



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

HARUMY ANDRADE SAKATA

Proposta de genes relacionados à deficiência auditiva sindrômica
baseada em variações do número de cópias (CNVs) e perda de
heterozigose (LOH)

Orientadora: Profa. Dra. Silviene Fabiana de Oliveira

Brasília
2016

HARUMY ANDRADE SAKATA

Proposta de genes relacionados à deficiência auditiva sindrômica baseada em variações de número de cópias (CNVs) e perda de heterozigose (LOH)

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
2016

HARUMY ANDRADE SAKATA

Proposta de genes relacionados à deficiência auditiva sindrômica baseada em variações de número de cópias (CNVs) e perda de heterozigose (LOH)

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.

BANCA EXAMINADORA

Dra. Silviene Fabiana de Oliveira (Presidente)

Universidade de Brasília (UnB)

Dra. Daniela de Melo e Silva

Universidade Federal de Goiás (UFG)

Dra. Beatriz Dolabela de Lima

Universidade de Brasília (UnB)

Dra. Maria de Fátima Menezes Almeida Santos

Universidade de Brasília (UnB)

AGRADECIMENTOS

À Universidade de Brasília e ao Programa de Pós Graduação em Biologia Animal pela infraestrutura e oportunidade de realizar esse mestrado.

À minha prezada orientadora Dra. Silviene Fabiana de Oliveira pela oportunidade, compreensão e confiança. Sou muito grata por todo o conhecimento e amizade compartilhados nesse período.

À Dra. Juliana Forte Mazzeu de Araújo pela coorientação/ adoção desde o início do projeto. Agradeço toda a atenção, paciência, cooperação e amizade.

À Dra. Maria Nazaré Klautau Guimarães e à Dra. Aline Pic-Taylor pelo incentivo e exemplo profissional.

Ao técnico do Laboratório de Genética e amigo Raphael Severino Bonadio pela valiosa contribuição para o desenvolvimento desse trabalho.

Aos alunos do Laboratório de Genética Humana pelo companheirismo e momentos de descontração.

À Yasmim Lima pela troca de experiência e parceria nesse projeto.

Às mestres Mariana Marzullo e Marcela Motta pelo incentivo, compreensão, gargalhadas e amizade.

Às doutorandas Ana Carolina Arcanjo, Rafaela De Cezare Parmezan Toledo e Sabrina Guimarães Paiva por todo o conhecimento compartilhado, pelas boas conversas e risadas.

Aos meus inestimáveis amigos e revisores Raphael Teixeira Correa, Jéssica Antunes, Isabela Lopes e Dra. Pollyanna Almeida Costa dos Santos pelas bem-vindas contribuições.

Aos colegas do Laboratório de Genética da Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade de Brasília conduzido pela Dra. Iris Ferrari, pela fundamental cooperação.

Às médicas do ambulatório de genética clínica do Hospital Universitário de Brasília, Dra. Mara dos Santos Córdoba, Dra. Beatriz Ribeiro Versiani e Dra. Rosenelle Benício por realizarem toda avaliação clínica dos pacientes, pela paciência e disposição.

Aos professores e funcionários da Universidade de Brasília. Em especial à Dra. Lourdes Izabel Velho do Amaral (em memória) minha querida orientadora que me ensinou pessoalmente os primeiros passos dentro do laboratório de pesquisa, mas que me mostrou que o mais importante está fora dele.

Aos pacientes e seus responsáveis por gentilmente aceitarem participar desse estudo.

Às agencias de fomento CAPES pela bolsa oferecida durante esse mestrado; CNPq e FAPDF pelos financiamentos que permitiram a realização dos experimentos.

À minha família, amigos e namorado pelo apoio emocional e por aguardarem pacientemente o “depois do mestrado” (depois do mestrado eu faço, depois do mestrado eu vou, eu prometo que depois do mestrado...).

Em especial à minha mãe Maria Bernadete Costa Andrade e ao meu pai Oscar Yukio Sakata por se esforçarem para que eu tivesse a melhor formação possível, mas que me ensinaram valores mais importantes que qualquer diploma.

Por fim gostaria de agradecer a Deus, pois essa é a gratidão que busco trabalhar todos os dias e hoje não seria diferente.

Obrigada!

RESUMO

A deficiência auditiva é a dificuldade em perceber e ou interpretar o som e afeta 5 a cada 100 pessoas ao redor do mundo e pode ser causada por fatores ambientais ou genéticos. A perda auditiva de origem genética pode ser classificada de diversas maneiras, dentre elas como síndrômica, visto que apresenta outras características além da surdez. A deficiência auditiva síndrômica frequentemente apresenta quadros complexos e de difícil diagnóstico com base em observações clínicas. Muitas das mais de 400 síndromes descritas não possuem causa genética bem estabelecida e o diagnóstico molecular está frequentemente atrelado a uma suspeita diagnóstica clínica. Sabe-se que a presença de variações no número de cópias (CNVs), microduplicações ou microdeleções, está associada a várias síndromes. Diante do exposto, o objetivo principal desse trabalho foi investigar a ocorrência de microarranjos que possam auxiliar o entendimento da etiologia dos quadros clínicos investigados, de forma a contribuir com a compreensão da biologia da doença. Para isso, foram selecionados 16 indivíduos atendidos pelo serviço de genética clínica do Hospital Universitário de Brasília (HUB) com quadro de perda auditiva síndrômica e sem diagnóstico definido. Os materiais genéticos desses pacientes passaram por análise cromossômica por *microarray* (CMA). Em cinco casos (31,25%) foram observadas variações raras que potencialmente podem explicar os quadros apresentados, sendo um caso de perda de heterozigose e as demais CNVs. Em três desses casos, observou-se quatro alterações provavelmente patogênicas, uma duplicação em 1p36.32 e três deleções em 2q13, 10q11.22 e 10q26.2, que incluem genes relacionados ao desenvolvimento craniofacial, como o *FOXI2*, *PRDM16*, *TMEM87B* e *FBLN7*. As demais variações raras observadas indicaram genes já previamente associadas aos quadros dos pacientes, como o *ESRRB* e *RHOA*. Esses resultados mostram que a investigação genética da deficiência auditiva síndrômica por técnicas de microarranjos é efetiva, principalmente quando a anamnese clínica é inconclusiva para alguma síndrome, ou para tentar estabelecer um efeito genético causal à doença.

Palavras chaves: Deficiência auditiva, síndrome, variação do número de cópias, análise cromossômica por microarranjo.

ABSTRACT

Hearing loss is the difficulty in understanding and or interpret sound and affecting 5 in every 100 people around the world and may be caused by environmental or genetic factors. Hearing loss of genetic origin may be classified in various ways, among them as syndromic, since it presents other characteristics beyond deafness. The syndromic hearing loss often presents complex cases and a difficult diagnose based on clinical observations. Many from more than 400 syndromes described do not have well-established genetic causes and molecular diagnosis is often linked to a clinical diagnostic purpose. It is known that the presence of copy number variations (CNVs), microduplications ou microdeletions, is associated with several syndromes. Based on what was exposed, the main aim of this study was to investigate the microarrays occurrence that may help the understanding of the etiology of cases investigated in order to contribute to the knowledge of biology disease. Thus, we selected 16 patients treated by the clinical genetics service of the Hospital Universitário de Brasília (HUB) with syndromic hearing loss and without a defined diagnosis. The Genetical materials of these patients were tested by chromosomal microarray analysis. In 31.25% of cases, it was observed rare variations that could potentially explain the presented cases, being one case of loss of heterozygosity, and others by CNVs. In three of these cases, we observed probably four pathogenic changes, a duplication in 1p36.32 and three deletions in 10q11.22, 10q26.2 and 2q13, which include mainly genes related to craniofacial development, such as FOXI2, PRDM16, and TMEM87B FBLN7. Other rare variations observed indicated genes previously associated with patients features, such as ESRRB and RHOA. These results show that genetic research of syndromic hearing loss by microarrays techniques is effective, especially when the clinical anamnse is inconclusive for any syndrome, or to try to establish a genetic effect that can cause the disease.

