



Universidade de Brasília  
Instituto de Ciências Biológicas  
Departamento de Genética e Morfologia

YASMIN SOARES DE LIMA

Painel de exoma direcionado como diagnóstico molecular para pacientes com  
deficiência auditiva sindrômica

Orientadora: Profa. Dra. Silviene Fabiana de Oliveira

Brasília

2017

YASMIN SOARES DE LIMA

Painel de exoma direcionado como diagnóstico molecular para pacientes com deficiência  
auditiva sindrômica

Dissertação apresentada como  
requisito parcial para a obtenção de  
título de mestre em Biologia Animal  
pelo Programa de Pós-Graduação em  
Biologia Animal do Instituto de  
Ciências Biológicas da Universidade  
de Brasília.

Orientadora: Profa. Dra. Silviene Fabiana de Oliveira

Brasília

2017

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço primeiramente a todos os pacientes participantes do trabalho e suas famílias. Sem vocês, nada disso teria sido possível. Esse trabalho é para vocês e por vocês!

Agradeço às agências financiadoras que fizeram a realização desse mestrado possível. À CAPES pela bolsa de mestrado, à FAP/DF pelos apoios a participação em visita técnica e congressos, assim como ao CNPq pelo financiamento do projeto desenvolvido.

Agradeço também com um enorme carinho à minha orientadora Profa. Dra. Silviene Fabiana de Oliveira por ter me recebido de portas abertas em seu laboratório desde o primeiro dia, quando bati à sua porta pedindo por uma oportunidade de realizar um mestrado em seu laboratório. Agradeço igualmente à Profa. Dra. Juliana Forte Mazzeu por ter me acolhido como sua aluna postíça, se transformando na minha co-orientadora não oficial. Sua participação foi fundamental.

Agradeço aos meus consultores em bioinformática, Dra. Jun Shen e Toty Ypiranga, que me guiaram no processo de saber por onde começar nessa área tão desafiadora. E também à Profa. Dra. Priscila Mendéz e seu aluno Luis Pacheco.

Agradeço a toda a equipe do Laboratório de Genética da FS/UnB que sempre foram muito prestativos em tudo que precisei, em especial às Doutoradas Rosenelle Oliveira Araújo Benício, Mara Santos Córdoba e Beatriz Ribeiro Versiani que fazem um trabalho maravilhoso no Ambulatório de Genética do HUB juntamente a Profa. Juliana Mazzeu.

Agradeço à equipe do Hospital das Clínicas da Universidade de São Paulo pelo apoio com pacientes e com outros teste moleculares, em especial à Dr. Karina Mandelbaum.

Agradeço também à equipe da Universidade Católica de Brasília, à Dra. Marcela Chiabai, Dr. Rinaldo Pereira e Dr. Robert Pogue pela colaboração no laboratório de sequenciamento.

Um agradecimento mais que especial a todos meus colegas de laboratório e muitos, também da vida: Larissa, Harumy, Fabíola, Cadu, Raphael, Rafaela, Mariana, Ana

Arcanjo, Carol, Sabrina, Gustavo, Glauber, Heloísa e Matheus. Cada um de vocês teve uma participação especial e contribuiu para que o meu trabalho e minha experiência no laboratório se tornassem melhores.

Agradeço à minha mãe e ao meu pai que sempre me incentivaram nos estudos e por serem meus maiores fãs. E agradeço de todo o coração ao meu amor Pedro Henrique, que é meu maior suporte em todos os momentos. Aguentar alguém no processo de escrita não é fácil!

## **EPÍGRAFE**

Em terra de cegos cobiçam o som da tua voz,  
nas terras de surdos cobiçam o riso dos teus olhos.

Mozzart César Serafim

## RESUMO

A deficiência auditiva é o distúrbio sensorial mais comum no mundo. No Brasil, cerca de 5% da população apresenta algum tipo de deficiência auditiva e 1,12% declaram não ouvir som algum. Aproximadamente 50-60% dos casos de deficiência auditiva no mundo possuem uma etiologia genética. Destes, 30% são síndrômicos, sendo que mais de 100 genes já foram associados com a deficiência auditiva não síndrômica. Painéis baseados em sequenciamento de nova geração vêm sendo comumente utilizados na busca da etiologia genética da deficiência auditiva não síndrômica e outras doenças genéticas, demonstrando-se ser uma eficaz ferramenta. Nesse trabalho, propusemos um painel Ion Ampliseq™ customizado especialmente para a deficiência auditiva síndrômica contendo 51 genes associados às síndromes mais comuns somado ao gene *GJB2*, principal causa de deficiência auditiva não síndrômica. Pacientes com e sem diagnóstico clínico foram selecionados. Dos 26 pacientes sequenciados com êxito, foram encontradas mutações potencialmente causativas em nove deles, todos com diagnóstico clínico prévio, enquanto foi possível realizar o diagnóstico molecular em seis, obtendo-se uma taxa diagnóstica de 23%. Foram identificadas cinco mutações sem sentido, duas de sentido trocado e duas *frameshift*. O painel demonstrou maior efetividade em realizar o diagnóstico molecular em pacientes com diagnóstico clínico em comparação aos pacientes sem diagnóstico clínico, com exceção a Síndrome Óculo-Aurículo-Vertebral, em que não foram encontradas mutações potencialmente causativas nos genes propostos incluídos no painel. Em conclusão, o painel demonstrou efetividade na realização do diagnóstico molecular especialmente para aqueles com diagnóstico clínico. A grande heterogeneidade genética, o envolvimento de genes ainda não identificados, e conseqüentemente, não incluídos no painel, além da não cobertura de regiões intrônicas e/ou reguladoras podem estar envolvidas na não identificação de variantes que pudessem determinar o quadro dos demais pacientes. Ainda, foi proposto de um fluxograma de abordagem diagnóstica baseado nos resultados observados neste trabalho.

**Palavras-chave:** deficiência auditiva, diagnóstico clínico, diagnóstico molecular, mutação.

## ABSTRACT

Hearing impairment is the most common sensory disorder in the world. In Brazil, about 5% of the population has some type of hearing loss and 1.12% declares not hearing any sound. Approximately 50-60% of the world's hearing loss cases have a genetic etiology. 30% of these cases are syndromic, and more than 100 genes have been associated with non-syndromic hearing loss. Panels based on next generation sequencing have been commonly used in the search for the genetic etiology of non-syndromic hearing loss and other genetic disorders, proving to be an effective tool. In this work, we proposed a specially designed Ion Ampliseq™ panel for syndromic hearing loss containing 51 genes associated with the most common syndromes plus the *GJB2* gene, the main cause of non-syndromic hearing loss. Patients with and without clinical diagnosis were selected. From the 26 successfully sequenced patients, potentially causative mutations were found in nine of them, all with a previous clinical diagnosis, while it was possible to perform the molecular diagnosis in six of them, obtaining a diagnostic rate of 23%. We identified five nonsense mutations, two missenses and two frameshift. The panel demonstrated greater effectiveness in performing the molecular diagnosis in patients with clinical diagnosis compared to patients without clinical diagnosis, except for Oculo-Auriculo-Vertebral Syndrome, in which no potentially causative mutations were found in the proposed genes included in the panel. In conclusion, the panel demonstrated effectiveness in performing the molecular diagnosis especially for those with clinical diagnosis. The large genetic heterogeneity, the involvement of unidentified genes, and consequently, not included in the panel, besides the non-coverage of intronic and / or regulatory regions may be involved in the non-identification of variants that could diagnosticate the other patients. In addition, a flowchart of a diagnostic approach was proposed, based on the results observed in this study.

**Key words:** hearing loss, clinical diagnosis, molecular diagnosis, mutation

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1. Anatomia da orelha externa, média e interna. Retirado de Silverthorn (2010). ..19
- Figura 2. Esquema de propagação do som na cóclea, mostrando a estimulação das membranas basilares e tectóricas por vibrações no líquido coclear, as quais são capazes de inclinarem as células ciliadas, estimulando os múltiplos esterocílios presentes nessas células. (Adaptado de Silverthorn, 2010). .....21
- Figura 3. Fluxograma demonstrativo dos processos para o preparo da biblioteca Ion Ampliseq. Uma PCR multiplex é realizada a fim de amplificar o alvos genômicos desenhados no painel. Depois, procede-se à digestão parcial das sequências de primers e a posterior ligação de adaptadores barcodes, criando uma biblioteca com barcodes. Modificado de <http://www.floragenex.com/ampliseq/>.....36
- Figura 4. Fluxograma de análise dos gerados pelo sequenciador Ion Torrent PGM. Antes de iniciar a análise de variantes, uma análise geral dos parâmetros de qualidade é realizada. Com relação à análise de variantes, os dados podem ser analisados pelo software Ion Reporter, fornecido pela Thermo Fisher Scientific, ou podem ser analisados separadamente por pipeline desenvolvido para este trabalho. Depois de ter as variantes anotadas, as últimas etapas consistem na análise de informações gerais, como frequência populacional e impacto das variantes, que permitirão uma classificação adequada das variantes a partir do *ACMG Standarts annd Guidelines for the Interpretation of Sequence Variants* ( RICHARDS *et al*, 2015). .....38
- Figura 5. Visualização da mutação c.598C>T p.Gln200Ter no gene *PAX3*, chr2:223096991, na paciente P9 utilizando o software *IGV-Integrative Genome Viwer* a partir dos arquivos.bam. ....56
- Figura 6. Visualização da mutação, c.2042\_2043insT p.Val682fs no gene *TCOF1*, posição chr5:149755793 para o paciente P12 através do software *IGV- Integrative Genome Viewer*.....58
- Figura 7. Heredograma do paciente P15. Há casos de deficiência auditiva na família no lado materno e paterno, predominantemente do lado paterno. No entanto, apenas a probanda (II-4) apresenta quadro compatível com Síndrome de Usher na família .....60

Figura 8. Visualização da mutação c.35del p.Gly12fs no gene <i>GJB2</i> , posição chr13:20763685, em heterozigose no paciente P12 através do software IGV- Integrative Genome Viewer. A cobertura foi de 1859x para o alelo referência, 2086x para o alternativo e 3945x no total.....	61
Figura 9. Visualização da mutação c.999T>G p.Tyr333Ter no gene <i>MYO7A</i> , posição chr11:76869472 , para a paciente P16 através do software IGV- Integrative Genome Viewer. A mutação teve cobertura de 522x no total.....	63
Figura 10. Visualização da mutação c.617A>G p.Asn206Ser no gene <i>GJB2</i> no paciente P16 através do software IGV- Integrative Genome Viewer. A cobertura verificada foi de 7x para o alelo referência, 6x para o alelo mutado e 13x no total.....	64
Figura 11. Visualização da mutação c.5455G>T p.Glu1819Ter no gene <i>CHD7</i> , posição chr8:61763102, na paciente P18 através do software IGV - Integrative Genome Viewer. A cobertura foi de 35x para o alelo referência, 39x para o alterado e 74x no total. ....	67
Figura 12. Heredograma da família da paciente P20 (probanda III:1). A mesma não possui outros casos de Síndrome de Usher, exceto por uma tia maternal que apresenta perda auditiva neurosensorial na orelha direita (PANS OD).....	68
Figura 13. Visualização da mutação NM_206933.2 c.2276G>T p.Cys759Phe no gene <i>USH2A</i> , posição chr1:216420460 em heterozigose na paciente P20 através do software IGV - Integrative Genome Viewer. A cobertura foi de 22x para o alelo referência, 9x para o alelo alternativo e de 31x no total. ....	69
Figura 14. Heredograma de paciente P21. O probando III:5 é filho de casal consanguíneo e casado com mulher também afetada, filha de casal consanguíneo .....	71
Figura 15. Visualização da mutação NM_153676.3 c.7C>T p.Arg3Ter no gene <i>USH1C</i> , posição chr11:17565848, no paciente P21 através do software IGV - Integrative Genome Viewer. A variante teve cobertura de 5x no total. ....	72
Figura 16. Heredograma do paciente P22 com Síndrome de Usher, filho de casal consanguíneo.....	73
Figura 17. Visualização da mutação c.1752C>G p.Tyr584Ter do gene <i>PCDH15</i> , posição chr10:55912907, do paciente P22 no software Interrate Genome Viewer-IGV. A cobertura foi de 127x.....	74

Figura 18. Visualização da mutação c.999T>G p.Tyr333Ter em heterozigose no gene *MYO7A*, posição chr11:76869472, no paciente P23 no software *Integrative Genome Viewer-IGV*. A cobertura foi de 264X para o alelo referência, 225x para o alelo alternativo e 489x no total.....76

Figura 19. Fluxograma de abordagem diagnostica sugerida. Diagnóstico clínico\*: diagnóstico clínico de síndrome em que haja genes relacionados incluídos no painel. Sem diagnóstico clínico e laboratorial: sem diagnóstico de síndrome conhecida. Sem diagnóstico conclusivo\* : pacientes para os quais mutações potencialmente patogênicas foram identificadas, porém não foi possível estabelecer o diagnóstico clínico, a exemplo, pacientes com Síndrome de Usher, onde a segunda variante não pôde ser identificada. OU\* :considerar o custo-benefício e as possibilidades da realização de cada técnica. ....81

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Classificação da deficiência auditiva em graus de gravidade de acordo com os limiares auditivos em dB (decibéis).(Adaptado de SMITH et al, 1999).....	23
Tabela 2. Dados e evidências utilizados para a classificação de variantes de acordo com o Guia de interpretação de variantes da American Society of Medical Genetics (RICHARDS et al., 2015).....	42
Tabela 3. Regras de combinação para critérios de classificação baseado no <i>ACMG Guidelies for the Interpretation of Sequence Variants</i> (RICHARDS et al. 2015). As variantes podem ser classificadas como de “Significado Incerto” se os critérios são desconhecidos ou os os critérios para variantes benignas e patogênicas são contraditórios. ....	44
Tabela 4. Investigação genética prévia realizada nos pacientes selecionados para teste do painel desenvolvido nesse trabalho. ....	47
Tabela 5a. Dados técnicos do primeiro sequenciamento. As amostras P1 a P10 foram sequenciadas no primeiro chip, P11 a P19 e PC1 no segundo chip e P20 a 27, incluindo a repetição da amostra P16, representada por P16*, e PC2 no terceiro chip. A repetição da amostra P15, representada por P15* foi realizada no laboratório da Thermo Fisher Scientific™. Reads: fragmento de sequenciamento.. Q (Phred Quality score) $\geq 20$ . ....	51
Tabela 5b. Dados técnicos do segundo sequenciamento. As amostras P1 a P10 foram sequenciadas no primeiro chip, P11 a P19 e PC1 no segundo chip e P20 a 27, incluindo a repetição da amostra P16, representada por P16*, e PC2 no terceiro chip. A repetição da amostra P15, representada por P15* foi realizada no laboratório da <i>Thermo Fisher Scientific™</i> . Reads: fragmento de sequenciamento.. Q ( <i>Phred Quality score</i> ) $\geq 20$ . ....	52
Tabela 5c. Dados técnicos do primeiro sequenciamento.. As amostras P1 a P10 foram sequenciadas no primeiro chip, P11 a P19 e PC1 no segundo chip e P20 a 27, incluindo a repetição da amostra P16, representada por P16*, e PC2 no terceiro chip. A repetição da amostra P15, representada por P15* foi realizada no laboratório da Thermo Fisher Scientific™. Reads: fragmento de sequenciamento. Q ( <i>Phred Quality score</i> ) $\geq 20$ . ....	53
Tabela 6. Critérios para a classificação da variante c.598C>T p.Gln200Ter no gene PAX3 segundo o Standarts and Guidelines for Sequence Variants Interpretation da ACMG (RICHARDS et al, 2015). ....	56
Tabela 7. Critérios para a classificação da mutação c.2042_2043insT p.Val682fs no gene TCOF1 segundo o Standarts and Guidelines for Sequence Variants Interpretation da ACMG (RICHARDS et al, 2015). ....	58

