensorineural deafness. **Nature**, v. 387, n. 6628, p. 80-83, 1997.

- KOENEKOOP, R. K.; ARRIAGA, M. A.; TRZUPEK, K. M.; LENTZ, J. J. **Usher syndrome type I**. 2020. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1265/>>. Acesso em 13 ago. 2020.
- KIM, N. K. D.; KIM, A. R.; PARK, K. T.; KIM, S. Y.; KIM, M. Y.; NAM, J. Y.; WOO, S. J.; OH, S. H.; PARK, W. Y.; CHOI, B. Y. C. Whole-exome sequencing reveals diverse modes of inheritance in sporadic mild to moderate sensorineural hearing loss in a pediatric population. **Genetics in Medicine**, v. 17, n. 11, p. 901-911, 2015.
- LANDA, P.; DIFFER, A. M.; RAJPUT, K.; JENKINS, L.; BITNER-GLINDZICZ, M. Lack of significant association between mutations of *KCNJ10* or *FOXI1* and *SLC26A4* mutations in pendred syndrome/enlarged vestibular aqueducts. **BMC Medical Genetics**, v. 14, n. 85, p. 1-7, 2013.
- LANDAU, D.; SHALEV, H.; OHALY, M.; CARMI, R. Infantile variant of Bartter syndrome and sensorineural deafness: a new autosomal recessive disorder. **American Journal of Medical Genetics**, v. 59, n. 4, p. 454-459, 1995.
- LANE, H. Ethnicity, ethics and the Deaf-world. **Journal of deaf studies and deaf education**, v. 10, n. 3, p. 291-310, 2005.
- LEZIROVITZ, K.; PARDONO, E.; AURICCHIO, M. T. B. M.; SILVA, F. L. C. E.; LOPES, J. J.; ABREU-SILVA, R. S.; ROMANOS, J.; BATISSOCO, A. C.; MINGRONI-NETTO, R. C. Unexpected genetic heterogeneity in a large consanguineous Brazilian pedigree presenting deafness. **European Journal of Human Genetics**, v. 16, n. 1, p. 89-96, 2008.
- LIKAR, T.; HASANHODZIC, M.; TERAN, N.; MAVER, A.; PETERLIN, B.; WRITZL, K. Diagnostic outcomes of exome sequencing in patients with syndromic or non-syndromic hearing loss. **PLOS One**, v. 13, n.1, p. 1-14, 2018.
- LLOYD, L. L.; KAPLAN, H. **Audiometric interpretation: a manual of basic audiometry**. University Park Press: Baltimore, 1978.
- LOBATO-SILVA, D. F. Citomegalovírus: epidemiologia baseada em dados de soroprevalência. **Revista Pan-Amazônica de Saúde**, v. 7, n. esp., p. 213-219, 2016.
- MAKRYTHANASIS, P.; TEMTAMY, S.; AGLAN, M. S.; OTAIFY, G. A.; HAMAMY, H.; ANTONARAKIS, S. E. A novel homozygous mutation in *FGFR3* causes tall stature, severe lateral tibial deviation, scoliosis, hearing impairment, camptodactyly, and arachnodactyly. **Human Mutation**, v. 35, n. 3, p. 959-963, 2014.
- MANZONI, C. R. C. T.; FERREIRA, C. A.; ALMEIDA, S. M. V. T.; TEDESCO, M. R. M. Triagem auditiva neonatal na cidade de São Paulo. In: Encontro Internacional de Audiologia, 30, 2015, Bauru. **Anais...** São Paulo: Academia Brasileira de Audiologia, 2015 p. 2.
- MATTHIJS, G.; SOUCHE, E.; ALDERS, M.; CORVELEYN, A.; ECK, S.; FEENSTRA, I.; RACE, V.; SISTERMANS, E.; STURM, M.; WEISS, M.; YNTEMA, H. BAKKER, E.; SCHEFFER, H.; BAUER, P. Guidelines for diagnostic next-generation sequencing. **European Journal of Human Genetics**, v. 24, p. 2-5, 2016.
- MIDDLETON, A.; HEWISON, J.; MUELLER, R. F. Attitudes of deaf adults toward genetic testing for hereditary deafness. **American Journal of Human Genetics**, v. 63, n. 4, p. 1175-1180, 1998.