Keywords: Hearing loss, syndrome, copy number variation, chromosome microarray analysis.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Desenho esquemático da estrutura da orelha. Evidencia-se em a. a organização das estruturas da orelha, em b. o interior da cóclea e em c. as células ciliadas presentes no órgão de Corti. Modificado de Dror e Avraham (2009)	15
Figura 2. Fluxograma dos critérios de seleção dos pacientes	25
Figura 3. Principais etapas envolvidas na CMA utilizando <i>CytoScan 750k array (Affymetrix)</i> . Em que * são géis de agarose para verificar a amplificação por PCR e posteriormente a fragmentação dos produtos da PCR. ** a leitura de cada chip leva aproximadamente 30 minutos. Modificado de <i>Affymetrix CytoScan assay protocol</i>	26
Figura 4. Perda de heterozigose observada em 3p21.31 da paciente DA4. Imagem gerada pelo <i>software ChAS (Affymetrix)</i> , onde a barra roxa representa a perda de heterozigose e as barras em cinza e em verde representam os genes presentes nessa alteração	34
Figura 5. Esquema simplificado da via WNT não canônica. Destaca-se os genes <i>WNT5</i> , <i>ROR2</i> e <i>DVL1</i> associados à síndrome de Robinow. O gene <i>RHOA</i> , observado nesse estudo está destacado em vermelho.....	35
Figura 6. Duplicação observada em 1p36.32 do paciente DA5. Imagem gerada pelo <i>software ChAS (Affymetrix)</i> , em que a barra azul representa a duplicação observada e a as barras em cinza e verde representam os genes presentes na alteração.....	36
Figura 7. Duplicação observada em 14q24.3 da paciente DA8. Imagem gerada pelo <i>software ChAS (Affymetrix)</i> , em que a barra azul representa a duplicação e as barras verde e cinza representam os genes presentes na alteração.....	39
Figura 8. Duplicação observada em 14q24.3 da paciente DA8 é herdada do pai e observada também em seu irmão. Imagem gerada pelo <i>software ChAS (Affymetrix)</i> , em que as barras azuis representam as duplicações e as barras verde e cinza representam os genes presentes na alteração	39
Figura 9. Deleção observada em 10q11.22 do paciente DA12 herdada da mãe. Imagem gerada pelo <i>software ChAS (Affymetrix)</i> , em que as barras vermelhas representam as deleções	40
Figura 10. Deleção observada em 10q26.2 do paciente DA12 herdada do pai. Imagem gerada pelo <i>software ChAS (Affymetrix)</i> , em que as barras vermelhas representam as deleções	41
Figura 11. Deleção observada em 2q13 do paciente DA14 herdada da mãe. Imagem gerada pelo <i>software ChAS (Affymetrix)</i> , em que as barras vermelhas representam as deleções	42

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Classificações da perda auditiva de acordo com diferentes parâmetros (Baseado em ALFORD <i>et al.</i> , 2014).....	17
Tabela 2. Informações referentes aos pacientes selecionados. Em que F significa feminino e M masculino	28
Tabela 3. Principais características clínicas observadas nos pacientes. MS membro superior, MMSS membros superiores, MI membro inferior; MMII membros inferiores; CIA comunicação interatrial e CIV comunicação interventricular.....	29
Continuação	31
Tabela 4. Alterações submicroscópicas consideradas raras nos pacientes estudados. Em que <i>LOH</i> significa perda de heterozigose (do inglês <i>loss of heterozygosity</i>); DEL deleção e DUP duplicação. .	32
Tabela 5. Comparação dos resultados observados no presente estudo com outros trabalhos que avaliaram a presença de alterações submicroscópicas em pacientes com deficiência auditiva síndrômica.	33
Tabela 6. Comparação das características clínicas observadas em DA5 com o observado em outros pacientes presentes na literatura com duplicações em 1p36	37
Tabela 7. Comparação das principais características clínicas presentes em DA8, seu irmão e na síndrome MNGIE.....	38

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ASHA	do inglês <i>American Speech-Language-Hearing Association</i>
CHARGE	do inglês <i>Coloboma, Heart defect, Atresia choanae, Retarded growth and development, Genital abnormality, and Ear abnormality</i>
ChaS	do inglês <i>Chromosome Analysis Suite</i>
CIA	Comunicação interatrial
CIV	Comunicação interventricular
CMA	do inglês <i>Chromosomal Microarray Analysis</i>
CNV	do inglês <i>Copy Number Variation</i>
dB	Decibel
DECIPHER	do inglês <i>Database of Genomic Variation and Phenotype in Humans using Ensembl Resources</i>
DEL	Deleção
DFN	do inglês <i>Deafness</i>
DGV	do inglês <i>Database of Genomic Variation</i>
DNA	do inglês <i>Deoxyribonucleic Acid</i>
DPAC	Déficit do Processamento Auditivo Central
DUP	Duplicação
EDTA	do inglês <i>Ethylenediamine Tetraacetic Acid</i>
FAPDF	Fundação de Apoio à Pesquisa do Distrito Federal
HIV	do inglês <i>Human Immunodeficiency Virus</i>
HUB	Hospital Universitário de Brasília
Hz	Hertz
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
Kb	Quilobase
LOH	do inglês <i>Loss of Heterozygosity</i>
Mb	Megabase
MI	Membro inferior; MMII membros inferiores
mL	Mililitro
µL	Microlitro