Tabela 8. Critérios para a classificação da mutação c.35del p.Gly12fs no gene GJB2 segundo o Standarts and Guidelines for Sequence Variants Interpretation da ACMG (RICHARDS et al, 2015). .....	61
Tabela 9. Critérios para a classificação da mutação c.999T>G p.Tyr333Ter no gene MYO7A segundo o Standarts and Guidelines for Sequence Variants Interpretation da ACMG (RICHARDS et al, 2015). .....	63
Tabela 10. Critérios para a classificação da mutação c.617A>G p.Asn206Ser no gene GJB2 segundo o Standarts and Guidelines for Sequence Variants Interpretation da ACMG (RICHARDS et al, 2015). .....	65
Tabela 11. Critérios para a classificação da mutação c.5455G>T p.Glu1819Ter no gene CHD7 segundo o Standarts and Guidelines for Sequence Variants Interpretation da ACMG (RICHARDS et al, 2015). .....	67
Tabela 12. Critérios para a classificação da mutação c.7C>T p.Arg3Ter no gene USH1C segundo o Standarts and Guidelines for Sequence Variants Interpretation da ACMG (RICHARDS et al, 2015). .....	72
Tabela 13. Critérios para a classificação da mutação c.1752C>G p.Tyr584Ter do gene PCDH15 segundo o Standarts and Guidelines for Sequence Variants Interpretation da ACMG (RICHARDS et al, 2015). .....	74
Tabela 14. Critérios para a classificação da mutação c.999T>G p.Tyr333Ter no gene MYO7A segundo o Standarts and Guidelines for Sequence Variants Interpretation da ACMG (RICHARDS et al, 2015).....	76
Tabela 15. Número de casos analisados com sucesso e, destes, o número de casos com diagnóstico molecular em pacientes com deficiência auditiva síndrômica com e sem diagnóstico clínico.....	78
Tabela 16. Mutações potencialmente causativas identificadas nos pacientes utilizando o painel desenvolvido neste trabalho baseado em sequenciamento de nova geração. Estão indicadas as mutações encontradas em ambos os alelos. DC: diagnóstico clínico; Het: heterozigose; Homo: homozigose.....	79

## LISTA DE ABREVIATURAS

BERA	Exame do Potencial Evocado Auditivo do Tronco Encefálico
BOR	Síndrome Branquio-Oto-Renal
CNV	Variação de número de cópias, do inglês “ <i>Copy number variations</i> ”
dB	Decibéis
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DNPM	Desenvolvimento Neuropsicomotor
EDTA	Ácido etilendiamino tetra-acético, do inglês <i>Ethylenediamine tetraacetic acid</i>
GATK	<i>Genome Analysis Toolkit</i>
HUB	Hospital Universitário de Brasília
IGV	<i>Integrative Genome Viewer</i>
MAF	Frequência do alelo raro, do inglês “ <i>Minor allele frequency</i> ”
MLPA	<i>Multiplex ligation-dependent probe amplification</i>
NGS	Sequenciamento de Nova geração, do inglês “ <i>Next Generation Sequencing</i> ”
NMD	Decaimento mediado por mutações sem sentido, do inglês “ <i>Nonsense mediated decay</i> ”
OMIM	<i>Online Mendelian Inheritance in Man</i>
OMS	Organização Mundial de Saúde
PCR	Reação em Cadeira de Polimerase
PDZ	<i>Post-synaptic density protein 95, Drosophila disc large tumor suppressor (Dlg1) and Zona occludens 1 (ZO-1)</i>
PGM	<i>Personal Genome Machine</i>
Q	<i>Phred Quality Score</i>
TALE	Termo de Assentimento Livre e Esclarecido
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
TMAP	<i>The Torrent Mapping Alignment Program</i>
TSH	Hormônio estimulante da tireóide, do inglês “ <i>Thyroid-Stimulating Hormone</i> ”

TVC *Torrent Variant Caller*

OAVS Espectro Óculo-Aurículo-Vertebral

## SUMÁRIO

INTRODUÇÃO .....	18
Deficiência auditiva.....	18
Morfologia e Fisiologia do aparelho auditivo .....	19
Classificações da deficiência auditiva.....	21
Etiologia da deficiência auditiva .....	23
Deficiência auditiva sindrômica.....	24
CHARGE .....	24
Treacher Collins .....	25
Waardenburg .....	25
Usher .....	26
Branquio-Oto-Renal .....	27
Óculo-Auriculo-Vertebral .....	27
MIDD ( <i>Maternally Inherited diabetes and deafness</i> ) .....	27
Diagnósticos Moleculares .....	28
JUSTIFICATIVA.....	31
OBJETIVOS.....	32
Objetivo Geral:.....	32
Objetivos Específicos:.....	32
MATERIAL E MÉTODOS .....	33
Aspectos éticos.....	33
Critérios de Inclusão.....	33
Coleta de material biológico, extração e avaliação do DNA .....	34
Desenvolvimento do painel de exoma direcionado para diagnóstico de deficiência auditiva sindrômica .....	34
Sequenciamento das regiões alvo do painel.....	35
Amplificações dos alvos genômicos e preparo de Biblioteca NGS .....	35

PCR em emulsão e Enriquecimento de <i>beads</i> positivas .....	36
Sequenciamento na Plataforma ION Torrent PGM™.....	37
Análise Bioinformática .....	37
Análise da qualidade do sequenciamento.....	38
Chamada, Anotação e Análise de variantes .....	39
Classificação de variantes .....	41
RESULTADOS.....	46
Pacientes.....	46
Painel customizado Ion Ampliseq: características e avaliação de qualidade.....	48
Análise bioinformática : chamada, anotação e classificação de variantes .....	54
Casos com potenciais mutações causativas.....	55
Caso Controle.....	55
Caso P9.....	55
Caso P12.....	57
Caso P15.....	59
Caso P16.....	62
Caso P18.....	66
Caso P20.....	68
Caso P21.....	70
Caso P22.....	73
Caso P23.....	75
Casos sem diagnóstico .....	77
Taxa de diagnóstico.....	78
DISCUSSÃO.....	82
Painel Ion Ampliseq™ .....	82
Análise bioinformática: chamada, anotação e classificação das variantes.....	83
Casos com potenciais mutações causativas.....	84
Caso P9.....	84

Caso P12.....	85
Caso P15.....	86
Caso P16.....	87
Caso P18.....	88
Caso P20.....	89
Caso P21.....	91
Caso P22.....	91
Caso P23.....	92
Taxa diagnóstica.....	94
Casos sem diagnóstico .....	95
CONCLUSÃO .....	101
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	102
APÊNDICE 1 .....	113
APÊNDICE 2 .....	116
APÊNDICE 4.....	121
ANEXO 1 – PROTOCOLO DE EXTRACAO DE DNA.....	123
ANEXO 2- PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA .....	125
ANEXO 3 - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido – TCLE.....	126

## INTRODUÇÃO

### Deficiência auditiva

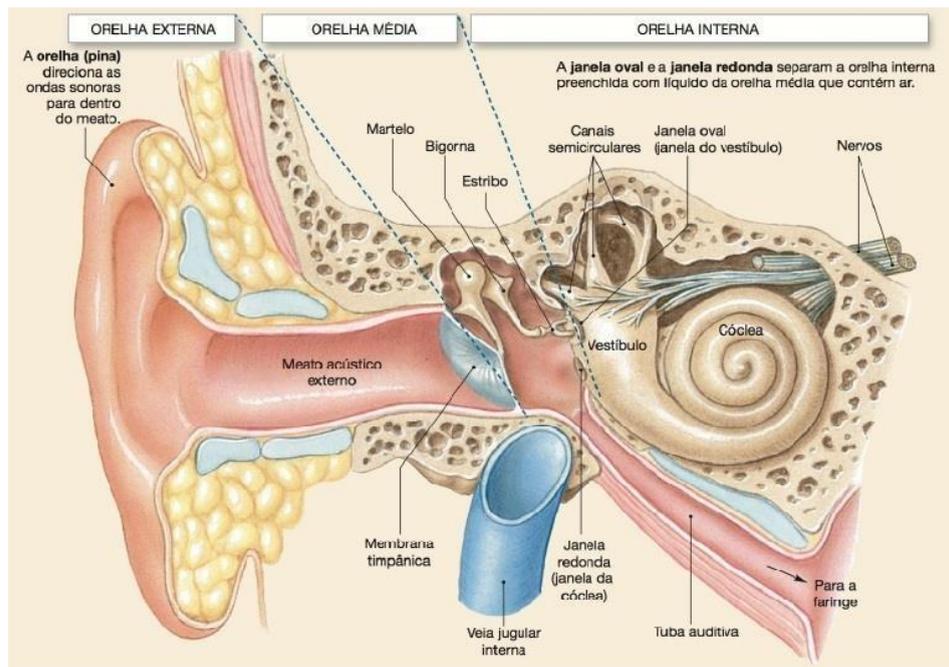
Diversos termos na literatura e na prática clínica são utilizados para se referir à perda total ou parcial da capacidade auditiva, dentre eles surdez, deficiência auditiva e perda auditiva. Segundo ALFORD *et al.* (2014) e a definição da OMS (2017), surdez é um fenótipo caracterizado pela perda da capacidade total ou quase total da audição, enquanto o termo deficiência auditiva e perda auditiva é utilizado para definir a perda da capacidade auditiva em qualquer grau.

A deficiência auditiva é um dos distúrbio sensoriais mais comum no mundo (YAN *et al.*, 2016). Afeta 360 milhões de pessoas, o que representa aproximadamente 5% da população mundial (OMS, 2017). A maioria de pessoas desse grupo vive em países subdesenvolvidos ou em desenvolvimento. Essa deficiência tem diversos impactos emocionais, sociais, funcionais e mesmo econômicos ao indivíduo e à população. Se o paciente não possui o devido acesso à educação e assistência médica, pode se tornar limitado à comunicação com outras pessoas, prejudicando sua autoestima e socialização, causando sérios prejuízos emocionais. A acessibilidade a serviços públicos e/ou culturais se torna limitada, assim como sua inserção no mercado de trabalho. Adultos com deficiências auditivas possuem uma taxa muito maior de desemprego e quando empregados, em geral assumem ocupações de menor recompensa social e financeira comparada à população em geral. Essas situações afetam não somente à vida do deficiente como também aspectos sociais e econômicos da população em geral (OMS, 2017).

No Brasil, 5,1% da população possui algum tipo de deficiência auditiva e 1,12% se declaram surdos, ou seja, possuem deficiência auditiva grave (IBGE, 2012). O alto percentual da população brasileira com esse tipo de deficiência motivaram iniciativas, como a criação e implantação da Política Nacional de Atenção à Saúde Auditiva pelo Ministério da Saúde em 2004, com o objetivo de organizar uma estratégia de atenção primária de saúde à deficientes auditivos e garantir maior qualidade de vida.

## Morfologia e Fisiologia do aparelho auditivo

A percepção de ondas sonoras interpretadas pelo nosso sistema auditivo humano ou de outros animais é o que caracteriza a audição e o som. Nosso aparelho auditivo é capaz de receber e interpretar ondas sonoras de acordo com a sua frequência, intensidade e localização. A frequência do som é medida na forma de Hertz (Hz) e os humanos são capazes de escutar sons na faixa 2000 a 20000 Hz, enquanto outros animais na faixa de infrassom e ultrassom. Já a intensidade do som é medida na escala logarítmica de decibéis (dB), que é função da amplitude da onda sonora. Isso quer dizer que cada aumento de 10dB na amplitude sonora, representa um aumento de 10x na intensidade do som. Sons com mais de 80dB já podem começar a comprometer uma audição saudável. A orelha é o órgão sensorial capaz de perceber sons e também está envolvida com o equilíbrio. É dividida em orelha externa, orelha média e orelha interna (Figura 1.)

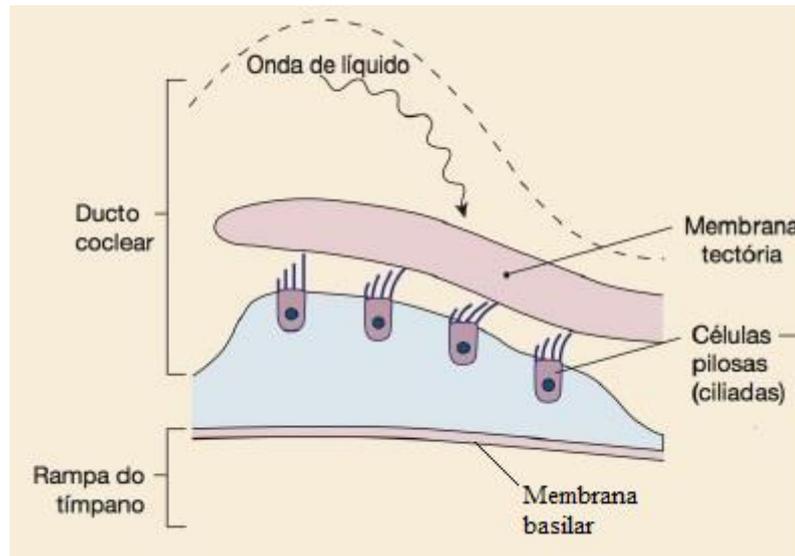


**Figura 1.** Anatomia da orelha externa, média e interna. Retirado de Silverthorn (2010).

A orelha externa é composta pela aurícula ou pina e pelo meato acústico externo ou canal auditivo. O canal auditivo é fechado na sua extremidade interna pela membrana timpânica, a qual separa a orelha externa da orelha média. A orelha média é

uma cavidade cheia de ar onde estão presentes os três ossículos fundamentais para o processamento auditivo da orelha média à orelha interna: martelo, bigorna e estribo. O martelo é fixado à membrana timpânica e o estribo se prende a uma fina membrana que conecta a orelha média à orelha interna, onde fica a janela redonda. A orelha interna contém duas estruturas importantes: o vestíbulo com canais semicirculares, responsáveis pela orientação tri-dimensional e percepção de gravidade; e a cóclea, que se conecta com nervos auditivos capazes de transmitir a informação sensorial ao cérebro. A cóclea tem formato de uma concha de caracol e está inserida em uma cavidade óssea. Esta se conecta à orelha média pela janela oval e janela redonda e apresenta três ductos cheios de líquido: a rampa do vestíbulo, o ducto coclear e a rampa do tímpano. As rampas do vestíbulo e do tímpano são preenchidas por perilinfa, de composição iônica semelhante à do plasma, enquanto o ducto coclear é preenchido pela endolinfa, mais semelhantes ao líquido intracelular. Portanto esses líquidos apresentam composições iônicas distintas. É no ducto coclear que está presente o Órgão de Corti, que é composto por células receptoras ciliadas e células de sustentação. A membrana basilar está sob o Órgão de Corti e a membrana tectória está acima, cobrindo-o parcialmente. Essas membranas são flexíveis e capazes de se moverem estimulando as células ciliadas (Figura 2).