- MOLLER, C. G.; KIMBERLING, W. J.; DAVENPORT, S. L. H.; PRILUCK, I.; WHITE, V.; BISCONE-HALTERMAN, K.; ODKVIST, L. M.; BROOKHOUSER, P. E.; LUND, G.;

- GRISSOM, T. J. Usher syndrome: an otoneurologic study. **Laryngoscope**, v. 99, n. 1, p. 73-79, 1989.
- MOORTHIE, S.; MATTOCKS C. J. WRIGHT, C. F. Review of massively parallel DNA sequencing technologies. **Official Journal of the Human Genome Organisation**, v. 5, n. 1-4, p.1-12, 2011.
- MORGAN, A.; LENARDUZZI, S.; CAPPELLANI, S.; PECILE, V.; MORGUTTI, M.; ORZAN, E.; GHISELLI, S.; AMBROSETTI, U.; BRUMAT, M.; GAJENDRARAO, P.; BIANCA, M. L.; FALETRA, F.; GROSSO, E.; SIRCHIA, F.; SENSI, A.; GRAZIANO, C.; SERI, M.; GASPARINI, P.; GIROTTO, G. Genomic studies in a large cohort of hearing impaired Italian patients revealed several new alleles, a rare case of uniparental disomy (UPD) and the importance to search for copy number variations. **Frontiers in Genetics**, v. 9, n. 681, p. 1-16, 2018.
- MORTON, C. C.; NANCE, W. E. Newborn screening - a silent revolution. **New England Journal of Medicine**, v. 354, n. 20, p. 2151-2164, 2006.
- NOMAN, M.; ISHAQ, R.; BUKHARI, S. A.; AHMED, Z. M.; RIAZUDDIN, S. Delineation of homozygous variants associated with prelingual sensorineural hearing loss in Pakistani families. **Genes**, v. 10, n. 1031, 1-8, 2019.
- NONOSE, R. W.; LEZIROVITZ, K.; AURICCHIO, M. T. B. M.; BATISSOCO, A. C.; YAMAMOTO, G. L.; MINGRONI-NETTO, R. C. Mutation analysis of *SLC26A4* (Pendrin) gene in a Brazilian sample of hearing-impaired subjects. **BMC Medical Genetics**, v.19, n. 73, p. 1-10, 2018.
- NYKAMP, K.; ANDERSON, M.; POWERS, M.; GARCIA, J.; HERRERA, B.; HO, Y.; KOBAYASHI, Y.; PATIL, N.; THUSBERG, J.; WESTBROOK, M.; TOPPER, S. Sherloc: a comprehensive refinement of the ACMG-AMP variant classification criteria. **Genetics in Medicine**, v. 16, n. 10, p. 1105-1117, 2017.
- OZA, A. M.; DISTEFANO, M. T.; HEMPHILL, S. E.; CUSHMAN, B. J. GRANT, A. R.; SIEGERT, R. K.; SHEN, J.; CHAPIN, A.; BOCZEK, N. J.; SCHIMMENTI, L. A.; MURRY, J. B.; HASADSRI, L.; NATA, K.; KENNA, M.; BOOTH, K. T.; AZAIEZ, H.; GRIFFITH, A.; AVRAHAM, K. B.; KREMER, H.; REHM, H. L.; AMR, S. S.; TAYOUN, A. N. A. Expert specification of the ACMG/AMP variant interpretation guidelines for genetic hearing loss. **Human Mutation**, v. 39, n. 11, p. 1593-1613, 2018.
- PARZEFALL, T.; FROHNE, A.; KOENIGHOFER, M.; KIRCHNAWY, A.; STREUBEL, B.; SCHOEFER, C.; FREI, K.; LUCAS, T. Whole-exome sequencing to identify the cause of congenital sensorineural hearing loss in carriers of a heterozygous *GJB2* mutation. **European Archives of Oto-Rhino-Laryngology**, v. 274, n. 10, p. 3619-3625, 2017.
- PEPIN, M. G.; MURRAY, M. L.; BAILEY, S.; LEISTRITZ-KESSLER, D.; SCHWARZE, U.; BYERS, P. H. The challenge of comprehensive and consistent sequence variant interpretation between clinical laboratories. **Genetics in Medicine**, v. 18, n. 1, p. 20-24, 2016.
- PIQUE, L. M.; BRENNAN, M. L.; DAVIDSON, C. J.; SCHAEFER, F.; GREINWALD JR, J.; SCHRIJVER, I. Mutation analysis of the *SLC26A4*, *FOXI1* and *KCNJ10* genes in individuals with congenital hearing loss. **Peer J**, v. 2, n. 284, 2014.