MNGIE do inglês *Mitochondrial Neurogastrointestinal Encephalopathy*

MS Membro superior; MMSS membros superiores

mV Milivolt

ng Nanograma

OMIM Online Mendelian Inheritance in Man

OMS Organização Mundial de Saúde

PAC Processamento Auditivo Central

PCR do inglês *Polymerase Chain Reaction*

PEATE Potenciais Evocados Auditivos do Tronco Encefálico

PNASA Política Nacional de Atenção à Saúde Auditiva

PPSUS Programa de Pesquisa para o Serviço Único de Saúde

SNC Sistema Nervoso Central

SNP do inglês *Single Nucleotide Polymorphism*

TCLE Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

TDHA Transtorno de Déficit de Atenção e Hiperatividade

TE Tris-EDTA

UnB Universidade de Brasília

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	13
1.1 AUDIÇÃO	13
1.2 FISIOLOGIA DA AUDIÇÃO.....	14
1.3 DEFICIÊNCIA AUDITIVA	16
1.4 CLASSIFICAÇÃO DA DEFICIÊNCIA AUDITIVA	16
1.4.1 Déficit do processamento auditivo central (DPAC).....	18
1.5 CAUSAS DA DEFICIÊNCIA AUDITIVA	18
1.6 DEFICIÊNCIA AUDITIVA NÃO-SINDRÔMICA.....	19
1.7 DEFICIÊNCIA AUDITIVA SINDRÔMICA	20
1.8 AVALIAÇÃO CLÍNICA.....	20
1.9 TESTES GENÉTICOS	21
2 OBJETIVO GERAL.....	23
2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	23
3 MATERIAIS E MÉTODOS	24
3.1 PACIENTES	24
3.1.1 Critérios de inclusão.....	24
3.1.2 Critérios de exclusão.....	24
3.2 ASPECTOS ÉTICOS	25
3.3 EXTRAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DO MATERIAL GENÉTICO	25
3.4 ANÁLISE CROMOSSÔMICA POR <i>MICROARRAY</i>	26
3.5 ANÁLISE DOS RESULTADO DO <i>CMA</i>	27
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	27
4.1 SELEÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DOS PACIENTES	27
4.2 MICROARRANJOS SUBMICROSCÓPICOS	32
4.3 APRESENTAÇÃO DO CASOS COM ALTERAÇÕES ESTRUTURAIS	33
4.3.1 Paciente DA4.....	33
4.3.2 Paciente DA5.....	35
4.1.3 Caso DA8	37
4.1.4 Paciente DA12.....	40
4.1.5 Paciente DA14.....	42
5 Conclusão.....	45
6. REFERÊNCIAS	46
APÊNDICE B – GENES CONTIDOS NA PERDA DE HETEROZIGOSE NO CROMOSSOMO 3 DA PACIENTE DA4.....	54
ANEXO A – PRONTUÁRIO UTILIZADO DURANTE A ANAMNESE DOS PACIENTES	55
ANEXO B – PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA	67
ANEXO C - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido – TCLE	68

ANEXO D – PROTOCOLO DE EXTRACAO DE DNA ADAPTADO (MÉTODOS GENTRA PURIGENE BLOOD KIT)..... 70

1. INTRODUÇÃO

A deficiência auditiva é uma condição sensorial frequente. Estima-se que aproximadamente 5% da população mundial sofra de perda auditiva em algum grau (OMS, 2013). Cerca de 50% dos casos têm origem genética e em torno de 30% desses são deficientes auditivos sindrômicos, ou seja, apresentam outras características clínicas além da perda auditiva (TORIELLO e SMITH, 2013).

Há um grande número de síndromes que incluem a perda auditiva. Essas síndromes frequentemente exibem quadros complexos e de difícil diagnóstico baseado apenas em observações clínicas (TORIELLO e SMITH, 2013). Um diagnóstico preciso permite oferecer ao paciente o suporte médico adequado a cada caso. Uma vez definida a síndrome, é possível acompanhar outros prováveis sintomas típicos, realizar intervenções quando necessário, e orientar a família quanto à potencial recorrência da síndrome. Além disso, a heterogeneidade genética da deficiência auditiva sindrômica também é um desafio ao diagnóstico molecular, pois limita o teste de genes específicos a uma hipótese diagnóstica previamente definida.

Uma técnica de alta resolução e ampla cobertura do genoma, como a análise cromossômica por *microarray* (*CMA* do inglês *chromosomal microarray analysis*), pode levar a detecção de alterações importantes para o desenvolvimento da perda auditiva sindrômica. Trabalhos na área de genética clínica têm demonstrado o potencial de detecção de alterações submicroscópicas patogênicas e a relevância desses achados na prática clínica (VISSERS *et al.*, 2003; SHINAWI e CHEUNG, 2008; ELLISON *et al.*, 2012; EMY DORFMAN *et al.*, 2015;). A *CMA* é considerada uma técnica eficiente tanto para diagnóstico quanto para pesquisas na área da saúde, principalmente em investigações de atraso do desenvolvimento/ deficiência intelectual e malformações congênitas, sendo sugerido, inclusive, a adoção da *CMA* como o primeiro teste na investigação diagnóstica (SHAW-SMITH *et al.*, 2006; STANKIEWICZ e BEAUDET, 2007; MILLER *et al.*, 2010; EMY DORFMAN *et al.*, 2015). A *CMA* também foi utilizada na investigação de várias síndromes, inclusive aquelas que incluem a deficiência auditiva em seu quadro clínico (HOISCHEN *et al.*, 2009; KNIJNENBURG *et al.*, 2009; NAGAMANI *et al.*, 2009). Diante do exposto, o presente trabalho buscou avaliar a ocorrência de microarranjos no genoma de indivíduos com quadro de deficiência auditiva sindrômica pela *CMA*.

1.1 AUDIÇÃO

A audição é a capacidade de captar e interpretar o som, um tipo de onda mecânica que pode se propagar através de um meio fluido ou sólido (HALLIDAY *et al.*, 2009). As ondas sonoras são captadas pelas orelhas, enquanto a frequência, intensidade e duração do som são interpretadas pelo cérebro.

A frequência das ondas sonoras é medida em Hertz (Hz). Ondas de baixa frequência são percebidas como sons graves, ao contrário de ondas de alta frequência, que geram sons agudos. Em média, os seres humanos ouvem sons entre 20 e 20.000 Hz. Outra propriedade do som é o nível de intensidade sonora que se baseia em uma intensidade de referência a qual corresponde ao limiar mínimo da audição humana e é medido em uma escala logarítmica em decibéis (dB). A intensidade é

função da amplitude da onda sonora e é percebida de acordo com a sensibilidade auditiva de cada indivíduo. Sons de alta intensidade (acima de 85 dB) podem causar danos ao aparelho auditivo (DANIEL, 2007).

1.2 FISILOGIA DA AUDIÇÃO

As informações contidas nesse tópico foram baseadas nas seguintes publicações *Fundamentals of hearing: an introduction* (YOST, 2007); *Fisiologia humana: Uma abordagem integrada* (SILVERTHORN, 2010) e *An introduction to the physiology of hearing*, (PICKLES, 2012).

A orelha é o órgão sensorial responsável pela percepção do som e pode ser dividida em orelha externa, média e interna (Figura 1). A orelha externa é constituída pelo pavilhão auricular (pina), que direciona as ondas sonoras para o interior do canal auditivo (meato acústico externo). O fim desse canal é fechado pela membrana timpânica, que separa a orelha externa da média.

A orelha média é uma cavidade cheia de ar que apresenta três ossículos (martelo, bigorna e estribo), cuja vibração conduz o som para a orelha interna. Os três ossículos são interligados e a extremidade do martelo liga-se à membrana timpânica, enquanto a extremidade oposta do estribo liga-se à janela oval, uma pequena abertura na parede interna. Abaixo da janela oval encontra-se a janela redonda fechada por uma membrana fina. As janelas oval e redonda separam o ar contido na orelha média do líquido presente na orelha interna.

A orelha interna possui estrutura em forma espiralada chamada cóclea, um tubo que se estreita da base para o ápice e é dividido ao meio por um canal chamado ducto coclear ou escala média. O espaço superior à escala média é chamado escala vestibular e, o espaço inferior, escala timpânica (Figura 1). As escalas vestibular e timpânica são preenchidas por perilinfa, se comunicam por um espaço situado no ápice da cóclea, o helicotrema, e estão ligadas às janelas oval e redonda, respectivamente. O limite entre a escala média e a timpânica é a membrana basilar, onde encontra-se o órgão de Corti. Esse órgão abriga os receptores sensoriais da audição, as células ciliadas e ramos do nervo craniano vestibulococlear que ligam a orelha interna ao cérebro.