A transmissão sonora tem início na orelha externa quando as ondas sonoras atingem a membrana timpânica provocando vibrações na mesma. Essas vibrações são transmitidas aos ossículos da orelha média - martelo, bigorna e estribo - em sequência. A vibração desses ossículos tem como consequência a amplificação do som. As vibrações atingem a janela oval e passam para os líquidos presentes na cóclea até atingirem as membranas basilares e tectóricas que são capazes de inclinarem as células ciliadas. A superfície das células ciliadas é modificada formando dezenas de filamentos ricos em actina, os estereocílios, que se movem de um lado para o outro com o movimento das células (Figura 2.). Esse movimento abre e fecha canais iônicos das células ciliadas, provocando a despolarização dessas células e a liberação de sinais elétricos, capazes de estimular a liberação de neurotransmissores para a estimulação dos neurônios sensoriais que compõem o nervo coclear ou nervo craniano VIII. O núcleos cocleares do bulbo recebem as informações que são processadas, como tempo e qualidade do som. Outros neurônios se projetam para dois núcleos da ponte, depois a informação segue para os núcleos no mesencéfalo e no tálamo para depois se direcionarem para o córtex auditivo (DROR; AVRAHAM, 2010; SILVERTHORN, 2010).



**Figura 2.** Esquema de propagação do som na cóclea, mostrando a estimulação das membranas basilares e tectóricas por vibrações no líquido coclear, as quais são capazes de inclinarem as células ciliadas, estimulando os múltiplos esterocílios presentes nessas células. (Adaptado de Silverthorn, 2010).

## Classificações da deficiência auditiva

A deficiência auditiva pode ser classificada segundo vários parâmetros como clínica, tipo, idade de início, lateralidade ou simetria, estabilidade e grau.

### Clínico:

Sindrômica: quando o quadro de deficiência auditiva está associado com manifestações clínicas em outros órgãos, tais como alterações morfológicas, oculares, renais, cardíacas, dentre outras;

Não-sindrômica: quando a deficiência auditiva não é associada com outras manifestações clínicas.

### Tipos:

Neurosensorial: resultante de má função de estruturas do ouvido interno;

Condutiva: decorrente, geralmente, de anormalidades estruturais do ouvido interno ou ouvido médio;

Mista: decorrente da combinação de deficiência auditiva sensorial e condutiva;

Disfunção do sistema central auditivo: disfunção no oitavo nervo cranial, no tronco cerebral auditivo ou no córtex cerebral (problemas de processamento).

**Idade de início:**

Pré-lingual: a perda auditiva acontece antes da fase do desenvolvimento da fala, em que a audição é essencial;

Pós-lingual: quando a perda auditiva ocorre depois que o indivíduo já aprendeu a se comunicar verbalmente.

**Lateralidade ou simetria:**

Unilateral ou assimétrica: quando acomete apenas um lado;

Bilateral ou simétrica: quando acomete os dois lados.

**Estabilidade:**

Progressiva: quando a capacidade auditiva diminui com o tempo;

Não progressiva: quando a capacidade auditiva é estável;

Flutuante: quando ocorrem recidivas.

**Grau**: de acordo com a classificação apresentada na Tabela 1 (ALFORD *et al.*, 2014; SMITH *et al.*, 1999)

**Tabela 1.** Classificação da deficiência auditiva em graus de gravidade de acordo com os limiares auditivos em dB (decibéis) (Adaptado de SMITH et al, 1999).

<b>Grau</b>	<b>Limiar auditivo em Db</b>
Leve	26-40 Db
Moderado	41-55 dB
Moderadamente Severo	56-70 Db
Severo	71-90 dB
Profundo	90 dB

## **Etiologia da deficiência auditiva**

A deficiência auditiva, assim como outras deficiências, pode ter origens ambientais, genéticas ou ainda ser o resultado de uma composição desses fatores (DROR & AVRAHAM, 2010). Estima-se que 50-60% dos casos de deficiência auditiva em crianças em países desenvolvidos tenham uma etiologia genética (MORTON & NANCE, 2006; NANCE, 2003). Os outros 50% dos casos são atribuídas as causas ambientais, que são múltiplas, podendo causar perda da audição temporária ou permanente. Dentre elas podemos citar: exposição excessiva a ruídos, infecções virais, uso prologando de medicamentos ototóxicos, como aminoglicosídeos e gentamicinas, anoxia neonatal e hiperbilirrubinemia (YORGASON *et al*, 2006). Quanto aos fatores genéticos, a deficiência auditiva hereditária apresenta grande heterogeneidade genética, tanto alélica quanto gênica. A heterogeneidade frequentemente dificulta a busca pelo diagnóstico molecular, pois indivíduos com diferentes genótipos podem apresentar fenótipos clínicos semelhantes, além de que mutações no mesmo gene podem causar uma variedade de fenótipos clínicos distintos (ANGELI *et al*, 2012). São conhecidas mais de 400 síndromes que apresentam a deficiência auditiva como uma das características fenotípicas (ANGELI *et al*. 2012) e mais de 100 loci associados com a deficiência auditiva (TEKIN *et al.*, 2015). Esses genes relacionados à deficiência auditiva síndrômica e não síndrômica em geral codificam proteínas relacionadas a diferentes funções essenciais para a manutenção e o desenvolvimento do sistema

auditivo, como fatores de transcrição, proteínas estruturais, canais iônicos, entre outros (DROR & AVRAHAM, 2010).

Com relação ao atendimento médico, muitas vezes é difícil definir a etiologia da deficiência auditiva. Ainda que se descarte a etiologia ambiental, no campo da genética existem dificuldades para se determinar a etiologia e distinguir um quadro sindrômico de não sindrômico, devido a grande heterogeneidade fenotípica de muitas síndromes e o aparecimento isolado de alguns sinais clínicos, como por exemplo, o aparecimento precoce da deficiência auditiva, sem o aparecimento, no primeiro momento, das outras manifestações da síndrome (ALFORD *et al.*, 2014). Um exemplo é a Síndrome de Usher, onde a deficiência auditiva frequentemente é congênita com o surgimento de comprometimento visual apenas no final da infância (SLOAN-HEGGEN *et al.*, 2016). Pode-se dizer que estas são síndromes que mimetizam a deficiência auditiva não sindrômica. Como outro fator complicante, a deficiência auditiva pode ser acompanhada de outras complicações clínicas de etiologias completamente distintas, dificultando o correto diagnóstico e determinação da etiologia da deficiência auditiva.

## **Deficiência auditiva sindrômica**

A deficiência auditiva sindrômica é aquela em que a deficiência auditiva é acompanhada por anormalidades adicionais (KOFFLER *et al.* 2016). Estima-se que 30% dos casos de deficiência auditiva genética são sindrômicos (ALFORD *et al.*, 2014). Abaixo estão sumarizadas parte das síndromes mais comuns associadas à deficiência auditiva.

### **CHARGE**

A síndrome de CHARGE (OMIM, 214800) reúne diversas alterações clínicas que dão o nome à síndrome. Dentre elas encontra-se: coloboma ocular (*Coloboma*), anomalia cardíaca (*Heart anomalies*), atresia de coanas (*Atresia choanal*), retardo do desenvolvimento (*Retardation of development*), anomalias genitais (*Genital anomalies*) e anomalias das orelhas (*Ear anomalies*). Hiposmia, fenda palatina e fístula

traqueoesofágica também são reportados como características associadas à síndrome. É uma síndrome rara, com incidência de aproximadamente 1:10000 (LALANI *et al.*, 2006) , tendo herança autossômica dominante.

O gene *CDH7*, que codifica uma proteína helicase envolvida na remodelação de cromatina, é o principal gene com mutações associadas à causa da síndrome (SOHN *et al.*, 2016). O gene *SEMAE3* também já foi relacionado à síndrome em casos pontuais. (JANSSEN *et al.*, 2012; LALANI *et al.*, 2004). Foi observado que até 90% dos pacientes clinicamente diagnosticados com CHARGE apresentam mutações patogênicas no gene *CHD7*, sendo o principal gene relacionado à síndrome. (LALANI *et al.*, 2006; SOHN *et al.*, 2016; ZENTNER *et al.*, 2011)

### **Treacher Collins**

A síndrome de Treacher Collins, também conhecida como Displasia Mandibulo-facial ou síndrome de Franchetti-Zwahlen-Klein, tem como as principais manifestações a hipoplasia dos ossos zigomáticos, da mandíbula e do malixar, microtia e outras anormalidades da orelha externa, coloboma da pálpebra inferior e ausência de cílios inferiores. Possui incidência de aproximadamente 1:50000. A síndrome é causada principalmente por mutações patogênicas no gene *TCOF1* (~ 78-93% dos casos) (OMIM 606847), porém mutações patogênicas nos genes *POLRIC* (OMIM 610060) e *POLRID* (OMIM 613715) também podem levar ao quadro. A síndrome tem padrão de herança autossômico dominante. A surdez condutiva é resultado da malformação ou ausência dos ossículos da orelha média e malformações da orelha externa e está presente em aproximadamente 40-50% dos casos (KATSANIS & JABS, 2004; TRAINOR & ANDREWS, 2013).

### **Waardenburg**

A síndrome de Waardenburg é caracterizada por manifestações clínicas tais como olhos azuis brilhantes ou heterocromia de íris, deficiência auditiva e pigmentação da pele e/ou cabelos anômala. Apresenta padrão de herança autossômico dominante. (SONG, *et al.*, 2015). A incidência é estimada em 1:42000 (DOURMISHEV *et al.*, 1999). Devido

a sua heterogeneidade fenotípica, a síndrome é classificada em quatro tipos: tipo I (OMIM 193500), tipo II (OMIM 193510), tipo III (OMIM 148820) e tipo IV (OMIM 277580), caracterizada também por heterogeneidade genética. Os tipos I e III são associados à mutações patogênicas no gene *PAX3*, o tipo II associado à mutações patogênicas nos genes *MITF*, *SNAI2* e *SOX10* e o tipo IV associado à mutações nos genes *EDNRB*, *EDN3* e *SOX10* (SONG, *et al.*, 2015).

## **Usher**

A síndrome de Usher é caracterizada pela alta heterogeneidade clínica e genética e por isso é dividida em grupos que compartilham determinadas características clínicas em comum. Em geral, pessoas afetadas apresentam deficiência auditiva que pode variar de leve a profunda, além de retinite pigmentosa e disfunção vestibular. No tipo I (OMIM 276900), os afetados apresentam surdez congênita profunda, retinite pigmentosa progressiva e bilateral, além de disfunções vestibulares. A síndrome do tipo II (OMIM 605472) é menos severa, já que há ausência de disfunção vestibular e a deficiência auditiva congênita é de leve a moderada em baixas frequências, porém a retinite pigmentosa ainda se faz presente. O tipo III (OMIM 276902) é caracterizado por surdez e retinite pigmentosa, que podem variar quanto a idade de manifestação, e a disfunção vestibular, que pode estar presente ou ausente (YAN & LIU, 2010). Até o momento já foram identificados 15 diferentes loci relacionados à síndrome. Para o tipo I, foram identificados seis genes - *MYO7A*, *USH1C*, *CDH23*, *PCDH15*, *SANS* e *CIB2*; para o tipo II, quatro genes - *USH2A*, *GPR98/PDZD7* e *WHRN* - e um gene para o tipo III: *CLRN1* (EBERMANN *et al.*, 2010; VAN CAMP & SMITH, 2017). A síndrome apresenta padrão de herança autossômico recessivo (KRAWVITZ *et al.*, 2014). A prevalência é estimada em 3.2-6.2:100000; porém, essa deve ser uma subestimativa visto que pessoas afetadas pelos tipos menos severos II ou III da síndrome podem estar subrepresentadas nessas estatísticas (LENTZ & KEATS, 2016)

## **Branquio-Oto-Renal**

A Síndrome Branquio-Oto-Renal (BOR) (OMIM 113650/ OMIM 610896) é uma síndrome de herança autossômica dominante e é considerada umas das síndromes autossômica dominantes mais comuns relacionadas à deficiência auditiva (SONG *et al.*, 2013). Inclui alterações branquiais, como fístulas cervicais e “pits” auriculares; auditivas e renais, que podem ter grande variação, incluindo diagnósticos diferenciais. (JECMENICA & BAJEC-OPANCINA, 2015). As mutações no gene *EYAI* são as mais comumente associadas ao quadro da síndrome (40%), enquanto mutações nos genes *SIX1* e *SIX5* também já foram relacionadas em menores proporções. Mais de 160 mutações no gene *EYAI* já foram relacionadas à síndrome, sendo as mutações sem sentido as com maior representatividade (SONG, *et al.*, 2013).

## **Óculo-Auriculo-Vertebral**

O espectro Óculo-Auriculo-Vertebral (Síndrome de Goldenhar) é caracterizado por um conjunto de anomalias derivadas de defeitos no desenvolvimento do primeiro e segundo arco-branquiais. As características fenotípicas podem ter grande variação, desde uma microtia isolada até uma grave microssomia hemifacial. Na síndrome de Goldenhar, alterações da coluna vertebral e olhos ainda podem ser observadas: dermóide epibulbar, coloboma de pálpebra superior e alterações nas vértebras (DAVIDE *et al.*, 2017). A etiologia da doença demonstra-se ser bastante heterogênea, não tendo sido esclarecida até o momento uma única causa. (ASHOKAN *et al.* 2014). Sugere-se o envolvimento de fatores genéticos desconhecidos, entre elas, aberrações cromossômicas e causas ambientais (DOS SANTOS *et al.*, 2014). Diversos casos familiares já foram descritos com padrões de herança autossômico dominante e recessivo, embora a maioria dos casos seja esporádico (TASSE *et al.*, 2007).

## **MIDD (*Maternally Inherited diabetes and deafness*)**

A síndrome MIDD (OMIM 520000) é causada, principalmente pela mutação m.3243A>G no gene *MTTL1* do DNA mitocondrial e tem como características clínicas

principalmente a surdez neurossensorial progressiva e a diabetes semelhante a tipo II. Algumas outras anomalias podem estar presentes, como problemas cardíacos e intestinais (MURPHY *et al.*, 2008). Mutações patogênicas em outros genes mitocondriais como *MTTE* e *MTTK* também podem levar ao mesmo quadro clínico.