- READ, A. P.; NEWTON, V. E. E. Waardenburg syndrome. **Journal of Medical Genetics**, v. 34, p. 744, 1997.

- RICHARD, E. M.; SANTOS-CORTEZ, R. L. P.; FARIDI, R.; REHMA, A. U.; LEE, K.; SHAHZAD, M.; ACHARYA, A.; KHAN, A. A.; IMTIAZ, A.; CHAKCHOUK, I.; TAKLA, C.; ABBE, I.; RAFEEQ, M.; LIAQAT, K.; CHAUDHRY, T.; BAMSHAD, M. J.; SCHRAUWEN, I.; KHAN, S. N.; MORELL, R. J.; ZAFAR, S.; ANSAR, M.; AHMED, Z. M.; AHMAD, W.; RIAZUDDIN, S.; FRIEDMAN, T. B.; LEAL, S. M.; RIAZUDDIN, S. Global genetic insight contributed by consanguineous Pakistani families segregating hearing loss. **Human mutation**, v. 40, n. 1, p. 53-72, 2019.
- RICHARDS, S.; AZIZ, N.; BALE, S.; BICK, D.; DAS, S.; GASTIER-FOSTER, J.; GRODY, W. W.; HEDGE, M.; LYON, E.; SPECTOR, E.; VOELKERDING, K.; REHM, H. L. 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**, v. 17, n. 5, p. 405-424, 2015.
- RODRIGUEZ-PARIS, J.; SCHRIJVER, I. The digenic hypothesis unraveled: the *GJB6* del(*GJB6*-D13S1830) mutation causes allele-specific loss of *GJB2* expression in *cis*. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 389, n. 2, p. 354-359, 2009.
- ROMANOS, J.; KIMURA, L.; FÁVERO, M. L.; IZARRA, F. A. R.; AURICCHIO, M. T. B. M.; BATTISOCO, A. C.; LEZIROVITZ, K.; ABREU-SILVA, R. S.; MINGRONI-NETTO, R. C. Novel *OTOF* mutations in Brazilian patients with auditory neuropathy. **Journal of Human Genetics**, v. 54, n. 4, p. 382-385, 2009.
- ROSENBERG, C.; FREITAS, E. L.; UEHARA, D. T.; AURICCHIO, M. T. B. M.; COSTA, S. S.; OITICICA, J.; SILVIA, A. G.; KREPISCHI, A. C.; MINGRONI-NETTO, R. C. Genomic copy number alterations in non-syndromic hearing loss. **Clinical Genetics**, v. 89, n. 4, p. 473-477, 2016.
- SANG, S.; LING, J.; LIU, X.; MEI, L.; CAI, X.; LI, T.; LI, W.; LI, M.; WEN, J.; LIU, X.; LIU, J.; LIU, Y.; CHEN, H.; HE, C.; FENG, Y. Proband whole-exome sequencing identified genes responsible for autosomal recessive non-syndromic hearing loss in 33 Chinese nuclear families. **Frontiers in Genetics**, v. 10, n. 639, p. 1-10, 2019.
- SANGER, F.; NICKLEN, S.; COULSON, A. R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 74, n. 12, p. 5463-5467, 1977.
- SARTORATO E. L.; GOTTARDI, E.; DE OLIVEIRA, C. A.; MAGNA, L. A.; ANNICHINO-BIZZACCHI, J. M.; SEIXAS, C. A.; MACIEL-GUERRA, A. T. Determination of the frequency of the 35delG allele in Brazilian neonates. **Clinical Genetics**, v. 58, n. 4, p. 339-340, 2000.
- SCHEIN, J. D.; MILLER, M. H. Genetics and deafness: implications for education and life care of deaf students. **American Annals of the Deaf**, v. 153, n. 4, p. 408-410, 2008.
- SCHRAUWEN, I. HASIN-BRUMSHTEIN, Y.; CORNEVEAUX, J. J.; OHMEN, J.; WHITE, C.; ALLEN, A. N.; LUSIS, A. J.; CAMP, G. V.; HUENTELMAN, M. J.; FRIEDMAN, R. A. A comprehensive catalogue of the coding and non-coding transcripts of the human inner ear. **Hearing research**, v. 333, p. 266-274, 2016.