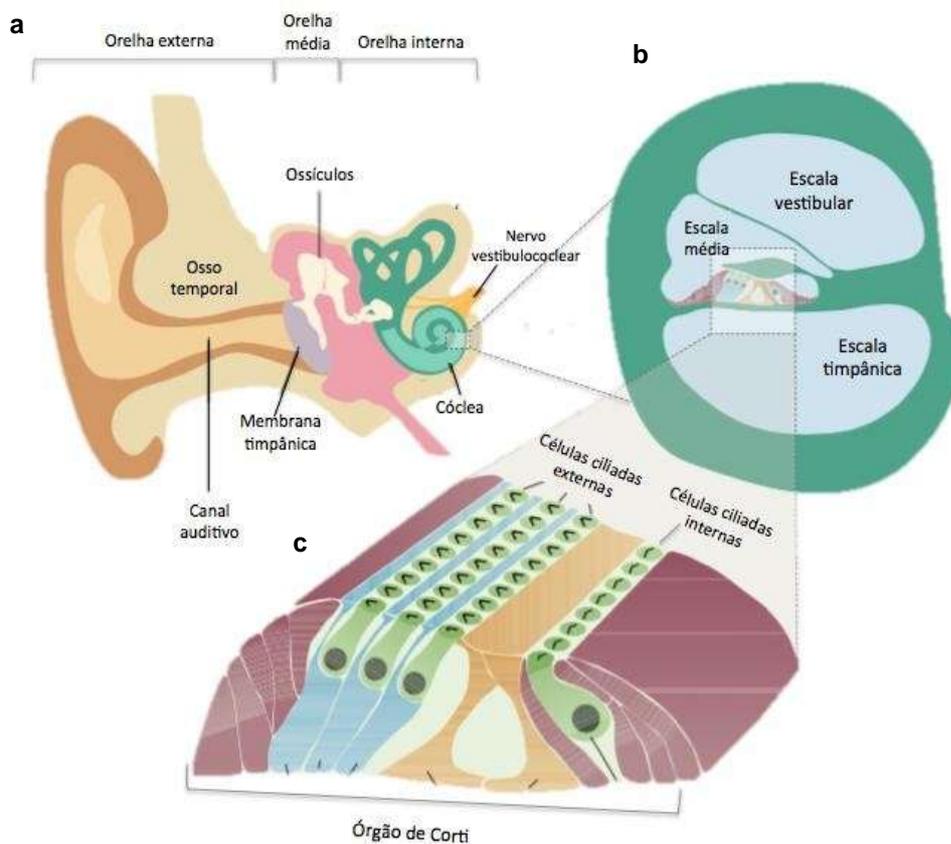


Figura 1. Desenho esquemático da estrutura da orelha. Evidencia-se em **a.** a organização das estruturas da orelha, em **b.** o interior da cóclea e em **c.** as células ciliadas presentes no órgão de Corti. Modificado de Dror e Avraham (2009).

As ondas sonoras são direcionadas pelo pavilhão auricular até o canal auditivo e alcançam a membrana timpânica, que vibra ao receber variações da pressão do ar. As vibrações são transferidas para o conjunto de ossículos da orelha média através do martelo, que está ligado à bigorna e essa ao estribo que toca a janela oval amplificando o som. A perilinfa é impulsionada ao longo das escalas vestibular e timpânica até a janela oval. Como a perilinfa é envolvida por uma parede rígida, a pressão causada pela onda sonora é aplicada sobre a escala média, provocando o deslocamento dos estereocílios (prolongamentos na superfície apical das células ciliadas). A distorção dos estereocílios abre canais de potássio, o que leva a despolarização das células devido a diferença entre os potenciais elétricos da endolinfa que circunda os estereocílios (+80mV) e do interior das células ciliadas (-45mV). O potencial de ação gerado excita neurônios sensoriais auditivos que enviam as informações sonoras através do nervo vestibulococlear para o encéfalo, onde serão interpretadas. Desta forma, o padrão de ondas que chega até o pavilhão auricular é convertido em padrão de potenciais de ação no sistema nervoso central (SNC). A atividade periférica que inclui os processos que ocorrem na orelha (externa, média e interna) atuam na detecção e transmissão dos sons, enquanto a atividade central que inclui os processos neurais atua na discriminação, localização, reconhecimento, compreensão, atenção seletiva e memória auditiva. Assim, danos nas estruturas que constituem o sistema auditivo, desde a orelha externa até o córtex, podem levar à perda auditiva.

1.3 DEFICIÊNCIA AUDITIVA

A surdez é um fenótipo caracterizado pela perda total da habilidade de ouvir, enquanto a perda auditiva é um fenótipo caracterizado por uma perda parcial dessa habilidade (ALFORD *et al.*, 2014). Nesse estudo, os termos deficiência auditiva, perda auditiva e surdez serão considerados equivalentes e definidos como a incapacidade total ou parcial de perceber ou interpretar o som. Os graus de perda auditiva serão destacados quando necessário.

Segundo os dados da Organização Mundial da Saúde (OMS, 2013), 5% da população mundial, ou seja, 360 milhões de pessoas, são portadoras de perda auditiva incapacitante (percepção auditiva menor que 30 dB para crianças e 40 dB para adultos). Cerca de 50% desses são provenientes de fatores ambientais e poderiam ser evitados com medidas de prevenção primária. No Brasil, segundo o censo do IBGE (2010), cerca de 5% da população possui algum tipo de deficiência auditiva e 1,12% não ouve som algum.

A audição é imprescindível para o desenvolvimento natural da fala, importante para a aprendizagem e facilitadora de interações sociais. Portanto, a perda total ou parcial da audição pode comprometer o processo de aprendizagem e as relações sociais do paciente. Casos de depressão e ansiedade também são mais comuns entre os deficientes auditivos do que entre os ouvintes. Isso, em conjunto com a dificuldade em acessar serviços de saúde mental, pode levar ao aumento do risco de suicídio nessa população (KVAM *et al.*, 2007; TURNER *et al.*, 2007). Além disso, pode-se considerar impactos econômicos, uma vez que há alta taxa de desemprego entre pessoas portadoras de deficiência auditiva (OMS, 2013).

A alta incidência atrelada aos impactos sociais da perda auditiva motivam estudos e políticas públicas dentro dessa temática. A exemplo, o Ministério da Saúde criou, em 2004, o Programa Nacional de Atenção a Saúde Auditiva (PNASA) que busca contribuir com a prevenção, diagnóstico, intervenção e tratamento da deficiência auditiva. E, em 2010, o Governo Federal aprovou a lei 12.303 que torna obrigatória a realização gratuita do exame de emissões otoacústicas evocadas, conhecido como o teste da orelhinha, nas crianças nascidas em todos os hospitais e maternidades do país. O objetivo dessa lei é possibilitar o diagnóstico precoce de casos de perda auditiva e, assim, minimizar os prejuízos na aprendizagem e na linguagem causados por essa deficiência (BRASIL, 2010).

1.4 CLASSIFICAÇÃO DA DEFICIÊNCIA AUDITIVA

A perda auditiva pode ser classificada de acordo com diversos parâmetros, como local do defeito, início do aparecimento, lateralidade, estabilidade e associação ou não com outros sinais clínicos. Quando o defeito é localizado na orelha externa ou média, é classificado como perda auditiva condutiva; na orelha interna, neurosensorial; e mista quando há uma combinação dos tipos anteriores. Quanto ao início da deficiência, classifica-se como pré-lingual a perda auditiva anterior ao desenvolvimento da fala e pós-lingual quando é posterior ao desenvolvimento da fala. Conforme a lateralidade é classificada em perda auditiva unilateral quando apenas uma das orelhas do paciente é afetada, e bilateral quando ambos os lados são afetados. A perda auditiva também pode ser estacionária, ou seja, os limiares auditivos não variam ao longo do tempo, ou progressiva quando

esses limiares aumentam ao longo do tempo. Já o grau da perda auditiva refere-se ao limiar auditivo e pode ser leve (26 a 40 dB), moderada (41 a 55 dB), moderadamente grave (56 a 70 dB), grave (71 a 90 dB) ou profunda (91 dB ou mais). Outra forma de classificação refere-se às frequências afetadas pela deficiência, frequências baixas correspondem a sons menores que 500 Hz, frequências médias estão entre 501 e 2.000 Hz e as altas são as maiores que 2.000 Hz (ALFORD *et al.*, 2014).