## **Diagnóstico Molecular**

Um roteiro clínico e diagnóstico deve ser seguido quando há suspeita de deficiência auditiva em um novo paciente. O ideal é que seja feita uma avaliação multidisciplinar que inclua otorrinolaringologistas, geneticistas, entre outras especialidades. A avaliação da história clínica do paciente, história pré e pós-natal, além do heredograma e a história clínica da família são fundamentais como primeiro passo, além de exames físico e laboratoriais que devem ser feitos, tais como exames oftalmológicos, audiométricos, teste de TSH e urina para confirmar a existência e/ou ausência da deficiência auditiva e de comprometimentos adicionais. Todos esses exames, unidos à testes genéticos, podem identificar com mais precisão a etiologia da deficiência auditiva (ALVES & RIBEIRO, 2007).

Um dos primeiros passos na busca da etiologia da doença é a inclusão ou exclusão do ambiente como fenômeno explicativo. Nesse caso, busca-se a detecção de uma possível infecção, como o teste para citomegalovírus (CMV) (ALFORD *et al.*, 2014). A avaliação genética familiar visa direcionar os testes genéticos e proporcionar um aconselhamento genético mais apropriado. Nesse caso, pode ser possível avaliar os riscos implicados para outros membros da família, o prognóstico para o paciente, o que inclui uma especial atenção a outros órgãos afetados na síndrome detectada, além de sugestões de intervenções para melhorar o seu desenvolvimento.

A maioria dos testes genéticos disponíveis para casos de deficiência auditiva hereditária são baseados na genotipagem ou sequenciamento de um gene suspeito específico. Esse gene é definido com base na suspeita clínica e em um conhecimento já estabelecido de genes que se relacionam com determinado quadro clínico. Em casos de suspeita de deficiência auditiva não sindrômica, o gene *GJB2* é o principal alvo de testes para a determinação da causa molecular da deficiência. Em suspeitas de deficiência auditiva sindrômica, há uma série de genes relacionados com síndromes conhecidas (exemplos apresentados previamente) que podem ser testados caso haja uma suspeita

clínica que aponte para uma dessas síndromes, como por exemplo, a investigação do gene *CDH23* quando há suspeita da síndrome de Usher tipo I, ou *PAX3* quando há suspeita da síndrome de Waardenburg tipo I (ALFORD *et al.*, 2014). Ainda existem outras técnicas, a exemplo do MLPA (*Multiplex ligation-dependent probe amplification*) ou *microarrays*, para análise de outras alterações genéticas, como *Copy Number Variations* (CNVs), que podem levar a quadros clínicos de deficiência auditiva síndrômica ou não síndrômica.

Atualmente, testes baseados no Sequenciamento de Nova Geração (NGS) do genoma vêm tomando grande espaço na Genética Médica. Estes testes podem ser baseados em um sequenciamento direcionado de éxons, sequenciamento de exoma total ou mesmo no sequenciamento de todo o genoma.

No primeiro caso, são sequenciados apenas regiões de interesse. Por exemplo, apenas regiões codificantes presentes nos éxons de genes e regiões de splicing relacionados às síndromes conhecidas, que apresentam a deficiência auditiva como um dos fenótipos podem ser sequenciadas. Nesse caso, um conhecimento prévio de genes/regiões relacionados ao fenótipo e às diferentes síndromes é necessário. Normalmente, envolve um enriquecimento das regiões de interesse do genoma e posterior sequenciamento de alta performance (SHEARER & SMITH, 2015). Já o sequenciamento de exoma total é o sequenciamento de todos os éxons presentes em genes codificantes do genoma (WARR *et al.*, 2015), enquanto o sequenciamento do genoma completo envolve o sequenciamento de todas as regiões do genoma humano.

As regiões codificantes do genoma estão distribuída ao longo dos éxons (~180.000) e representam aproximadamente 1% de todo o genoma humano (NG *et al.*, 2010). Sabe-se, ainda, que a maioria das mutações envolvidas em doenças mendelianas estão em regiões codificantes, sendo então, regiões com grande potencial de se encontrar variantes patogênicas (BAMSHAD *et al.*, 2011).

Com o progresso da tecnologia, esses testes foram se tornando cada vez mais acessíveis financeiramente. No entanto, o grande volume de dados e o desafio das análises bioinformáticas podem tornar a análise complexa, assim como o processo delicado de classificação das variantes encontradas. O sequenciamento direcionado de éxons, por cobrir uma menor porção do genoma, é a análise que pode ser considerada de menor complexidade quando comparada com o sequenciamento de maiores porções do

genoma, além de proporcionar melhor cobertura e custo-benefício até o momento, por ser de menor custo.

Diversos estudos aplicando a técnica de sequenciamento de exoma direcionado já foram publicados a fim de identificar mutações em pacientes com deficiência auditiva não sindrômica (CHEN *et al.*, 2015; CHOI *et al.*, 2013; SHEARER *et al.*, 2013) e outros para diagnóstico de síndrome associadas à deficiência auditiva, especialmente as mais heterogêneas, como síndrome de Usher e Waardenburg (HUANG *et al.*, 2013; SHI *et al.*, 2016). No entanto, nenhum trabalho até o momento usou a tecnologia a fim de desenhar um painel especificamente para deficiência auditiva como propomos neste trabalho.

Essa técnica permite encontrar mutações associadas à patologia já descritas em bancos de dados e/ou pode revelar novas mutações patogênicas nos genes relacionados à condição. Em seu estudo, HUANG *et al.* (2013) desenhou um painel de éxons de 144 genes relacionados à retinites genéticas e comprovou ser útil para investigar as causas genéticas em seus pacientes, além de ter relevado com essa mesma técnica sete novas mutações patogênicas no gene *USH2A*. Da mesma forma, SHI *et al.* (2016) identificou uma nova mutação patogênica no gene *MIFT* segregando em uma família chinesa através do uso de um painel que cobria todos os genes relacionados até então à síndrome de Waardendurg. A possibilidade de investigar vários genes ao mesmo tempo com ótima cobertura proporciona a identificação de novos polimorfismos e mutações em uma escala muito maior do que qualquer outra vista anteriormente, gerando um grande volume de dados, que é fundamental na melhor compreensão da deficiência auditiva.

As tecnologias baseadas em sequenciamento de nova geração ainda representam a melhor opção para abranger a grande heterogeneidade genética que existe na etiologia da deficiência auditiva, especialmente em casos sindrômicos, enquanto os testes de genotipagem individuais não permitem (ALFORD *et al.*, 2014).

Quando nenhuma explicação para a etiologia da deficiência auditiva ou da síndrome é encontrada por métodos moleculares prévios, como análises por *microarray* ou por painéis de genes, uma alternativa pode ser a análise por sequenciamento de exoma total ou mesmo um sequenciamento de genoma total, quando necessário. Recentemente, o uso do sequenciamento do genoma total como diagnóstico para doenças genéticas foi evidenciado ao identificar variações causativas em 42% dos pacientes com deficiência intelectual selecionados para o estudo. Estes pacientes já haviam sido previamente

investigados pelas mais variadas técnicas moleculares disponíveis, sem nenhum resultado, incluindo *microarray* e sequenciamento de exoma total (GILISSEN *et al.*, 2014).

## JUSTIFICATIVA

Estima-se que, quando não identificada e tratada, a deficiência auditiva representa um custo global de aproximadamente 750 bilhões de dólares. Dessa forma, intervenções para a sua identificação, tratamento e prevenção trazem um grande benefício não só para os pacientes, mas também financeiro (OMS, 2017).

Painéis genéticos baseados em sequenciamento de nova geração vem sendo utilizados para realizar um *screening* de mutações em genes relacionados à câncer, doenças neurodegenerativas, entre outras doenças, com resultados satisfatórios. Atualmente, o *American College of Medical Genetics and Genomics Practice Guideline* (2014) recomenda o uso painéis direcionados baseado em suspeitas diagnósticas na investigação da etiologia genética da deficiência auditiva. A investigação de deficiência auditiva não síndrômica já conta com alguns painéis desenvolvidos, enquanto ainda não existe na literatura nenhum painel desenvolvido especificamente para a deficiência auditiva síndrômica. Dessa forma, o desenvolvimento de um painel baseado em sequenciamento de exoma direcionado para deficiência auditiva síndrômica visa incrementar e oferecer uma alternativa moderna na busca da etiologia genética dessas doenças. A análise de exomas direcionados já vem sendo utilizada na prospecção da etiologia genética de diversos casos de deficiência auditiva síndrômica e não síndrômica em grandes centros e laboratórios de diagnóstico internacionais.

Um diagnóstico molecular preciso auxilia na confirmação do diagnóstico clínico e permite esclarecer a probabilidade de recorrência da doença em outros membros da família. Também pode auxiliar em uma melhor investigação sobre a genética da doença, nas possibilidades de tratamento e nos possíveis efeitos da doença sobre a saúde do paciente, além de permitir um diagnóstico pré-natal acurado, que permite um manejo precoce da doença. Todos esses benefícios permitem um melhor aconselhamento genético.

Tendo isso em vista, o presente projeto busca contribuir para um melhor diagnóstico genético da deficiência auditiva síndrômica a partir do desenvolvimento de um painel

diagnóstico baseado em sequenciamento de exoma direcionado que cubra genes candidatos e descritos relacionados à deficiência auditiva síndrômica.

## **OBJETIVOS**

### **Objetivo Geral:**

Desenvolver um painel diagnóstico para deficiência auditiva síndrômica baseado em sequenciamento de exoma direcionado capaz de cobrir genes já descritos como relacionados e genes candidatos à deficiência auditiva síndrômica.

### **Objetivos Específicos:**

1. Desenhar um painel diagnóstico a partir de levantamento bibliográfico de genes relacionados com síndromes que tenham como característica clínica a deficiência auditiva em qualquer grau;

2. Identificar a presença de mutações potencialmente patogênicas em pacientes com deficiência auditiva síndrômica, sejam descritas ou não, nos genes cobertos pelo painel;

3. Avaliar a potencial existência de pacientes, dentre os selecionados, com uma possível deficiência auditiva não síndrômica associada à sinais clínicos de diferente etiologia genética;

4. Avaliar a relação entre os genes propostos para a Síndrome de Goldenhar com os pacientes diagnosticados com a síndrome incluídos no estudo;

5. Avaliar o desempenho do painel como ferramenta diagnóstica.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Aspectos éticos

Esse projeto foi aprovado no Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade de Brasília, número CAAE 30441114.8.0000.0030 e parecer número 1.312.729. Os pacientes recrutados e/ou seus responsáveis receberam todos os esclarecimentos necessários antes e durante a pesquisa sobre as nossas metodologias e objetivos. Os pacientes que atenderam aos critérios de inclusão (abaixo) no projeto e concordaram com a participação, foram convidados a assinar o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido – TCLE, onde permitiram o uso de seu material biológico coletado e outras informações relevantes para o projeto, mantendo o total sigilo acerca das suas informações. Em caso de pacientes incapazes ou menores de idade, os responsáveis assinaram o TCLE e os os menores assinaram o Termo de Assentimento Livre e Esclarecido – TALE, redigido em linguagem mais simplificada e acessível a essas pessoas.

### Critérios de Inclusão

Foram recrutados 27 pacientes e dois indivíduos controle (portadores da mutação c.35delG no gene GJB2) que concordaram em participar da pesquisa ou foram autorizados através dos responsáveis via assinatura do TCLE. Dos pacientes incluídos, sete não apresentam diagnóstico clínico de síndrome conhecida em que a deficiência auditiva seja um dos sinais clínicos. O objetivo dessa inclusão foi avaliar se esse painel também poderia ser utilizado para esse tipo de caso. Dois pacientes apresentam Síndrome Óculo-Aurículo-Vertebral, síndrome sem gene conhecidamente relacionados até a data do desenho do painel, mas para a qual adicionamos genes propostos. Esses pacientes já haviam realizado previamente análise por *microarray*. O restante dos pacientes (18), apresentam diagnóstico clínico.

Os critérios de inclusão nesse estudo foram:

- a. Ter diagnóstico clínico de deficiência auditiva acompanhada de outras alterações morfológicas ou fisiológicas, tais como alterações visuais, cardíacas, renais,

- dismorfias, que permitam classificar clinicamente um quadro de deficiência auditiva sindrômica;
- b. Não ter diagnóstico molecular definido;
  - c. Consentir com sua participação no projeto ao assinar o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido –TCLE.

### **Coleta de material biológico, extração e avaliação do DNA**

Foram coletados de 4 a 8 ml de sangue periférico, em tubo contendo EDTA como anticoagulante, por profissional capacitado e utilizando material estéril e descartável. A extração de DNA foi realizada seguindo protocolo adaptado do *Kit Genra Puregene Blood Kit- QIAGEN*, usado de rotina no laboratório. Após a extração, o material genético foi avaliado qualitativamente e quantitativamente utilizando os sistemas Nanodrop e Qubit e por gel de agarose.

### **Desenvolvimento do painel de exoma direcionado para diagnóstico de deficiência auditiva sindrômica**

O painel de exoma direcionado foi desenvolvido para uso na plataforma ION Torrent PGM™ (*Personal Genome Machine*), pois esta permite a análise de amostras de forma individualizada, enquanto nas plataformas concorrentes a análise deve ser realizada para um número determinado de amostras. Como espera-se que o painel seja utilizado para casos clínicos esporádicos, uma plataforma que permita a análise de um indivíduo é mais adequada. Ainda, protocolos de menor custo e que pudessem ser realizados de forma mais individualizada foram priorizados a fim de que o painel pudesse ser uma ferramenta utilizada de rotina para diagnósticos. Além disso, os iniciadores do painel Ampliseq vêm em quantidade suficiente para o preparo de biblioteca de centenas de amostras.

O desenvolvimento do painel de diagnóstico consistiu na seleção de genes relacionados e candidatos à deficiência auditiva sindrômica com base no banco de dados do OMIM (*Online Mendelian Inheritance in Man*) e literatura especializada. Também foi adicionado o gene *GJB2*, que além de relacionado com síndromes, também é o principal gene relacionado à deficiência auditiva não sindrômica, na tentativa de identificar a

deficiência auditiva não sindrômica com outros sinais clínicos de diferentes etiologias genéticas.