- SECO, C. Z.; WESDORP, M.; FEENSTRA, I.; PFUNDT, R.; HEHIR-KWA, J. Y.; LELIEVELD, S. H.; CASTELEIN, S.; GILISSEN, C.; WIJS, E. J.; ADMIRAAL, R. J. C.; PENNING, R. J. E.; KUNST, H. P. M.; VAN DE KAMP, J. M.; TAMMINGA, S.; HOUWELING, A. C.; PLOMP, A. S.; MAAS, S. M.; GANS, P. A. M.; KANT, S. G.;

- GEUS, C. M.; FRINTS, S. G. M.; VANHOUTTE, E. K.; VAN DOOREN, M. F.; BOOGARD, M. J. H.; SCHEFFER, H.; NELEN, M.; KERMER, H.; HOEFSLOOT, L.; SCHRADERS, M.; YNTEMA, H. G. The diagnostic yield of whole-exome sequencing targeting a gene panel for hearing impairment in The Netherlands. **European Journal of Human Genetics**, v. 25, n. 3, p. 308-314, 2017.
- SHEAREER, A. E.; DELUCCA, A. P.; HILDEBRAND, M. S.; TAYLOR, K. R.; GURROLA II, J.; SCHERER, S.; SCHEETZ, T. E.; SMITH, R. J. H. Comprehensive genetic testing for hereditary hearing loss using massively parallel sequencing. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 107, n. 49, p. 21104-21109, 2010.
- SHEARER, A. E.; HILDEBRAND, M. S.; SLOAN, C. M.; SMITH, R. J. H. Deafness in the genomics era. **Hearing Research**, v. 282, n. 1-2, p. 1-9, 2011.
- SHEARER, A. E.; SMITH, R. J. H. Genetics: advances in genetic testing for deafness. **Current Opinion in Pediatric**, v. 246, n. 6, p. 679-686, 2012.
- SHEARER, A. E.; KOLBE, D. L.; AZAIEZ, H.; SLOAN, C. M.; FREES, K. L.; WEAVER, A. E.; CLARK, E. T.; NISHIMURA, C. J.; BLACK-ZIEGELBEIN, E. A.; SMITH, R. J. H. Copy number variants are a common cause of non-syndromic hearing loss. **Genome Medicine**, v. 6, n. 5, p. 37.
- SHEARER, S.; SMITH, R. J. H. Massively parallel sequencing for genetic diagnosis of hearing loss. **Otolaryngology-Head and Neck Surgery**, v. 153, n. 2, p. 175-182, 2015.
- SHEARER, A. E.; HILDEBRAND, M. S.; SMITH, R. J. H. **Hereditary Hearing Loss and Deafness Overview**. 2017. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1434/>>. Acesso em: 03 abr. 2020.
- SHEPPARD, S.; BISWAS, S.; LI, M. H.; JAYARAMAN, V.; SLACK, I.; ROMASKO, E. J.; SASSON, A.; BRUNTON, J.; RAJAGOPALAN, R.; SARMADY, M.; ABRUDAN, J. L.; JAIRAM, S.; DECHENE, E. T.; YING, X.; CHOI, J.; WILKENS, A.; RAIBLE, S. E.; SCARANO, M. I.; SANTANI, A.; PENNINGTON, J. W.; LUO, M.; CONLIN, L. K.; DEVKOTA, B.; DULIK, M. C.; SPINNER, N. B.; KRANTZ, I. D. Utility and limitations of exome sequencing as a genetic diagnostic tool for children with hearing loss. **Genetics in Medicine**, v. 20, n. 12, p. 1663-1676, 2018.
- SLOAN-HEGGEN, C. M.; BABANEJAD, M.; BEHESHTIAN, M.; SIMPSON, A. C.; BOOTH, K. T.; ARDALANI, F.; FREES, K. L.; MOHSENI, M.; MOZAFARI, R.; MEHRJOO, Z.; JAMALI, L.; VAZIRI, S.; AKHTARKHAVARI, T.; BAZAZZADEGAN, N.; NIKZAT, N.; ARZHANGI, S.; SABBAGH, F.; OTUKESH, H.; SEIFATI, S. M.; KHODAEI, H.; TAGHDIRI, M.; MEYER, N. C.; DANESHI, A.; FARHADI, M.; KAHRIZI, K.; SMITH, R. J. H.; AZAIEZ, H.; NAJMABADI, H. Characterizing the spectrum of autosomal recessive hereditary hearing loss in Iran. **Journal of Medical Genetics**, v. 52, n. 12, p. 823-829, 2015.