A classificação mais utilizada diz respeito ao conjunto de características clínicas e, nesse caso, a perda auditiva pode ser *sindrômica* ou *não-sindrômica* (FINSTERER e FELLINGER, 2005). Indivíduos com deficiência auditiva *não-sindrômica* apresentam a perda auditiva como sinal clínico único, e nos casos de deficiência auditiva *sindrômica* a perda auditiva é associada a outras características fenotípicas (TEKIN *et al.*, 2001). A tabela 1 resume as principais classificações da perda auditiva.

Tabela 1. Classificações da perda auditiva de acordo com diferentes parâmetros (Baseado em ALFORD *et al.*, 2014).

Parâmetros	Classificação
Local do defeito	Condutiva: alterações na orelha externa ou média
	Neurosensorial: alterações na orelha interna
	Mista: combinação do tipo condutivo e neurosensorial
Início da perda auditiva	Pré-lingual: anterior ao desenvolvimento da fala
	Pós-lingual: posterior ao desenvolvimento da fala
Lateralidade	Unilateral ou assimétrica: afeta apenas um dos lados (direito ou esquerdo)
	Bilateral ou simétrica: afeta ambos os lados (direito e esquerdo)
Estabilidade da perda auditiva	Progressiva: os limiares aumentam ao decorrer do tempo
	Estacionária: os limiares não variam com o tempo
Grau de perda auditiva	Leve: 26 – 40 dB
	Moderado: 41 – 55 dB
	Moderadamente grave: 56 – 70 dB
	Grave: 71 – 90 dB
Frequências afetadas	Profunda: 91 dB ou mais
	Baixas: < 500 Hz
	Médias: 501 - 2.000 Hz
Associação com outras características clínicas	Altas: > 2.000 Hz
	Sindrômica: associada a outros fenótipos
	Não-sindrômica: a surdez é única característica presente

1.4.1 Déficit do processamento auditivo central (DPAC)

Além dos tipos mais estudados de deficiência auditiva (neurossensorial, condutiva e mista), esse estudo inclui casos de déficit do processamento auditivo central (DPAC). Esses casos não tratam de deficiências na percepção do som, mas na sua interpretação, ou seja, refere-se à eficiência do sistema nervoso central (SNC) em interpretar e utilizar a informação sonora. O DPAC manifesta-se pela dificuldade do paciente em exercer uma ou mais habilidades auditivas. Desta forma, pacientes com DPAC podem ter dificuldade em localizar a fonte sonora, discriminar os sons, reconhecer padrões sonoros, identificar aspectos temporais, interpretar sons competitivos (audição dicótica) ou focar em um som em meio a ruído (ASHA, 2005).

O DPAC não ocorre devido a deficiências de linguagem ou cognitivas. No entanto, seu diagnóstico é frequentemente confundido com outras condições como transtornos do espectro autista e TDAH (transtorno do déficit de atenção e hiperatividade). Essa diferença não significa que o DPAC não possa coexistir com outras condições, principalmente com aquelas que compartilham regiões neuroanatômicas importantes para o processamento auditivo (MUSIEK, 1999; SHARMA *et al.*, 2006). A frequência com que essa comorbidade ocorre, principalmente com transtornos cognitivos, levam autores como Moore *et al.* (2013), a questionarem o DPAC como uma condição isolada e sugerirem que se trata de parte de um distúrbio neurológico mais amplo. Da perspectiva canadense, o DPAC deve ser considerado como uma interação complexa entre as funções cognitivas e auditivas (CISGSLPA, 2013). As causas genéticas do DPAC são pouco conhecidas e identificar segmentos alterados (deletados ou duplicados) em pacientes com essa condição podem contribuir para o entendimento de sua etiologia (SMITH *et al.*, 2002).

1.5 CAUSAS DA DEFICIÊNCIA AUDITIVA

As causas da deficiência auditiva incluem fatores genéticos, ambientais ou ambos (ESTIVILL *et al.*, 1998; MORTON, 2002). Dentre os fatores ambientais, destacam-se o uso de medicamentos ototóxicos, infecções bacterianas ou virais, nascimento prematuro, hipóxia e icterícia neonatal grave (BITNER-GLINDZICZ, 2002). Um dos fatores ambientais mais comuns é a exposição a ruídos. Sons altos podem levar a destruição de células ciliadas incapacitando a percepção auditiva. Esse tipo de deficiência é mais frequente em idosos e é chamada de presbiacusia. O grupo dos idosos é bastante afetado, pois os indivíduos acumulam vários traumas auditivos ao longo do tempo. No entanto, o número de jovens afetados por deficiência auditiva induzida por ruídos tem aumentado em razão da intensidade do som a que esse grupo é exposto espontaneamente (GATES e MILLS, 2005; DANIEL, 2007). Espera-se que o número de casos de perda auditiva decorrente de fatores ambientais decresça ano a ano devido a melhoria das terapias para infecções bacterianas e virais, controle dos medicamentos ototóxicos e identificação e prevenção de traumas acústicos em ambiente de trabalho (SMITH *et al.*, 2005; ELLISON *et al.*, 2012).

Os fatores genéticos que levam à perda auditiva incluem principalmente mutações em genes ou em regiões regulatórias importantes para o desenvolvimento da estrutura da orelha e suas funções (DROR e AVRAHAM, 2009; ANGELI *et al.*, 2012; LAMMENS *et al.*, 2013). A deficiência auditiva hereditária apresenta grande heterogeneidade clínica (fenotípica) e genética, tanto alélica quanto

gênica (de *locus*) (KEATS e BERLIN, 1999). Por exemplo, diferentes mutações no gene *MYO7A* (*OMIM* *276903) podem levar à perda auditiva não-sindrômica autossômica recessiva, à perda auditiva de herança autossômica dominante ou a um quadro sindrômico (síndrome de Usher tipo I).

Reflexo da grande heterogeneidade genética, observa-se que 90% da prole gerada por casais deficientes auditivos apresentam audição normal (MORTON, 2002). Essa grande heterogeneidade deve-se ao notável número de genes envolvidos na fisiologia da audição em paralelo à grande quantidade de distintas mutações presentes nesses genes. O padrão de herança da deficiência auditiva é diverso, podendo ser autossômico dominante, autossômico recessivo, ligado ao cromossomo X ou ao *DNA* mitocondrial (TEKIN *et al.*, 2001; MORTON, 2002). Apesar disso, aproximadamente 80% dos casos não sindrômicos apresentam herança autossômica recessiva.

1.6 DEFICIÊNCIA AUDITIVA NÃO- SINDRÔMICA

Aproximadamente 70% dos casos de deficiência auditiva são não-sindrômicos e os diferentes *loci* relacionados a esse tipo de deficiência auditiva são designados pela sigla *DFN* (do inglês *deafness*). Utiliza-se o símbolo *DFNA* quando trata-se de herança autossômica dominante, *DFNB* para herança autossômica recessiva e *DFNX* para herança ligada ao cromossomo X. Esses símbolos são seguidos de números que indicam a ordem em que cada gene foi mapeado (KOCHHAR *et al.*, 2007).