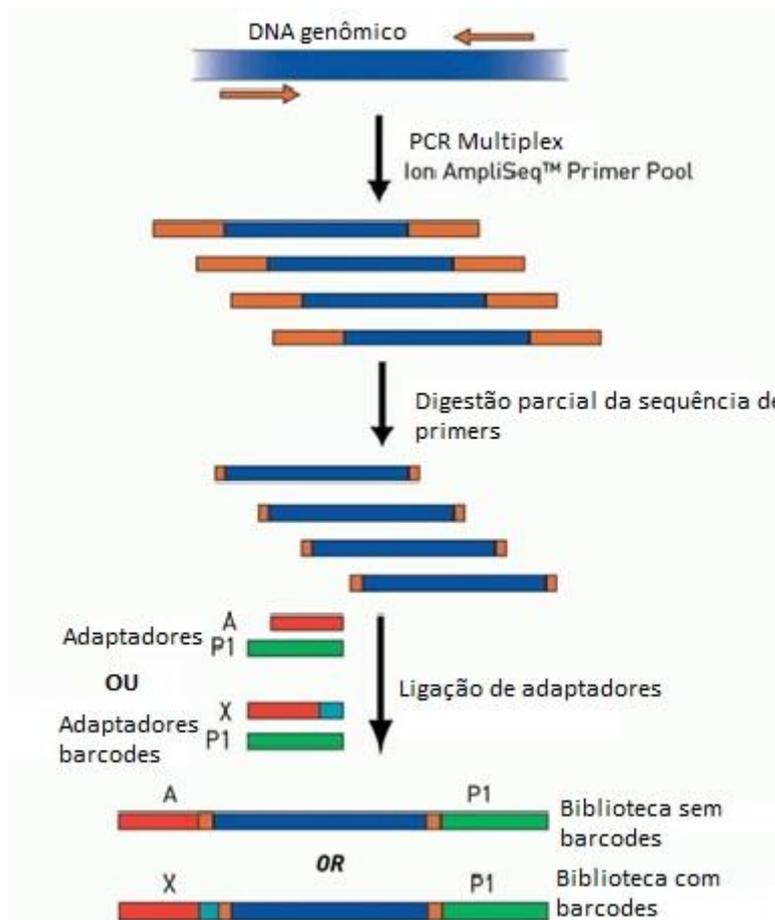
Os genes foram selecionados buscando a melhor cobertura possível do conhecimento atual sobre deficiência auditiva sindrômica. A partir da definição dos genes, o painel customizado foi desenhado usando o software *ION Ampliseq™ Designer online* (<https://www.ampliseq.com/>). Os iniciadores foram divididos em dois conjuntos (pools), de acordo com o protocolo do fabricante.

## **Sequenciamento das regiões alvo do painel**

### **Amplificações dos alvos genômicos e preparo de Biblioteca NGS**

Para o preparo da biblioteca foi utilizado o kit Ion Ampliseq™ Library 2.0 conforme protocolo do fabricante, exposto na figura 5 de forma ilustrada. Primeiramente, realizou-se a amplificação dos alvos genômicos por PCR, sendo que o número de ciclos, 18, foi estimado a partir do número de pares de iniciadores por pool. Posteriormente, as sequências de iniciadores foram parcialmente digeridas utilizando o reagente específico PuFa. Os barcodes e adaptadores universais foram ligados aos amplicons utilizando o kit Ion Xpress™ Barcodes Adapters. A numeração dos barcodes foi sequencial e realizada pelo fabricante.

Com a biblioteca NGS montada, procedeu-se à sua purificação, realizada utilizando o Agencourt® AMPure® XP Reagent . Depois, foi realizada a amplificação da biblioteca por PCR e a uma segunda purificação utilizando o mesmo reagente. A biblioteca foi então quantificada utilizando o kit Qubit® dsDNA HS Assay Kit ou Ion Library TaqMan™ Quantitation Kit e diluída para a concentração necessária aproximada de 100 pM, a fim de ser utilizada na próxima etapa.



**Figura 3.** Fluxograma demonstrativo dos processos para o preparo da biblioteca Ion Ampliseq. Uma PCR multiplex é realizada a fim de amplificar o alvo genômico desenhado no painel. Depois, procede-se à digestão parcial das sequências de primers e a posterior ligação de adaptadores barcodes, criando uma biblioteca com barcodes. Modificado de <http://www.floragenex.com/ampliseq/>

### PCR em emulsão e Enriquecimento de *beads* positivas

O sequenciamento pelo ION Torrent possui algumas peculiaridades típicas da plataforma, como a amplificação clonal da biblioteca feita por PCR em emulsão. Para isso, pequenas micelas são formadas em uma solução emulsionada, em que cada uma deverá abrigar apenas uma *bead* (esfera) e um segmento de DNA ligado a ela pelo seu adaptador, segmento este que será amplificado clonalmente em ciclos de PCR a fim de amplificar o sinal a ser detectado durante do sequenciamento pelo ION PGM™.

Após a biblioteca preparada, purificada e quantificada, segue-se para a realização da PCR em emulsão, realizada pelo equipamento One Touch™ 2. Para isso, os reagentes

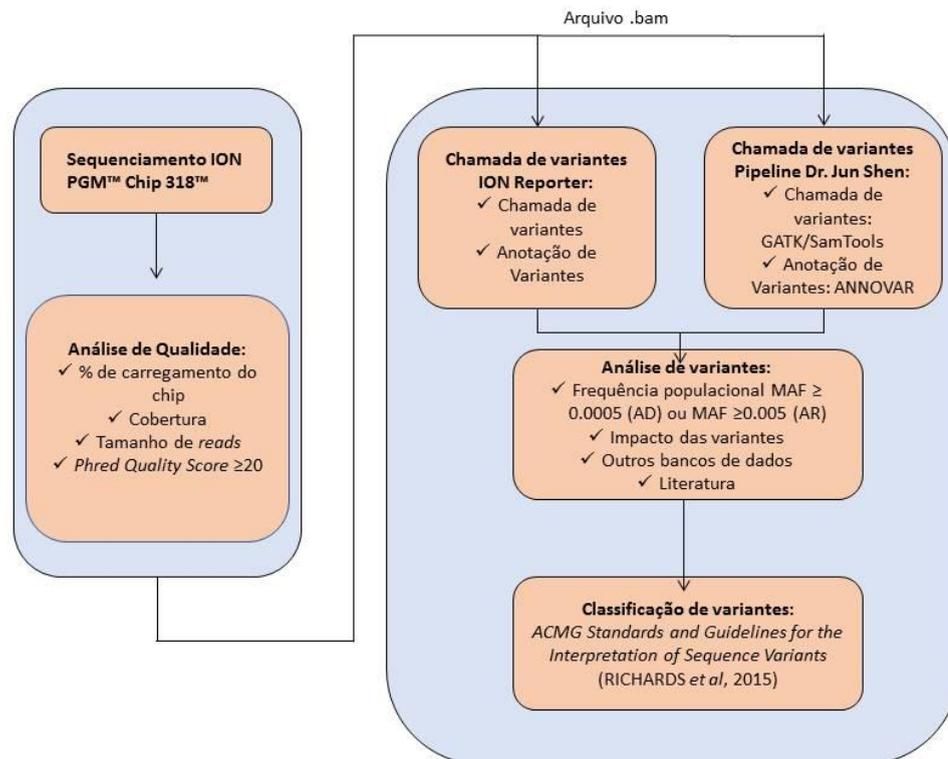
para a PCR e as *beads* Ion PGM™ Hi-Q™ ISPs são adicionados à biblioteca na concentração adequada de 100pM. Para a realização da PCR em emulsão e enriquecimento das *beads* positivas (aquelas que contém fragmentos de DNA amplificado) foi utilizado o kit Ion PGM™ Hi-Q™ OT2 , conforme protocolo dos fabricantes. Após a amplificação pela PCR em emulsão, as *beads* foram recuperadas e seguiu-se com o enriquecimento das *beads* positivas pelo equipamento equipamento One Touch™ ES. Nessa etapa, ocorre a separação das *beads* acopladas à fragmentos de DNA amplificados das *beads* não acopladas. Apenas as *beads* positivas sequem para o sequenciamento.

### **Sequenciamento na Plataforma ION Torrent PGM™**

O sequenciamento foi realizado conforme protocolo do fabricante pelo sequenciador ION Torrent PGM™. Antes de carregar o chip com as amostras, as *beads* controle Control Ion Sphere™ Particles foram adicionadas às *beads* positivas. Depois, os primers de sequenciamento foram anelados às amostras no termociclador e a polimerase Ion PGM™ Hi-Q™ Sequencing Polymerase foi adicionada ao produto. Carregamos o chip Ion 318™ Chip com o volume total de reação (~30µl). O chip Ion 318™ contém milhares de micropoços onde as *beads* positivas irão de depositar e é capaz de gerar até 2 Gb de dados de sequenciamento e pelo menos 4 milhões de *reads* (fragmentos de leitura).

### **Análise Bioinformática**

Os dados gerados pelo ION PGM™ foram analisados primeiramente quanto a qualidade do sequenciamento. Depois desta primeira etapa, procedeu-se à chamada e anotação das variantes. Depois de identificadas, as variantes foram analisadas baseado nos resultados retornados pela anotação e dados na literatura. (Figura 4.)



**Figura 4.** Fluxograma de análise dos dados gerados pelo sequenciador Ion Torrent PGM. Antes de iniciar a análise de variantes, uma análise geral dos parâmetros de qualidade é realizada. Com relação à análise de variantes, os dados podem ser analisados pelo software Ion Reporter, fornecido pela Thermo Fisher Scientific, ou podem ser analisados separadamente pelo *pipeline* desenvolvido pela Dr. Jun Shen. Depois de ter as variantes anotadas, as últimas etapas consistem na análise de informações gerais, como frequência populacional e impacto das variantes, que permitirão uma classificação adequada das variantes a partir do *ACMG Standards and Guidelines for the Interpretation of Sequence Variants* (RICHARDS *et al*, 2015).

### Análise da qualidade do sequenciamento

A avaliação de qualidade do sequenciamento no sequenciador Ion Torrent PGM™ é baseada na porcentagem de carregamento dos poços presentes nos chips e na profundidade de cobertura por amostra, ou seja, quantas leituras por amostra foram realizadas (estimativa do número de *reads*).

De acordo com a firma fornecedora dos kits e reagentes, o carregamento ideal do chip situa-se entre 70%-90%. Com relação à profundidade de cobertura, de acordo com a capacidade de leitura do chip utilizado e o número de amostras por chip, calculou-se que a cobertura poderia ser de até 250x em média por amostra.

Os dados com relação a cobertura foram fornecidos pelo plugin *CoverageAnalysis* do Ion Torrent e também realizada separadamente pelo pacote GATK através do software *DepthOfCoverage*.

Usando como referência a literatura da tecnologia de exoma direcionado para o diagnósticos de doenças genéticas, definiu-se valor mínimo de 70-100x de cobertura por amostra. No entanto, não existe um consenso de cobertura ideal e testes analíticos de cada laboratório devem estabelecer o valor adequado (REHM *et al*, 2013), sendo portanto, uma análise individual que não foi possível ser realizada nesse trabalho.

Com relação ao tamanho dos fragmentos de leitura (*reads*), esperava-se que o tamanho das *reads* fosse de até 410pb, vide a química do kit utilizado e baseado no tamanhos dos amplicons (275-375pb).

Outro parâmetro de qualidade utilizado foi *Phred Quality score* (Q), que estima a probabilidade de uma determinada base ter sido sequenciada de forma correta. Os *softwares* utilizados consideraram para este trabalho um score mínimo de 20 para considerar as bases sequenciadas para análise, o que representa uma acurácia de 99%, ou seja, a cada 100 pb sequenciados, pode haver até um erro de sequenciamento.

Em decorrência da não leitura de quatro amostras no segundo experimento e da falta de homogeneidade entre a cobertura média entre as amostras, foi solicitado uma confirmação dos valores de qualidade, em especial com relação ao carregamento de chip e total de *reads* sequenciadas, utilizando um teste de qualidade no laboratório da própria firma fornecedora do material de consumo (*Thermo Fisher Scientific*). Para tanto, foram enviadas amostras testes. Os valores de *Phred Quality score*, número de bases e tamanho médio das *reads* não foram disponibilizados.

Todos esses dados de parâmetros de qualidade foram fornecidos diretamente pelo *software* do sequenciador após a reação de sequenciamento.

### **Chamada, Anotação e Análise de variantes**

A análise de variantes foi realizada utilizando-se duas diferentes abordagens: I) utilizando o software disponibilizado pela Thermo Fisher, o Ion Reporter™. II) Paralelamente, os dados foram analisados por *pipeline* desenvolvido pela Dra. Jun Shen,

do *Brigham and Women's Hospital* (Boston, USA), que desenvolveu e forneceu um *pipeline* para a chamada e anotação de variantes (Figura 4.)

O sequenciador ION PGM™ fornece como *output* arquivos já alinhados com o genoma referência (hg19) pelo software *The Torrent Mapping Alignment Program* (TMAP) (HOMER *et al.*, 2014) no formato .bam , que posteriormente é exportado e utilizado pelo Ion Reporter™, que realiza as etapas de chamada de variantes e a posterior anotação das mesmas.

Com relação ao *pipeline* da Dr. Jun Shen, também optou-se por iniciar a análise a partir da chamada de variantes utilizando os arquivos .bam exportados pelo sequenciador após o alinhamento e o software *HaplotypeCaller* do *Genome Analysis Toolkit* (GATK) (DEPRISTO *et al.*, 2011; MCKENNA *et al.*, 2010; VAN DER AUWERA *et al.*, 2013) e paralelamente o pacote BcfTools do Sam Tools (LI, 2011) para a chamada de variantes, assim como o GATK para realização de filtros e outras análises. Para anotação das variantes, foi utilizado o software ANNOVAR (WANG *et al.*, 2010) , que reúne uma variedade de banco de dados, como RefGene, Cytoband, Genomic Superdups, NIH-NHLBI 6500 *exome database* (FU *et al.*, 2013), *1000Genomes* (AUTON *et al.*, 2015), dbSNP (SHERRY *et al.*, 2001) e dbNSFP (LIU *et al.*, 2011). Este último reúne uma série de algoritmos preditivos de alterações deletérias nas proteínas, como Polyphen-2 (ADZHUBEI *et al.*, 2010), SIFT (KUMAR *et al.*, 2009) , LTR (CHUN & FAY, 2009), MutationTaster (SCHWARZ *et al.*, 2010), FTHMM , fthmm MKL (SHIHAB *et al.*, 2013; SHIHAB *et al.*, 2015), CADD (KIRCHER *et al.*, 2014), fitCons (GULKO *et al.*, 2015), DANN. Cada algoritmo possui um sistema de scores específico que pode ser encontrado na documentação específica para cada algoritmo ou na documentação do dbNSFP.

O dbNSFP também possui algoritmos que mensuram o grau de conservação do sítio da mutação como GERP++ (COOPER *et al.*, 2005), SiPhy, PhyloP (P100way\_vertibrate e P20way\_mammalian) (SIEPEL & HAUSSLER, 2006) e phastCons (100way\_vertibrates e 20way\_mammalian) (SIEPEL *et al.*, 2005). Esses algoritmos se baseiam no alinhamento múltiplo a sequências de 100 vertebrados e 20 mamíferos. Se uma mutação acontece em sítios mais conservados entre espécies, a tendência é que ela tenha mais probabilidade de ter relevância funcional e conseqüentemente ser mais deletéria. Cada algoritmo possui um sistema de scores e classificação diferentes, que pode ser encontrado na documentação do software dbNSFP e foi levado em conta na análise das variantes.