- SLOAN-HEGGEN, C. M.; BIERER, A. O.; SHEARER, A. E.; KOLBE, D. L.; NISHIMURA, C. J.; FREES, K. L.; EPHRAIM, S. S.; SHIBATA, S. B.; BOOTH, K. T.; CAMPBELL, C. A.; RANUM, P. T.; WEAVER, A. E.; BLACK-ZIEGELBEIN, E. A.; WANG, D.; AZAIEZ, H.; SMITH, R. J. H. Comprehensive genetic testing in the clinical evaluation of 1119 patients with hearing loss. **Human genetics**, v. 135, n. 4, p. 441-450, 2016.
- SMITH, R. J. H.; BALE, J. F.; WHITE, K. R. Sensorial hearing loss in children. **The Lancet**, v. 365, n. 9462, p. 879-890, 2005.

- SVIDNICKI, M. C. C. M.; SILVA-COSTA, S. M.; RAMOS, P. Z.; SANTOS, N. Z. P.; MARTINS, F. T. A.; CASTILHO, A. M.; SARTORATO, E. L. Screening of genetic alterations related to non-syndromic hearing loss using MassARRAY iPLEX® technology. **BMC Medical Genetics**, v. 16, n. 85, p. 1-11, 2015.
- TANEJA, P. R.; PANDYA, A.; FOLEY, D. L.; NICELY, L. V.; ARNOS, K. S. Attitudes of deaf individuals towards genetic testing. **American Journal of Medical Genetics**, v. 130, n. 1, p. 17-21, 2004.
- TEKIN, M.; ARICI, Z. S. Genetic epidemiological studies of congenital/prelingual deafness in Turkey: population structure and mating type are major determinants of mutation identification. **American Journal of Medical Genetics Part A**, v. 143A, n. 14, p. 1583-1591, 2007.
- TOYDEMIR, R. M.; BRASSINGTON, A. E.; BAYKAR-TOYDEMIR, P.; KRAKOWIAK, P. A.; JORDE, L. B.; WHITBY, F. G.; LONGO, N.; VISKOCHIL, D. H.; CAREY, J. C.; BAMSHAD, M. J. A novel mutation in *FGFR3* causes camptodactyly, tall stature, and hearing loss (CATSHL) syndrome. **American Journal of Human Genetics**, v. 79, n. 5, p.935-941, 2006.
- VAN CAMP, G.; SMITH, R. **Hereditary Hearing Loss Homepage**. 2020. Disponível em: <<https://hereditaryhearingloss.org/>>. Acesso em: 28 abr. 2020.
- VAN EL, C.G.; CORNEL, M. C.; BORRY, P.; HASTINGS, R. J.; FELLMANN, F.; HODGSON, S. V.; HOWARD, H. C.; CAMBON-THOMSEN, A.; KNOPPERS, B. M.; MEIJERS-HEIJBOER, H.; SCHEFFER, H.; TRANEBJAERG, L.; DONDORP, W.; WERT, G. M. W. R. Whole-genome sequencing in health care: Recommendations of the European Society of Human Genetics. **European Journal of Human Genetics**, v. 21, p. 580-584, 2013.
- VONA, B.; MULLER, T.; NANDA, I.; NEUNER, C.; HOFRICHER, M. A. H.; SCHRODER, J.; BARTSCH, O.; LABIG, A.; KEILMANN, A.; SCHRAVEN, S.; KRAUS, F.; SHEHATA-DIELER, W.; HAAF, T. Targeted next-generation sequencing of deafness genes in hearing-impaired individuals uncovers informative mutations. **Genetics in Medicine**, v. 16, n. 12, p. 945-953, 2014.
- WAARDENBURG, P. J. A new syndrome combining developmental anomalies of the eyelids, eyebrows and nose root with pigmentary defects of the iris and head hair and with congenital deafness. **American Journal of Human Genetics**, v. 3, n. 3, p. 195–253, 1951.
- WALSH, S. T. R.; KOSSIAKOFF, A. A. Crystal structure and site 1 binding site energetics of human placental lactogen. **Journal of Molecular Biology**, v. 358, n. 3, p. 773-784, 2006.
- WHO. World Health Organization. **Deafness and hearing loss**. 2020. Disponível em: <<https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/deafness-and-hearing-loss>>. Acesso em: 22 abr. 2020.