Desde 1990, mais de 150 *loci* relacionados a surdez não sindrômica foram identificados (*Hereditary Hearing loss Homepage*). Em 1994, foi identificado o primeiro *locus* de herança autossômica recessiva (*DFNB1*) e, três anos depois, o gene *GJB2* foi descrito. *GJB2* codifica uma proteína chamada conexina 26, que participa da formação de junções *gap* e é encontrada em vários tipos celulares, incluindo células ciliadas da orelha interna. Estudos sugerem que a conexina 26 é importante na manutenção dos níveis de potássio apropriados para a conversão de ondas sonoras em impulsos nervosos (KELSELL *et al.*, 1997)

Mutações em *GJB2* são responsáveis por mais de 50% dos casos de surdez não-sindrômica neurosensorial de herança autossômica recessiva em determinadas populações (ESTIVILL *et al.*, 1998). Na mesma região genômica, observa-se o gene *GJB6*, que também causa perda auditiva de herança autossômica recessiva ou dominante. *GJB2* e *GJB6* são considerados os genes mais importantes no estudo da deficiência auditiva, pois mutações nesses explicam grande parte dos casos de perda auditiva. Um estudo realizado no Brasil com 300 pacientes mostrou que 13,7% dos casos de deficiência auditiva não sindrômica podem ser explicados por mutações em *GJB2* e *GJB6*, seja de herança autossômica dominante ou recessiva (BATISSOCO *et al.*, 2009).

Atualmente, cerca de 60 genes já foram associados à perda auditiva não-sindrômica de herança autossômica recessiva (*Hereditary Hearing loss Home Page*). Quanto a perda auditiva não-sindrômica autossômica dominante, foram identificados cerca de 30 genes. Pacientes com esse tipo de deficiência frequentemente apresentam perda auditiva progressiva pós-lingual com início aproximadamente aos 20 anos de idade. (KOCHHAR *et al.*, 2007 ; *Hereditary Hearing loss Home Page*).

Em relação a perda auditiva não-sindrômica com herança ligada ao X, foram mapeados quatro genes (*Hereditary Hearing loss Home Page*) e, normalmente, esse tipo de deficiência é caracterizada por surdez neurossensorial grave. Há também mutações mitocondriais associadas à surdez não-sindrômica. A primeira mutação mitocondrial descrita foi no gene *MTRN1* e relacionada à sensibilidade aumentada para perda auditiva devido a administração de aminoglicosídeos, como, por exemplo, canamicina, estreptomicina e gentamicina (KOKOTAS *et al.*, 2007).

1.7 DEFICIÊNCIA AUDITIVA SINDRÔMICA

Há mais de 400 síndromes que incluem a deficiência auditiva como uma de suas características (STEEL e KROS, 2001; TORIELLO e SMITH, 2013). Estima-se que a deficiência auditiva sindrômica represente cerca de 30% de todos os casos de deficiência auditiva congênita (TORIELLO e SMITH, 2013). Em determinadas síndromes, como Wanderburg, Braquio-oto-renal, *CHARGE* e Usher, a deficiência auditiva é uma das características mais importantes do quadro clínico. Porém, em outras, como a síndrome do rim policístico, a expressividade da deficiência auditiva é variável e muitas vezes infrequente.

1.8 AVALIAÇÃO CLÍNICA

A avaliação clínica de um paciente com deficiência auditiva deve ser multidisciplinar, isto é, especialistas de várias áreas devem ser solicitados para chegar a um diagnóstico preciso, principalmente nos casos sindrômicos. Essa avaliação deve ser flexível, adaptada a cada paciente considerando o histórico, a idade e o tipo de perda auditiva (KOCHHAR *et al.*, 2007).

O histórico familiar deve incluir desde a gestação do probando até os problemas de saúde atuais. O histórico de saúde dos familiares também é importante e deve explorar casos de deficiência auditiva e características que possam estar relacionadas a síndromes como perda visual, malformação renal, bócio e características dismórficas.

Os testes audiológicos são fundamentais para determinar o grau e o tipo de perda auditiva e devem ser adequados à idade do paciente. A audiometria é um teste básico que permite mensurar o limiar auditivo de tons puros entre 125 e 8.000 Hz. Nesse teste, considera-se audição normal quando a intensidade mínima ouvida é de até 25 dB para adultos e 15 dB para crianças (ANGELI *et al.*, 2012). O tipo de perda auditiva (neurossensorial, condutiva ou mista) também pode ser identificado na audiometria e, para isso, são utilizadas duas estratégias de avaliação por via aérea e por via óssea. Na avaliação da via aérea é utilizado um fone de ouvido para fornecer os tons em diferentes intensidades, enquanto na avaliação da condução por via óssea, é utilizado um vibrador ósseo atrás da orelha para estimular o ouvido interno. A audiometria óssea é realizada quando a primeira estratégia indica possível perda auditiva. Caso a surdez seja condutiva, apenas a audiometria aérea indicará deficiência auditiva. Em casos de surdez neurossensorial, a condução pelas duas vias estará comprometida e, quando se tratar de surdez mista, a condução via aérea mostrará um comprometimento maior (GANANÇA *et al.*, 2000).

Histórico familiar, exames físicos e audiológicos direcionam a investigação e indicam a necessidade de outros exames. Logo após o nascimento, podem ser recomendados testes para

identificar infecções intrauterinas, como, por exemplo, por citomegalovírus. Exames de imagem, como ressonância magnética e tomografia, podem ajudar a identificar defeitos morfológicos importantes para o diagnóstico, como o alargamento do aqueduto vestibular que pode estar presente nas síndromes de Waardenburg, Braquio-oto-renal, *CHARGE* e Pendred, e também em casos de surdez não-sindrômica. Exames mais específicos podem ser necessários para casos síndrômicos.

1.9 TESTES GENÉTICOS

O aumento do conhecimento da etiologia da deficiência auditiva hereditária está levando ao aumento na disponibilidade de testes diagnósticos com base no material genético. A disponibilidade de testes que utilizam *DNA* para diagnosticar casos de perda auditiva revolucionou o esclarecimento desses casos, pois frequentemente substituem exames mais invasivos e menos precisos (ANGELI *et al.*, 2012). Os testes genéticos para perda auditiva buscam identificar variações em genes específicos associados à perda auditiva. Essa abordagem é válida quando um gene ou um número pequeno de genes são candidatos ao tipo de deficiência investigada ou quando um gene é responsável por uma porcentagem significativa dos casos. Por exemplo, tem-se buscado alterações nos genes *SLC26A4*, *PAX3* ou *MYO7A* quando há suspeita das síndromes de Pendred, Waardenburg I ou Usher I, respectivamente, ou a identificação de alterações em *GJB2*, responsável por aproximadamente 50% dos casos de surdez não-sindrômica autossômica recessiva (ALFORD *et al.*, 2014).

Muitas vezes a avaliação clínica do paciente não é suficiente para indicar a alteração que deve ser buscada. Portanto, o uso de estratégias que proporcionam a identificação de diversas variantes previamente relacionadas a problemas auditivos ou ainda não descritas como associadas à perda auditiva pode ser fundamental para o diagnóstico. O uso de técnicas de investigação do genoma, como a análise cromossômica por *microarray* (*CMA*), permite observar rearranjos cromossômicos submicroscópicos associados a diversas anomalias, dentre elas a perda auditiva. Essa tecnologia permite a estimativa do número de cópias do *DNA* e o mapeamento dessas diferenças ao longo do genoma (SOLINAS-TOLDO *et al.*, 1997). Os rearranjos submicroscópicos pertencem à classe de variações cromossômicas estruturais (*SVs* - *Structural variation*), sendo que as deleções e duplicações submicroscópicas são denominadas *CNVs* (*Copy Number Variations*).

As *CNVs* são segmentos de *DNA* que variam de 1 quilobase (kb) a 5 megabases (Mb) e apresentam um número de cópias variável em relação ao genoma de referência (FEUK *et al.*, 2006). Outras variações estruturais, como as inversões e translocações, não são identificadas pela *CMA*, pois não alteram o número de cópias do *DNA*. Desta forma, é mais difícil estabelecer a correlação dos *SVs* que não sejam *CNVs* com o quadro clínico do paciente.