As frequências populacionais foram obtidas dos bancos de dados ExAC (LEK et al, 2016), *1000Genomes* (AUTON et al., 2015), NIH-NHLBI 6500 *exome database* (FU et al., 2013) e do banco OtoDB, que são indivíduos controles sequenciados pelo painel OtoSCOPE (SHEARER et al, 2014).

Foi estabelecido que o limiar máximo de MAF (frequência do alelo raro) em bancos de dados de frequências populacionais seria de 0,005 para variantes autossômicas recessivas, exceto para as variantes c.35delG (0,0108) e c.167delT (0,01) no gene *GJB2*, e de 0,0005 para variantes autossômicas dominantes, de acordo com o proposto por SHEARER et al (2014).

Todos os dados informativos da fase de anotação das variantes foi utilizado para a realização de filtros a fim de elencar as mutações com potenciais patogênicos que pudessem explicar o quadro clínico dos pacientes.

### **Classificação de variantes**

As mutações informativas, isto é, aquelas passíveis de serem utilizadas em um laudo diagnóstico, foram classificadas de acordo com os guias de interpretação de variantes da *American Society of Medical Genetics* (RICHARDS et al., 2015). Esse guia tem como principal objetivo fornecer uma classificação padronizada de variantes. Essa classificação recomenda o uso de uma terminologia padronizada que inclui os termos: “patogênico”, “provavelmente patogênico”, “significado incerto”, “provavelmente benigna” e “benigna” para a interpretação das variantes em doenças mendelianas encontradas por qualquer meio de análise, o que inclui NGS, entre outros.

A interpretação das variantes é baseada em um conjunto de evidências que inclui dados populacionais, computacionais, funcionais, dentre outros (Tabela 3), os quais são combinados para obtenção de pontuações que irão permitir a inclusão da mutação na categoria benigna ou patogênica e suas sub-classificações (Tabela 4). Para as variantes benignas, as evidências podem ser classificadas como Fortes (BS1-BS4) ou Indicativas (BP1-BP7). Já para variantes patogênicas, as evidências podem ser consideradas Indicativas (PP1-PP5), Moderadas (PM1-PM6), Fortes (PS1-PS4) ou Muito fortes (PVS1)

**Tabela 2.** Dados e evidências utilizados para a classificação de variantes de acordo com o Guia de interpretação de variantes da American Society of Medical Genetics (RICHARDS et al., 2015).

<b>Evidências Patogênicas</b>	
<b>Muito Forte</b>	
PVS1	Variante nula onde LOF é um mecanismo conhecido da doença
<b>Forte</b>	
PS1	Mesma mudança de aminoácido que uma mutação patogênica já conhecida
PS2	De novo (com confirmação de maternidade e paternidade)
PS3	Estudos funcionais bem estabelecidos mostram efeitos deletérios
PS4	Prevalência em afetados estatisticamente maior que em controles.
<b>Moderada</b>	
PM1	Hot-Spot mutacional e domínio funcional bem conhecido sem variações benignas
PM2	Ausente em banco de dados populacionais
PM3	Para doenças recessivas detectadas <i>in trans</i> com variante patogênica
PM4	Variante que muda o tamanho da proteína
<b>Indicativa</b>	
PP1	Co-segrega com a doença em múltiplos membros afetados da família
PP2	Variante de sentido trocado em gene com baixa taxa desse tipo de variante benignas

	variantes de sentido trocado comuns
PP3	Múltiplos algoritmos computacionais sugerem impacto deletério no produto do gene
PP4	Fenótipo do paciente ou FH altamente altamente específico para o gene PP4
PP5	Fontes renomadas = patogênico

---

### **Evidências Benignas**

---

#### **Forte**

BA1/BS1	MAF é muito alto para a doença
BS2	Observação em controles é inconsistente com a penetrância da doença
BS3	Estudos funcionais bem estabelecidos mostrando nenhum efeito deletério
BS4	Não segrega com a doença

---

#### **Indicativa**

BP1	Mutação de sentido trocado em gene onde só mutações que causam truncamento da proteína são observadas
BP2	Observada <i>in trans</i> com variante dominante
BP3	Observada <i>in cis</i> com uma variante patogênica
BP4	Múltiplos algoritmos computacionais não sugerem impacto no produto do gene
BP5	Encontrada em caso com uma causa alternativa

BP6	Fontes renomadas = benigno
BP7	Mutação silenciosa sem predição de afetar sítios de <i>splicing</i>

---

As evidências são combinadas de acordo com uma regra, apresentada na Tabela 3, a fim de classificar a variantes. Se os critérios são desconhecidos ou os critérios para variantes benignas e patogênicas são contraditórios, a variante pode ser classificada como de “Significado incerto”.

**Tabela 3.** Regras de combinação para critérios de classificação baseado no *ACMG Guidelines for the Interpretation of Sequence Variants* (RICHARDS *et al.* 2015). As variantes podem ser classificadas como de “Significado Incerto” se os critérios são desconhecidos ou os os critérios para variantes benignas e patogênicas são contraditórios.

---

### **Regras para combinar critérios de classificação ACMG Guidelines**

---

#### **Patogênica**

1. 1 Muito forte (PSV1) E
  - a. 1 Forte (PS1-PS4) E
  - b. 2 Moderadas (PM1-PM6) e 1 Indicativa (PP1-PP5) OU
  - c. 2 Indicativas (PP1-PP5)
2. 2 Fortes (PS1-PS4) OU
3. 1 Forte (PS1-PS4) E
  - a. 3 Moderadas (PM1-PM6) OU
  - b. 2 Moderadas (PM1-PM6) e 2 Indicativas (PP1-PP5)
  - c. 1 Moderada (PM1-PM6) e 4 Indicativas (PP1-PP5)

#### **Provavelmente Patogênica**

1. 1 Muito Forte (PSV1) e 1 Moderada (PM1-PM6) OU
2. 1 Forte (PS1-PS4) e 1-2 Moderadas (PM1-PM6) OU

3. 1 Forte (PS1-PS4) e 2 Indicativas OU
4. 3 Moderadas (PM1-PM6) OU
5. 2 Moderadas (PM1-PM6) e 2 Indicativas (PP1-PP5) OU
6. 1 Moderada(PP1-PP5) e 4 Indicativas (PP1-PP5)

**Provavelmente Benigna**

1. 1 Suficiente (BA1) OU
2. 2 Fortes (BS1-BS4)

**Benigna**

1. 1 Forte (BS1-BS4) e 1 Indicativa (BP1-BP7) OU
  2. 2 Indicativas (BP1-BP7)
-

## CONCLUSÃO

- O painel desenvolvido e testado neste trabalho mostrou uma eficiência de diagnóstico de 23%. Excluindo os pacientes sem diagnóstico clínico e os com Síndrome Óculo-Aurículo-Vertebral (Síndrome de Goldenhar) a eficiência de diagnóstico sobe para 35%;
- Não foram encontradas mutações patogênicas nos genes candidatos à Síndrome Óculo-Aurículo-Vertebral nos pacientes com diagnóstico clínico da síndrome que foram avaliados utilizando o painel;
- Foi proposto um fluxograma a ser seguido na busca de diagnóstico para deficiência auditiva sindrômica.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADZHUBEI, I. A. *et al.* A method and server for predicting damaging missense mutations. *Nature Methods*, v. 7, n. 4, p. 248–249, 2010.

AHMED, Z. M. *et al.* Nonsyndromic recessive deafness DFNB18 and usher syndrome type IC are allelic mutations of USH1C. *Human Genetics*, v. 110, n. 6, p. 527–531, 2002.

AHMED, Z. M. *et al.* PCDH15 is expressed in the neurosensory epithelium of the eye and ear and mutant alleles are responsible for both USH1F and DFNB23. *Human Molecular Genetics*, v. 12, n. 24, p. 3215–3223, 2003.

ALAGRAMAM, K. N. *et al.* Mutations in the novel protocadherin PCDH15 cause Usher syndrome type 1F. *Human molecular genetics*, v. 10, n. 16, p. 1709–1718, 2001.

ALFORD, R. L. *et al.* 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.

ALLER, E. *et al.* Genetic analysis of 2299delG and C759F mutations (USH2A) in patients with visual and/or auditory impairments. *European Journal of Human Genetics*, v. 12, p. 407–410, 2004.

ALVES, F. R. A.; RIBEIRO, F. D. A. Q. Roteiro diagnóstico e de conduta frente à perda auditiva sensorineural genética. *Revista Brasileira de Otorrinolaringologia*, v. 73, n. 3, p. 412–417, 2007.

ANGELI, S.; LIN, X.; LIU, X. Z. Genetics of Hearing and Deafness. *The Anatomical Record: Advances in Integrative Anatomy and Evolutionary Biology*, v. 295, n. 11, p. 1812–1829, 2012.

APARISI, M. *et al.* Study of USH1 Splicing Variants through Minigenes and Transcript Analysis from Nasal Epithelial Cells. *PLoS ONE*, v. 8, n. 2, 2013.

APARISI, M. J. *et al.* Targeted next generation sequencing for molecular diagnosis of Usher syndrome. *Orphanet journal of rare diseases*, v. 9, n. 1, p. 168, 2014.

ASHOKAN, C. S.; SREENIVASAN, A.; SARASWATHY, G. K. Goldenhar Syndrome - Review with Case Series. *Journal of Clinical and Diagnostic Research*, v. 8, n. 4, p. 17–

19, 2014.

AUTON, A. *et al.* A global reference for human genetic variation. *Nature*, v. 526, n. 7571, p. 68–74, 2015.

BALDWIN, C. T. *et al.* Mutations in PAX3 that cause Waardenburg syndrome type I: Ten new mutations and review of the literature. *American Journal of Medical Genetics*, v. 58, n. 2, p. 115–122, 1995.

BAMSHAD, M. J. *et al.* Exome sequencing as a tool for Mendelian disease gene discovery. *Nature Reviews Genetics*, v. 12, n. 11, p. 745–755, 2011.

BESNARD, T. *et al.* Experience of targeted Usher exome sequencing as a clinical test. *Molecular genetics & genomic medicine*, v. 2, n. 1, p. 30–43, 2014.

BITNER-GLINDZICZ, M. Hereditary deafness and phenotyping in humans. *British Medical Bulletin*, v. 63, p. 73–94, 2002.

BONDURAND, N. *et al.* Alu-mediated deletion of SOX10 regulatory elements in Waardenburg syndrome type 4. *European Journal of Human Genetics*, v. 20, n. November 2011, p. 990–994, 2012.

BONNET, C. *et al.* An innovative strategy for the molecular diagnosis of Usher syndrome identifies causal biallelic mutations in 93% of European patients. *European journal of human genetics : EJHG*, n. February, p. 1–9, 2016.

CHANG, E. *et al.* Branchio-Oto-Renal syndrome: The mutation spectrum in EYA1 and its phenotypic consequences. *Human Mutation* 23.6:582-589.2004.

CHEN, Y. *et al.* Targeted Next-Generation Sequencing in Uyghur Families with Non-Syndromic Sensorineural Hearing Loss. *Plos One*, v. 10, n. 5, p. e0127879, 2015.

CHOI, B. Y. *et al.* Diagnostic Application of Targeted Resequencing for Familial Nonsyndromic Hearing Loss. *PLoS ONE*, v. 8, n. 8, p. e68692, 2013.

CHUN, S.; FAY, J. C. Identification of deleterious mutations within three human genomes. *Identification of deleterious mutations within three human genomes.*, v. 19, n. 9, p. 1553–1561, 2009.

COOPER, G. M. *et al.* Distribution and intensity of constraint in mammalian genomic

sequence. *Genome Research*, v. 15, n. 7, p. 901–913, 2005.

CORNISH, A.; GUDA, C. A comparison of Variant Calling Pipelines using Genome in a Blot as a Reference. *BioMed Research International*, 11, 2015.

DA SILVA-COSTA, S. M. *et al.* Searching for digenic inheritance in deaf Brazilian individuals using the multiplex ligation-dependent probe amplification technique. *Genetic testing and molecular biomarkers*, v. 15, n. 12, p. 849–53, 2011.

DAD, S. *et al.* Usher syndrome in Denmark: mutation spectrum and some clinical observations. *Molecular Genetics & Genomic Medicine*, v. 4, n. 5, p. 527–539, 2016.

DAI, J. *et al.* Tcof1-Related Molecular Networks in Treacher Collins Syndrome. *Journal of Craniofacial Surgery*, v. 27, n. 6, p. 1420–1426, 2016.

DAUWERSE, J. G. *et al.* Mutations in genes encoding subunits of RNA polymerases I and III cause Treacher Collins syndrome. *Nature genetics*, v. 43, n. 1, p. 20–22, 2011.

DAVIDE, B. *et al.* Oculo-auriculo-vertebral spectrum: Going beyond the first and second pharyngeal arch involvement. *Neuroradiology*, v. 57, n. 1, p. S105, 2017.

DEL CASTILLO, F. J. *et al.* 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. *J Med Genet*, v. 42, n. 7, p. 588–594, 2005.

YAN, D.; LIU, X. Genetics and pathological mechanisms of Usher syndrome. *Journal of Human Genetics*, v. 55, n. 6, p. 327–335, 2010.

DEPRISTO, M. A. *et al.* A framework for variation discovery and genotyping using next-generation DNA sequencing data. *Nature genetics*, v. 43, n. 5, p. 491–8, 2011.

DOS SANTOS, P. A. C. *et al.* Non-overlapping 22q11.2 microdeletions in patients with oculo-auriculo-vertebral spectrum. *American Journal of Medical Genetics, Part A*, v. 164, n. 2, p. 551–553, 2014.

DOUCETTE, L. *et al.* Profound, prelingual nonsyndromic deafness maps to chromosome 10q21 and is caused by a novel missense mutation in the Usher syndrome type IF gene PCDH15. *European journal of human genetics : EJHG*, v. 17, n. 5, p. 554–564, 2009.

DOURMISHEV, A. L. *et al.* Waardenburg syndrome. *International Journal of*

*Dermatology*, v. 38, p. 656–663, 1999.

DROR, A. A.; AVRAHAM, K. B. Hearing Impairment: A Panoply of Genes and Functions. *Neuron*, v. 68, n. 2, p. 293–308, 2010.

EBERMANN, I. *et al.* PDZD7 is a modifier of retinal disease and a contributor to digenic Usher syndrome. *Journal of Clinical Investigation*, v. 120, n. 6, p. 1812–1823, 2010.

FALAH, N. *et al.* 22q11.2q13 duplication including *SOX10* causes sex-reversal and peripheral demyelinating neuropathy, central dysmyelinating leukodystrophy, Waardenburg syndrome, and Hirschsprung disease. *American Journal of Medical Genetics Part A*, v. 173, n. 4, p. 1066–1070, 2017.