- WILCH, E.; AZAIEZ, H.; FISHER, R. A.; ELFENBEIN, J.; MURGIA, A.; BIRKENHAGER, R.; BOLZ, H.; COSTA, S. M. S.; DEL CASTILLO, E.; HAAF, T.; HOEFSLOOT, L.; KREMER, H.; KUBISCH, C.; LE MARECHAL, C.; PANDYA, A.; SARTORATO, E. L.; SCHNEIDER, E.; VAN CAMP, G.; WUYTS, W.; SMITH, R. H. J.; FRIDERICI, K. H. A novel DFNB1 deletion allele supports the existence of a distant *cis*-regulatory region that controls *GJB2* and *GJB6* expression. **Clinical Genetics**, v. 78, n. 3, p. 267-274, 2010.

- WILLIEMS, P. J. Mechanisms of disease: genetic causes of hearing loss. **The New England Journal of Medicine**, v. 342, n. 15, p. 1101-1109, 2000.
- WOLF, A.; FROHNE, A.; ALLEN, M.; PARZEFALL, T.; KOENIGHOFER, M.; SCHREINER, M. M.; SCHOEFER, C.; FREI, K.; LUCAS, T. A novel mutation in *SLC26A4* causes nonsyndromic autosomal recessive hearing impairment. **Otology & Neurotology**, v. 38, n. 2, p. 173-179, 2016.
- WRIGHT, C. F.; FITZPATRICK, D. R.; FIRTH, H. V. Paediatric genomics: diagnosing rare disease in children. **Nature Reviews Genetics**, v. 19, n. 5, p. 253-268, 2018.
- WU, C. C.; LU, Y. C.; CHEN, P. J.; YEH, P. L.; SU, Y. N.; HWU, W. L.; HSU, C. J. Phenotypic analyses and mutation screening of the *SLC26A4* and *FOXI1* genes in 101 Taiwanese families with bilateral nonsyndromic enlarged vestibular aqueduct (DFNB4) or Pendred syndrome. **Audiology and Neurotology**, v. 15, n. 1, p. 57-66, 2010.
- WU, W.; ZHAI, G.; XU, Z.; HOU, B.; LIU, D.; LIU, T.; LIU, W.; REN, F. Whole-exome sequencing identified four loci influencing craniofacial morphology in northern Han Chinese. **Human Genetics**, v. 138, n.6, p. 601-611, 2019.
- YAMASOBA, T.; LIN, F. R.; SOMEYA, S.; KASHIO, A.; SAKAMOTO, T.; KONDO, K. Current concepts in age-related hearing loss: epidemiology and mechanistic pathways. **Hearing Research**, v. 303, p. 300-308, 2013.
- YAN, D.; TEKIN, D.; BADEMCI, G.; FOSTER II, J.; CENGIZ, F. B.; KANNAN-SUNDHARI, A.; GUO, S.; MITTAL, R.; ZOU, B.; GRATI, M.; KABAHUMA, R.I.; KAMESWARAN, M.; LSISI, T. J.; ADEDEJI, W. A.; LASISI, A. O.; MENENDEZ, I.; HERRERA, M.; CARRANZA, C.; MAROOFIAN, R.; CROSBY, A. H.; BENSALID, M.; MASMOUDI, S.; BENHAM, M.; MOJARRAD, M.; FENG, Y.; DUMAN, D.; MAWLA, A. M.; NORD, A. S.; BLANTON, S. H.; LIU, X.; TEKIN, M. Spectrum of DNA variants for nonsyndromic deafness in a large cohort of multiple continents. **Human Genetics**, v. 135, n.8, p. 953-961, 2016.
- YANG, T.; GURROLA, J. G.; WU, H.; CHIU, S. M.; WANGEMANN, P.; SNYDER, P. M.; SMITH, R. J. Mutations of *KCNJ10* together with mutations of *SLC26A4* cause digenic nonsyndromic hearing loss associated with enlarged vestibular aqueduct syndrome. *American Journal of Human Genetics*, v. 84, n. 5, p. 651-657, 2009.
- YOHE, S.; THYAGARAJAN, B. Review of Clinical Next-Generation Sequencing. **Archives of Pathology & Laboratory Medicine**, v. 141, n. 11, p. 1544-1557, 2017.
- YU, X.; LIN, Y.; WU, H. Targeted next-generation sequencing identifies separate causes of hearing loss in one deaf family and variable clinical manifestations for the p.R161C mutation in *SOX10*. **Neural Plasticity**, v. 2, p. 1-8, 2020.
- ZOU, S.; MEI, X.; YANG, W.; ZHU, R.; YANG, T.; HU, H. Whole-exome sequencing identifies rare pathogenic and candidate variants in sporadic Chinese deaf patients. **Clinical Genetics**, v. 97, n. 2, p. 352-356, 2020.