A importância das *CNVs* na expressão fenotípica foi descrita pela primeira vez na década de 30, quando se observou que o número de cópias de um dado gene está diretamente relacionado com o formato de olho em *Drosophila melanogaster* (BRIDGES, 1936). Mais recentemente tem sido proposto que as *CNVs* podem estar ou não relacionadas com patologias. Observa-se que as *CNVs* encontram-se dentre as maiores fontes de variabilidade genética (IAFRATE *et al.*, 2004; PROJECT 1000 GENOMES *et al.*, 2012; SEBAT *et al.*, 2004; TUZUN *et al.*, 2005). Comumente esses

segmentos polimórficos são registrados em bancos de dados públicos como o *DGV (Database of Genomic Variants)*.

As *CNVs* podem englobar parte de um gene, um gene inteiro, um segmento que abrange vários genes ou regiões regulatórias (VIANNA-MORGANTEA *et al.*, 2006; CONRAD *et al.*, 2010; SHISHIDO *et al.*, 2013; OUYANG *et al.*, 2014) e essas alterações estão frequentemente associadas a patologias, pois podem alterar a dosagem gênica e levar a doenças como as síndromes de microdeleção ou microduplicação (RUDD *et al.*, 2009; SHARP, 2009), ou, ainda, conferir predisposição a condições complexas como a infecção por *HIV-1* (GONZALEZ *et al.*, 2005). Técnicas que permitem a detecção de *CNVs* têm sido amplamente utilizadas no estudo de casos sindrômicos (CALLIER, *et al.*, 2008; NAGAMANI, *et al.*, 2009; COSTAIN, *et al.*, 2013).

Embora algumas síndromes apresentem características clínicas de fácil diagnóstico, outras exigem maior investigação e o diagnóstico clínico pode ser incerto. Um diagnóstico molecular preciso para perda auditiva sindrômica pode confirmar diagnósticos clínicos, assegurar um aconselhamento genético confiável e também embasar pesquisas a respeito dessa condição (ANGELI *et al.*, 2012; BITNER-GLINDZICZ, 2002; DROR e AVRAHAM, 2010).

Sobretudo, o conhecimento genético acerca da deficiência auditiva, permite o esclarecimento do processo biológico da doença e contribui para compreensão do sistema auditivo como um todo. Os vários genes relacionados à audição formam vias de regulação gênica, manutenção da homeostase do fluido da coclear, mecano-transdução, dentre outras funções. Essas vias interagem direta ou indiretamente formando uma rede genômica (*network*) estreitamente interligada, mas pouco estudada até hoje. Identificar os genes relacionados à audição é essencial para entender a composição e o funcionamento dessas *networks* e, conseqüentemente, compreender patologias associadas à audição e, quando possível, direcionar tratamentos e intervenções (STAMATIOU e STANKOVIC, 2013).

2 OBJETIVO GERAL

O objetivo principal desse trabalho foi investigar a ocorrência de alterações cromossômicas submicroscópicas no genoma de pacientes com deficiência auditiva sindrômica e avaliar o envolvimento desses microarranjos na etiologia dos quadros clínicos observados.

2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar a ocorrência de microarranjos cromossômicos em pacientes com deficiência auditiva sindrômica;
- Identificar alterações cromossômicas submicroscópicas previamente descritas como relacionadas à deficiência auditiva sindrômica;
- Avaliar alterações cromossômicas submicroscópicas previamente descritas como não patogênicas quanto a possibilidade de envolvimento na etiologia dos casos selecionados;
- Avaliar a ocorrência e função de genes das regiões com microarranjos;
- Avaliar a existência de relação entre os sinais clínicos dos pacientes e os genes contidos nos microarranjos.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 PACIENTES

Indivíduos diagnosticados com surdez sindrômica, sem causa genética definida, foram selecionados dentre pacientes atendidos pelo serviço de genética clínica do Hospital Universitário de Brasília (HUB). A seleção dos pacientes seguiu os critérios de inclusão e exclusão.

3.1.1 Critérios de inclusão

Os pacientes incluídos nesse estudo passaram por avaliação de profissionais da fonoaudiologia e/ou otorrinolaringologia. Esses profissionais confirmaram a presença de deficiência auditiva e estabeleceram o tipo de perda mediante exames específicos que incluíram, principalmente, audiometria, exame do potencial evocado auditivo do tronco encefálico (PEATE) e exame do processamento auditivo central (PAC), quando necessário.

Durante a anamnese dos pacientes, realizada por médicos geneticistas (Prontuário - Anexo A) a partir do relato dos responsáveis, afastou-se possíveis causas ambientais para a deficiência auditiva dos pacientes, em especial, infecções durante a gestação ou parto e uso de medicamentos ototóxicos.

Os pacientes incluídos nesse estudo apresentaram outras alterações clínicas, além das auditivas, como problemas visuais, renais, cardíacos, dismorfias ou demais características que permitiram considerar um quadro de deficiência auditiva sindrômica. Cada alteração foi confirmada em exames específicos e avaliada por profissionais das áreas relativas. Dentre os indivíduos com quadros sindrômicos, foram incluídos pacientes pertencentes a dois grupos amostrais: i. pacientes em que as avaliações clínicas não permitiram classificar com confiança o quadro observado em uma síndrome conhecida; ii. casos em que uma hipótese diagnóstica foi proposta, porém sem diagnóstico molecular bem estabelecido.

Os pacientes que atenderam os critérios supracitados foram triados por citogenética tradicional, que alcança resolução de 10 a 4 Mb. Os pacientes que não apresentaram alterações visíveis no exame de cariótipo foram convidados a participar do presente estudo. Os pacientes que aceitaram participar da pesquisa, assinaram termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE).

3.1.2 Critérios de exclusão

Pacientes que não apresentaram clínica compatível com deficiência auditiva sindrômica ou que a anamnese indicou perda auditiva com possível causa ambiental foram excluídos do estudo. Além disso, pacientes que tiveram alterações identificadas por citogenética clássica ou foram diagnosticados com síndromes conhecidas e causa genética determinada também não participaram do estudo. Finalmente, os indivíduos que atenderam os critérios de inclusão, porém não concordaram ou não assinaram o TCLE foram excluídos.

O fluxograma a seguir resume a seleção dos pacientes de acordo com os critérios estabelecidos (Figura 2).