FRISCHMEYER, P. A., and DIETZ, H. C. "Nonsense-mediated mRNA decay in health and disease." *Human molecular genetics* 8.10: 1893-1900. 1999.

FU, W. *et al.* Analysis of 6,515 exomes reveals a recent origin of most human protein-coding variants. v. 493, n. 7431, p. 216–220, 2013.

GILISSEN, C. *et al.* Genome sequencing identifies major causes of severe intellectual disability. *Nature*, v. 511, n. 7509, p. 344–347, 2014.

GU, X. *et al.* Genetic testing for sporadic hearing loss using targeted massively parallel identifies 10 novel mutations. *Clin Genetic*. 87:588-593.2015.

GULKO, B. *et al.* A method for calculating probabilities of fitness consequences for point mutations across the human genome. *Nature Publishing Group*, v. 47, n. 3, p. 276–283, 2015.

HAER-WIGMAN, L. *et al.* Non-syndromic retinitis pigmentosa due to mutations in the mucopolysaccharidosis type IIIC gene, heparan-alpha-glucosaminide N-acetyltransferase (HGSNAT). *Human molecular genetics* ddv118. 2015.

HEISSLER, S. M.; MANSTEIN, D. J. Functional characterization of the human myosin-7a motor domain. *Cellular and Molecular Life Sciences*, v. 69, n. 2, p. 299–311, 2012.

HIGHNAM, G. *et al.* An analytical framework for optimizing variant discovery from personal genomes. *Nat Commun* 6,6275. 2015.

HOLBROOK, J.A. *et al.* Nonsense-mediated decay approaches the clinic, *Nat. Genet.* 36

801–808,2004.

HOMER, N., LYONS, M. AND M. SHAH. "Torrent Mapping Alignment Program." San Francisco, CA 726, 2014.

HUANG, X.-F. *et al.* Targeted Exome Sequencing Identified Novel USH2A Mutations in Usher Syndrome Families. *PLoS ONE*, v. 8, n. 5, p. e63832, 2013.

HUSU, E. *et al.* Phenotype in 18 Danish subjects with genetically verified CHARGE syndrome. *Clinical Genetics*, v. 83, n. 2, p. 125–134, 2013.

HWANG, S. *et al.* Systematic comparison of variant calling pipelines using gold standart personal exome variants. *Scientific reports* 5:17875. 2015.

IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Cartilha do Censo de 2010 - Pessoas com deficiência. 2012.

JACOBSON, S. G. *et al.* Usher syndromes due to MYO7A, PCDH15, USH2A or GPR98 mutations share retinal disease mechanism. *Human Molecular Genetics*, v. 17, n. 15, p. 2405–2415, 2008.

JAIJO, T. *et al.* Mutation screening of the PCDH15 gene in Spanish patients with Usher syndrome type I. *Molecular Vision*, v. 18, p. 1719–1726, 2012.

JANSSEN, N. *et al.* Mutation update on the CHD7 gene involved in CHARGE syndrome. *Human Mutation*, v. 33, n. 8, p. 1149–1160, 2012.

JECMENICA, J.; BAJEC-OPANCINA, A. Branchiootorenal and Branchiooculofacial Syndrome. *Journal of Craniofacial Surgery*, v. 26, n. 1, p. e30–e31, 2015.

JOENSUU, T. *et al.* Mutations in a novel gene with transmembrane domains underlie Usher syndrome type 3. *A. J. Hum. Genet.* 69 :673-684.2001.

JONGMANS, M. C. J. *et al.* CHARGE syndrome: the phenotypic spectrum of mutations in the CHD7 gene. *Journal of medical genetics*, v. 43, n. 4, p. 306–14, 2006.

KADAKIA, S. *et al.* Treacher Collins Syndrome : The genetics of a craniofacial disease. *International Journal of Pediatric Otorhinolaryngology*, p. 1–6, 2014.

KATSANIS, S.; JABS, E. *Treacher Collins Syndrome*.2004. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1532/>>. Acesso em: 6 maio 2017.

KIM, H. et al. "Pax3 function is required specifically for inner ear structures with melanogenic fates." *Biochemical and biophysical research communications* 445.3 (2014): 608-614.

KIRCHER, M. *et al.* A general framework for estimating the relative pathogenicity of human genetic variants. *Nat Genet*, v. 46, n. 3, p. 310–315, 2014.

KOFFLER, T.; USHAKOV, K.; AVRAHAM, K. B. Genetics of Hearing Loss – Syndromic. v. 8, n. 5, p. 583–592, 2016.

KRAWITZ, P. M. *et al.* Screening for single nucleotide variants, small indels and exon deletions with a next-generation sequencing based gene panel approach for Usher syndrome. *Molecular genetics & genomic medicine*, v. 2, n. 5, p. 393–401, 2014.

KUMAR, P.; HENIKOFF, S.; NG, P. C. Predicting the effects of coding non-synonymous variants on protein function using the SIFT algorithm. *Nature protocols*, v. 4, n. 7, p. 1073–1081, 2009.

LALANI, S. R. *et al.* CHD7 Mutations in CHARGE Syndrome Spectrum of CHD7 Mutations in 110 Individuals with CHARGE Syndrome and Genotype-Phenotype Correlation. *Am. J. Hum. Genet*, v. 78, p. 303–314, 2006.

LALANI, S. R. *et al.* SEMA3E mutation in a patient with CHARGE syndrome. *Journal of Medical Genetics*, v. 41, n. 7, p. e94–e94, 2004.

LE QUESNE STABEJ, P. *et al.* Comprehensive sequence analysis of nine Usher syndrome genes in the UK National Collaborative Usher Study. *Journal of medical genetics*, v. 49, n. 1, p. 27–36, 2012.

LEK, M. *et al.* Analysis of protein-coding genetic variation in 60,706 humans. *Nature* 536.7616 (2016): 285-291.

LENASSI, E. *et al.* A detailed clinical and molecular survey of subjects with nonsyndromic USH2A retinopathy reveals an allelic hierarchy of disease-causing variants. *European journal of human genetics : EJHG*, v. 23, n. 10, p. 1318–27, 2015.

LENTZ, J.; KEATS, B. *Usher Syndrome Type I*. 2016. Disponível em: <[www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20301442](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20301442)>. Acesso em: 5 maio 2017.

LI, H. A statistical framework for SNP calling, mutation discovery, association mapping

and population genetical parameter estimation from sequencing data. *Bioinformatics*, v. 27, n. 21, p. 2987–2993, 2011.

LIU, X.; JIAN, X.; BOERWINKLE, E. dbNSFP: A lightweight database of human nonsynonymous SNPs and their functional predictions. *Human Mutation*, v. 32, n. 8, p. 894–899, 2011.

LOPEZ, E. *et al.* Mutation in MYT1, encoding the myelin transcription factor 1, are a rare cause of OAVS. *J. Med. Genet.* 2016.

MARLIN, S. *et al.* Connexin 26 gene mutations in congenitally deaf children: pitfalls for genetic counseling. *Archives of Otolaryngology–Head & Neck Surgery* 127.8: 927-933, 2001.

MCKENNA, A. *et al.* The Genome Analysis Toolkit: A MapReduce framework for analyzing next-generation DNA sequencing data. *Genome Res.*, v. 20, p. 1297–1303, 2010.

MEŞE, G. *et al.* Altered gating properties of functional Cx26 mutants associated with recessive non-syndromic hearing loss. *Human genetics*, v. 115, n. 3, p. 191–199, 2004.

MEŞE, G. *et al.* Connexin26 deafness associated mutations show altered permeability to large cationic molecules. *American journal of physiology. Cell physiology*, v. 295, n. 4, p. C966-74, 2008.

MIYAGAWA, M. *et al.* "Massively Parallel DNA sequencing successfully identifies new causative mutations in deafness genes with cochlear implantation and EAS." *Plos One* 8.10 .2013.

MORTON, C. C.; NANCE, W. E. Newborn Hearing Screening — A Silent Revolution. *New England Journal of Medicine*, v. 354, n. 20, p. 2151–2164, 2006.

MURPHY, R. *et al.* Clinical features, diagnosis and management of maternally inherited diabetes and deafness (MIDD) associated with the 3243A> G mitochondrial point mutation. *Diabetic Medicine*, v. 25, n. 4, p. 383–399, 2008.

NANCE, W. E. The genetics of deafness. *Mental Retardation and Developmental Disabilities Research Reviews*, v. 9, n. 2, p. 109–119, 2003.

NG, S. B. *et al.* Targeted Capture and Massively Parallel Sequencing of twelve human

exomes. *Nature*, v. 461, n. 7261, p. 272–276, 2010.

NISHIO, S. *et al.* "Clinical application of a custom Ampliseq library and Ion Torrent PGM sequencing to comprehensive mutation screening for deafness genes." *Genetic testing and molecular biomarkers* .19.4: 209-217 (2015).

OMS. WHO | Deafness and hearing loss. Disponível em: <[www.who.int/mediacentre/factsheets/fs300/en/](http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs300/en/)>. Acesso em: 6 maio 2017.

PINGAULT, V. *et al.* Review and update of mutations causing Waardenburg syndrome. *Human Mutation*, v. 31, n. 4, p. 391–406, 2010.

REHM, H. L. *et al.* "ACMG clinical laboratory standards for next-generation sequencing." *Genetics in Medicine* 15.9:733-747,2013.

RICHARDS, S. *et al.* Standards and Guidelines for the Interpretation of Sequence Variants: A Joint Consensus Recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology. v. 17, n. 5, p. 405–424, 2015.

RIVOLTA, C. *et al.* Report Missense Mutation in the USH2A Gene: Association with Recessive Retinitis Pigmentosa without Hearing Loss. *Am. J. Hum. Genet*, v. 66, p. 1975–1978, 2000.

SAKATA, H. A.. Proposta de genes relacionados à deficiência auditiva sindrômica baseada em Variações do Número de Cópias (CNVs) e Perda de Heterozigose (LOH). 2016. 71 f., il. Dissertação (Mestrado em Biologia Animal)—Universidade de Brasília, Brasília, 2016.

SANLAVILLE, D.; VERLOES, A. CHARGE syndrome: An update. *European Journal of Human Genetics*, v. 15, n. 4, p. 389–399, 2007.

SCHWARZ, J. M. *et al.* MutationTaster evaluates disease-causing potential of sequence alterations. *Nature methods*, v. 7, n. 8, p. 575–576, 2010.

SHEARER, A. E.; SMITH, R. J. H. 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*, v. 153, n. 2, p. 175–182, 2015.

SHEARER, A. E. *et al.* Advancing genetic testing for deafness with genomic technology. *Journal of Medical Genetics*, v. 50, n. 9, p. 627–634, 2013.

SHEARER, A. E. *et al.* 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. *et al.* Utilizing ethnic-specific differences in minor allele frequency to recategorize reported deafness pathogenic variants. *The American Journal of Human Genetics*.95.4:445-453. 2014.

SHERRY, S. T. *et al.* dbSNP: the NCBI database of genetic variation. *Nucleic acids research*, v. 29, n. 1, p. 308–311, 2001.

SHI, Y. *et al.* A novel mutation of the MITF gene in a family with Waardenburg syndrome type 2: A case report. *Experimental and Therapeutic Medicine*, p. 1516–1518, 2016.

SHIHAB, H. A. *et al.* An integrative approach to predicting the functional effects of non-coding and coding sequence variation. *Bioinformatics (Oxford, England)*, v. 31, n. January, p. 1536–1543, 2015.

SHIHAB, H. A. *et al.* Predicting the Functional, Molecular, and Phenotypic Consequences of Amino Acid Substitutions using Hidden Markov Models. *Human Mutation*, v. 34, n. 1, p. 57–65, 2013.

SIEPEL, A. *et al.* "Evolutionarily conserved elements in vertebrate, insect, worm, and yeast genomes." *Genome research* 15.8: 1034-1050. 2005.

SIEPEL A. and HAUSSLER D. Combining phylogenetic and hidden Markov models in biosequence analysis. Proc. 7th Int'l Conf. on Research in Computational Molecular Biology (RECOMB '03), pp. 277-286, 2003

SILVERTHORN. *Dee Unglaub Silverthorn - Fisiologia Humana - Uma Abordagem Integrada, 5ª Edição (Artmed).pdf.*, 2010.

SLOAN-HEGGEN, C. M. *et al.* 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. *et al.* *Deafness and Hereditary Hearing Loss Overview*. 1999. Disponível em: <[www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20301607](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20301607)>. Acesso em: 6 maio 2017.

SO, R. *et al.* Another face of the Treacher Collins syndrome (TCOF1) gene: identification of additional exons. *Gene*. 328: 49-57. 2004.

SOHN, Y. B. *et al.* Cerebellar vermis hypoplasia in CHARGE syndrome: clinical and molecular characterization of 18 unrelated Korean patients. *Journal of human genetics*, v. 61, n. 3, p. 235–9, 2016.

SONG, J. *et al.* Hearing loss in Waardenburg syndrome: a systematic review. v. 2, n. 14, p. 1–10, 2015.

SONG, M. H. *et al.* Mutational Analysis of EYA1 , SIX1 and SIX5 Genes and Strategies for Management of Hearing Loss in Patients with BOR / BO Syndrome. v. 8, n. 6, 2013.

SOTOMAYOR, M. *et al.* NIH Public Access. *October*, v. 66, n. 1, p. 85–100, 2010.

SPLENDORE, A. *et al.* High mutation detection rate in TCOF1 among Treacher Collins syndrome patients reveals clustering of mutations and 16 novel pathogenic changes. *Human Mutation*, v. 16, n. 4, p. 315–322, 2000.

SPLENDORE, A. *et al.* TCOF1 mutation database: Novel mutation in the alternatively spliced exon 6A and update in mutation nomenclature. *Human Mutation*, v. 25, n. 5, p. 429–434, 2005.

GERBER, S. *et al* *USH1A: Chronicle of a Slow Death*. *Am. J. Hum. Genet.*, 2006.

TASSE, C. *et al.* "A family with autosomal dominant oculo-auriculo-vertebral spectrum." *Clinical dysmorphology* 16.1: 1-7. 2007

TEKIN, D. *et al.* Comprehensive genetic testing can save lives in hereditary hearing loss. *Clinical Genetics*, v. 87, n. 2, p. 190–191, 2015.

TOMS, M. *et al.* Usher syndrome: a review of the clinical phenotype, genes and therapeutic strategies. *Expert Review of Ophthalmology*, v. 10, n. 3, p. 241–256, 2015.

TRAINOR, P. A; ANDREWS, B. T. Facial dysostoses: Etiology, pathogenesis and management. *American journal of medical genetics. Part C, Seminars in medical genetics*, v. 163C, n. 4, p. 283–94, 2013.

VAN CAMP, G.; SMITH, R. *Hereditary Hearing Loss - Hereditary Hearing loss Homepage*. Disponível em: <<http://hereditaryhearingloss.org/>>. Acesso em: 5 maio 2017.

VAN DER AUWERA, G. A. *et al.* From fastQ data to high-confidence variant calls: The genome analysis toolkit best practices pipeline., 2013.

VERPY, E. *et al.* A defect in harmonin, a PDZ domain-containing protein expressed in the inner ear sensory hair cells, underlies Usher syndrome type 1C. *Nature genetics*, v. 26, n. 1, p. 51–5, 2000.

VOZZI, D. *et al.* Hereditary Hearing Loss: a 96 gene targeted sequencing protocol reveals novel alleles in a series of Italian and Qatari patients. *Gene* 542.2:209-216.2014.

WANG, K.; LI, M.; HAKONARSON, H. ANNOVAR: functional annotation of genetic variants from high-throughput sequencing data. *Nucleic acids research*, v. 38, n. 16, p. e164, 2010.

WARR, A. *et al.* Exome Sequencing: Current and Future Perspectives. *G3 (Bethesda, Md.)*, v. 5, n. August, p. g3.115.018564-, 2015.

WESTON, M. D. *et al.* Myosin VIIA Mutation Screening in 189 Usher Syndrome Type 1 Patients. *Am. J. Hum. Genet*, v. 59, p. 1074–1083, 1996.

XIONG, H. Y. *et al.* The human splicing code reveals new insights into the genetic determinants of disease. *Science*, v. 347, n. 6218, p. 1254806, 2014.

YAN, D. *et al.* Spectrum of DNA variants for non - syndromic deafness in a large cohort from multiple continents. *Human Genetics*, 2016.

YORGASON, J.; FAYAD, J.; KALINEC, F. Understanding drug ototoxicity: molecular insights for prevention and clinical management. *Expert opinion on drug safety*, v. 5, n. 3, p. 383–399, 2006.

ZENTNER, G. E. *et al.* Molecular and Phenotypic aspects of CDH7 mutation in CHARGE syndrome. *American Journal of Medical Genetics*, n. 3, p. 674–686, 2011.

## APÊNDICE 2

**Tabela A-2.** Dados pessoais e clínicos relativos aos pacientes recrutados para o estudo. ID: identificação; DN: mês de nascimento; DC: diagnóstico clínico; HF: História familiar; SN: surdez neurosensorial; SM: surdez mista; SC: surdez condutiva; DNPM: desenvolvimento neuro-psico-motor; MIE: membro inferior esquerdo; MID: membro inferior direito; JUP: junção uretero-pélvica.

ID	Sexo	DN	DC (Síndrome)	HF	Sinais Clínicos				
					Auditivas	Visuais	Atraso DNPM	Craniofaciais	Outras
P1	M	set/99	--	Não	SN bilateral pós-lingual	-	+	Microcefalia, Malformação Dentária	Baixa estatura; Encefalopatia Espástica Bilateral, MIE>MID
P2	F	jan/11	Goldenhar	Não	SM pré- lingual unilateral moderada	Dermóide epibulbar; Miopia	-	Atresia aural	Vitiligo
P3	M	jun/04	--	Não	SM assimétrica	-	+	-	Úvula bifida; constipação intestinal crônica, 5º quilodáctilos diminuídos; pés com sindactilia cutânea, Criptorquidia.
P4	M	dez/92	--	Sim	SN unilateral pós-lingual moderada	Catarata	+	Dismorfias	Microalbuminúria, Estenose do JUP

P5	F	dez/92	--	Sim	SN pós-lingual progressiva bilateral	Miopia	-	-	Amenorréia secundária, lipodistrofia, leucodistrofia, hipertrigliceridemia, diabetes tipo II, dores abdominais intensas, caquexia
P6	F	nov/77	--	Sim	SC bilateral pós-lingual	-	+	Microcefalia, Dismorfias	-
P7	M	jun/02	--	Não	SN bilateral moderada	-	+	Macrocrania	-
P8	M	jan/10	Goldenhar	Não	SM	-	+	Microtia bilateral	Hipertelorismo; agenesia parcial do sacro, Ectopia renal cruzada, Micropênis
P9	F	mar/86	Waardenburg	Não	SN assimétrica	Íris azulada	-	-	Hipertelorismo, Manchas hipocrômicas
P10	M	dez/98	Treacher Collins	Não	SC	Dermóide Epibulbar	-	Assimetria facial, fenda palatina, microtia bilateral	Olhos no sentido antimongolólico
P11	F	-	Wardenburg	Sim	-	-	-	-	Telecanto; sinofre, Encanecimento precoce; heterocromia cutânea facial, epilepsia, câncer aos 40 anos
P12	M	jun/12	Treacher Collins	Não	SC bilateral	-	-	hipoplasia zigótica, microtia, fenda palatina	
P13	M	Jan/10	BOR	Sim	SN bilateral severa	-	-	Hipoplasia de cartilagem auricular bilateral	Rim direito não caracterizado, dilatação pielocalicial em rim esquerdo
P14	M	mar/09	BOR	Não	SN	-	-	“pits” auriculares	Apêndices cervicais

					unilateral severa					
P15	F	nov/71	Usher tipo III	Sim	SN	Retinite	-	Assimetria facial		Sindactilia cutânea
					bilateral pós-lingual progressiva	pigmentosa bilateral				
P16	F	nov/95	Usher	Não	SN	Retinite	+	-		Prognatismo discreto
					bilateral severa	pigmentosa				
P17	F	jan/16	CHARGE	Não	SC		-	Retrognatia; microtia à direita; palato alto e estreito		Atresia de coanas; comunicação interventricular apical, Malformação nas mãos
					bilateral assimétrica					
P18	F	nov/08	CHARGE	Não	SC	Coloboma	-	Orelhas em taça		Hipertelorismo; paralisia facial a esquerda; persistencia de canal arterial, Hipoplasia
					bilateral severa	de nervo óptico				
P19	M	Jun/68	BOR	Sim	SN	-	-	Fístulas em pescoço e orelhas		-
					progressiva bilateral					
P20	F	Out/82	Usher	Sim	SN	Retinite	-	-		Hipogonadismo hipogonadotrófico
					bilateral progressiva pós-lingual	pigmentosa e catarata				
P21	M	Jan/64	Usher	Não	SN pré- lingual	Retinite	-	-		Hérnia umbilical
						pigmentosa, miopia e				

						catarata unilateral				
P22	M	Set/78	Usher	Não	SN perilingual progressiva	Retinite pigmentosa	-	-	-	
P23	M	Jun/08	Usher	Não	SN pré- lingual progressiva	-	-	-	-	
P24	F	Mai/12	Waardenburg tipo IV	Não	SN pré- lingual	-	-	-		Aganglionose congênita do cólon, diabetes gestacional, hipomímia facial, boca em carpa, hipotonia muscular, hiporreflexia, alterações de motricidade ocular
P25	M	Set/86	Usher	Não	SN pré- lingual	Retinite pigmentosa	-	-	-	
P26	F	Mar/09	BOR	Não	SN bilateral severa- profunda	-	-	-		Apêndice cervical?
P27	M	Nov/14	--	Não	SC	-	-	-		Hipospádia, testículos retráteis, forame oval patente

## ANEXO 1 – PROTOCOLO DE EXTRAÇÃO DE DNA

### Protocolo de extração de DNA adaptado (método *Genra Purigene Blood kit*)

#### Soluções

- 1) Solução de lise RBC

5mM MgCl<sub>2</sub> + 1mM EDTA (pH 8,0)

- 2) Solução de lise celular (CLS)

10mM *Tris* (pH 7,5) + 1mM EDTA (pH 8,0) + SDS 1%

- 3) Solução de precipitação de proteínas

7,5M NH<sub>4</sub>Ac

#### Etapa 1. Lise celular

1. Verter 3mL de sangue total em tubo *falcon* (15mL) contendo 9mL de tampão RBC. Inverter o tubo e incubar a temperatura ambiente por 10 minutos. Inverter o tubo durante o período de incubação;
2. Centrifugar por 10 minutos a 3.400rpm (2.000g). Remover o sobrenadante deixando um pélete de células brancas visível e cerca de 100 a 200 µL de líquido residual;
3. Vortexar o tubo vigorosamente para ressuspender as células brancas no líquido residual. Esse processo favorece a lise celular na etapa seguinte;
4. Adicionar 3mL da solução de lise celular (CLS) ao tubo contendo as células ressuspendidas e misturar com pipeta de transferência diversas vezes até alcançar uma solução homogênea. Ao fim dessa etapa nenhum resíduo celular deve ser visível. Se necessário, incubar a 37°C até que a solução esteja homogênea.

#### Etapa 2. Precipitação de proteínas

1. Resfriar a amostra até a temperatura ambiente;
2. Adicionar 1mL da solução de precipitação de proteínas ao lisado celular;

3. Vortexar vigorosamente por 20 segundos para obter uma solução uniforme;
4. Centrifugar a 3.400rpm por 10 minutos. As proteínas precipitadas formarão um pélete compacto marrom escuro.

### **Etapa 3. Precipitação do DNA**

1. Transferir o sobrenadante contendo o DNA para um tubo *falcon* de 15mL com 3mL de isopropanol 100%;
2. Inverter o tubo lentamente cerca de 50 vezes até que o DNA seja visível (observar a formação de estruturas que lembram novelos de linha);
3. Centrifugar a 3.400 rpm por 3 minutos, o DNA será visível como um pélete branco e pequeno;
4. Retirar o sobrenadante e drenar o resíduo líquido com papel absorvente. Adicionar 3mL de etanol 70%. Inverter o tubo para retirar resíduos que possam estar ligados ao pélete;
5. Centrifugar a 3.400rpm por 1 minuto. Retirar o sobrenadante cuidadosamente, pois o pélete pode estar solto;
6. Drenar o tubo em papel absorvente e deixar o álcool evaporar por 15 minutos em temperatura ambiente

### **Etapa 4. Hidratação do DNA**

1. Adicionar de 200 a 250  $\mu$ L de tampão TE 1x (ou água mili-Q). Deixar o DNA hidratar no tampão por 12 a 24 horas em temperatura ambiente ou incubar a 65°C por 1 hora;
2. Armazenar o DNA a 2 a 8°C.

## ANEXO 2- PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA



### PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

#### DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

**Título da Pesquisa:** Desenvolvimento de painel diagnóstico baseado em sequenciamento de exons para surdez síndrômica

**Pesquisador:** Silviene Fabiana de Oliveira

**Área Temática:** Genética Humana:  
(Trata-se de pesquisa envolvendo Genética Humana que não necessita de análise ética por parte da CONEP);

**Versão:** 4

**CAAE:** 30441114.8.0000.0030

**Instituição Proponente:** Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade de Brasília

**Patrocinador Principal:** Financiamento Próprio

#### DADOS DO PARECER

**Número do Parecer:** 1.312.729

#### Situação do Parecer:

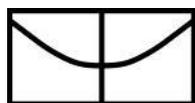
Aprovado

#### Necessita Apreciação da CONEP:

Não

**Endereço:** Faculdade de Ciências da Saúde - Campus Darcy Ribeiro  
**Bairro:** Asa Norte **CEP:** 70.910-900  
**UF:** DF **Município:** BRASÍLIA  
**Telefone:** (61)3107-1947 **E-mail:** cepfsunb@gmail.com

**ANEXO 3 - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO –  
TCLE**



**Universidade de Brasília**

---

*Desenvolvimento de um painel diagnóstico baseado em sequenciamento de exons para surdez síndrômica*

---

**Termo de Consentimento Livre e Esclarecido – TCLE**

O (A) Senhor (a) está sendo convidado a participar do projeto: “Desenvolvimento de um painel diagnóstico para surdez síndrômica”

O objetivo desta pesquisa é desenvolver um painel diagnóstico por meio do exoma direcionado para investigação de surdez síndrômica.

O (A) Senhor (a) receberá todos os esclarecimentos necessários antes e no decorrer da pesquisa e lhe asseguramos que seu nome não aparecerá, sendo mantido o mais rigoroso sigilo através da omissão total de quaisquer informações que permitam identificá-lo (a).

A sua participação ocorrerá por meio da realização de exames laboratoriais. Os exames serão realizados a partir da coleta de sangue para extração de DNA. O procedimento de coleta de sangue por punção venosa será realizado com material estéril descartável de boa qualidade por profissional habilitado, podendo ocasionar um pouco de dor e formação de hematoma no local.

É possível que o senhor (a) venha a se beneficiar dos resultados deste projeto, a partir dos resultados dos exames laboratoriais de forma a identificar os genes relacionados a sua condição, permitindo precisão no seu acompanhamento e de seus familiares, desde que consentido pelo senhor(a).

Informamos que o Senhor (a) poderá se recusar a responder qualquer questão (ou participar de qualquer procedimento) que lhe traga constrangimento, podendo desistir de participar da pesquisa em qualquer momento sem nenhum prejuízo para o (a)

senhor(a) e nenhum comprometimento em seu acompanhamento médico. Sua participação é voluntária, isto é, não há qualquer tipo de pagamento por sua colaboração. Caso solicite e mediante comprovação, o senhor(a) poderá ser ressarcido(a) pelos gastos com deslocamento e alimentação devido à participação nessa pesquisa. Além disso, será garantido atendimento imediato e /ou indenização diante de eventuais danos **comprovadamente** decorrentes dessa pesquisa, vistas as medidas administrativas e judiciais cabíveis.

Os resultados da pesquisa serão divulgados na Universidade de Brasília, podendo ser publicados posteriormente. Os dados e materiais utilizados na pesquisa ficarão sobre a guarda do pesquisador.

Solicitamos também sua autorização para armazenamento de sua amostra biológica de sangue para possíveis outros estudos futuros em biorrepositório no Laboratório de Genética da Universidade de Brasília. A amostra apresentará uma codificação alfanumérica e só poderá ser manuseada pelos indivíduos diretamente relacionados com o projeto.

Se o (a) Senhor (a) tiver qualquer dúvida em relação à pesquisa, por favor telefone para: Dra. Silviene Fabiana de Oliveira, na Universidade de Brasília, telefone: (61) 3107-3079, em horário comercial ou Harumy Andrade Sakata, telefone: (61) 9265-0437 em horário comercial.

Este projeto foi Aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade de Brasília. As dúvidas com relação à assinatura do TCLE ou os direitos do sujeito da pesquisa podem ser obtidos através do telefone: (61) 3107-1947.

Este documento foi elaborado em duas vias, uma ficará com o pesquisador responsável e a outra com o sujeito da pesquisa.

Estou assinando em meu nome.

Estou assinando em nome do meu dependente legal.

Se você estiver de acordo, por favor, assine esta folha.

---

Nome / assinatura do voluntário ou responsável legal

---

Silviene Fabiana de Oliveira

\_\_\_\_\_, \_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_

Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos – Faculdade de Ciências da Saúde

Universidade de Brasília<sup>[SEP]</sup> Campus Universitário Darcy Ribeiro – Brasília/DF<sup>[SEP]</sup>

Tel: (61) 3107-1947/ (61) 8334-8973/ (63) 8114-1174