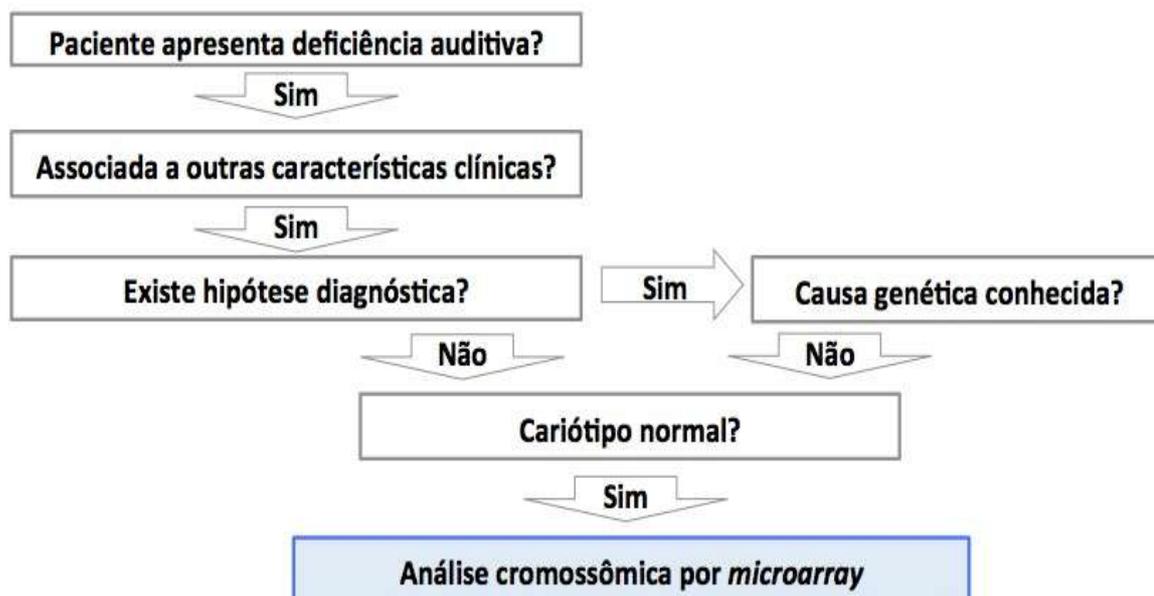


Figura 2. Fluxograma dos critérios de seleção dos pacientes.

Dentro dos critérios de inclusão foram selecionados 16 pacientes com idade entre 1 e 38 anos, sendo quatro do sexo feminino e 12 do sexo masculino (Tabela 2).

3.2 ASPECTOS ÉTICOS

Este trabalho integra um projeto maior intitulado “Desenvolvimento de painel diagnóstico baseado em sequenciamento de exons para surdez sindrômica”, que foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da Faculdade de Ciências da Saúde da UnB, sob certificado de apresentação para apreciação ética número 30441114.8.0000.0030 e parecer número 1.312.729 (Anexo B), financiado pelo PPSUS/FAPDF (Processo n° 193/000.861/2014).

Os pacientes que atenderam aos critérios de inclusão da pesquisa foram convidados a comparecer ao serviço de genética clínica do HUB, onde foram informados a respeito dos objetivos e procedimentos a serem adotados para participação no estudo, assim como sobre o sigilo a respeito de suas identidades. Como a maior parte dos pacientes não tinham idade e/ou condições cognitivas para aprovação do estudo, seus respectivos responsáveis preencheram e assinaram o TCLE. Desta forma, os responsáveis concordaram com o uso do material biológico dos pacientes e demais informações necessárias para o desenvolvimento dessa pesquisa (Anexo C).

3.3 EXTRAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DO MATERIAL GENÉTICO

Para a condução desse estudo, foram coletados cerca de 4 mililitros (mL) de sangue periférico em tubo contendo *EDTA* como anticoagulante. A coleta foi realizada por profissional capacitado e com material estéril, descartável e de boa qualidade. O *DNA* foi extraído de linfócitos derivados de sangue periférico por método baseado no kit comercial *Genra Purigene Blood kit*

(<https://www.qiagen.com>). O protocolo (Anexo D) consiste na lise celular com detergente na presença de um estabilizador de *DNA*, precipitação de proteínas e contaminantes com sal, precipitação do *DNA* em isopropanol, remoção de resíduos com etanol e diluição do *DNA* em TE 1%. Após a extração, o *DNA* foi quantificado em nanogramas por microlitro (ng/ μ L) no espectrofotômetro *NanoDrop™ 2000* (*Thermo Scientific*).

3.4 ANÁLISE CROMOSSÔMICA POR MICROARRAY

A análise cromossômica por *microarray* tem sido amplamente utilizada no diagnóstico de diversas anomalias com proposta de etiologia genética, inclusive a deficiência auditiva. Nesse trabalho, a técnica de *CMA* foi utilizada para identificar alterações submicroscópicas que pudessem explicar a clínica de pacientes com quadro de deficiência auditiva sindrômica.

Utilizou-se chips *CytoScan 750k Array (Affymetrix)* com cerca de 750.000 sondas para regiões codificantes e não codificantes do genoma humano, em que 550.000 sondas são de *CNVs* de regiões não polimórficas e cerca de 200.000 sondas de *SNPs (Single nucleotide polymorphisms)*. A distribuição das sondas visa uma alta resolução tanto de variações no número de cópias quanto de perda de heterozigose.

As etapas da técnica representadas na figura 3 foram realizadas segundo as instruções do fabricante. Os chips hibridados com o *DNA* dos pacientes marcados com fluorocromos foram escaneados utilizando *GeneChip® Scanner 3000 7G (Affymetrix)*.

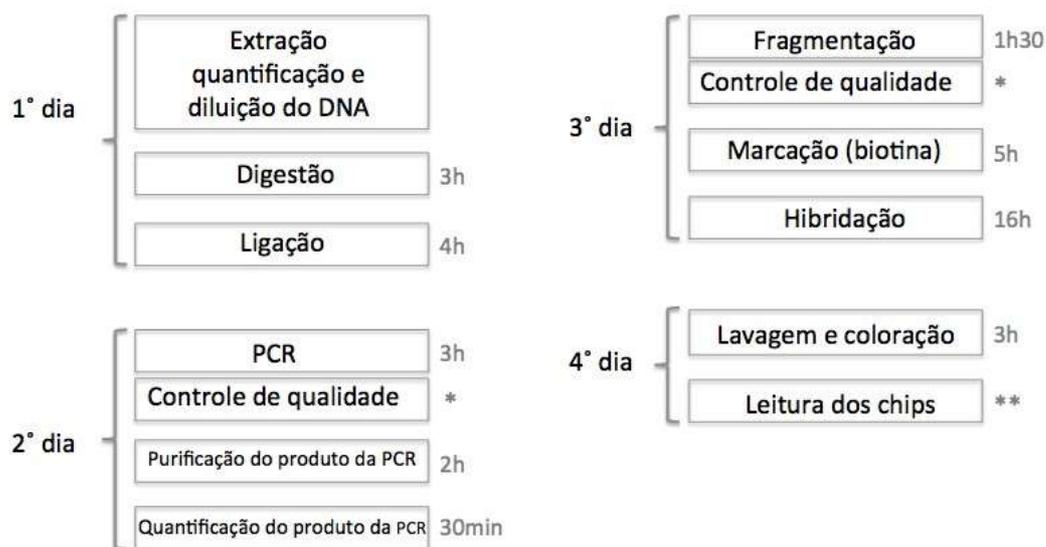


Figura 3. Principais etapas envolvidas na *CMA* utilizando *CytoScan 750k array (Affymetrix)*. Em que * são géis de agarose para verificar a amplificação por PCR e posteriormente a fragmentação dos produtos da PCR. ** a leitura de cada chip leva aproximadamente 30 minutos. Modificado de *Affymetrix CytoScan assay protocol*.

3.5 ANÁLISE DOS RESULTADOS DO CMA

As imagens geradas a partir do scanner *GeneChip® Scanner 3000 7G (Affymetrix)* foram analisadas com o auxílio do *software Chromosome Analysis Suite (ChAS) (Affymetrix)*. Os parâmetros referentes a filtragem dos segmentos identificados no *ChAS* foram estabelecidos da seguinte forma, alterações iguais ou maiores que 15 sondas para deleções, 20 sondas para duplicações e 5.000 kb para perdas de heterozigose. Os demais parâmetros foram mantidos conforme os padrões já estabelecidos pelo programa.

Cada rearranjo submicroscópico identificado foi comparado com rearranjos registrados no *DGV (Database of Genomics Variants)* e no *DECIPHER (Database of genomic variation and phenotype in humans using Ensembl resources)*, que são bancos de dados públicos. No *DGV* são registradas variações encontradas em indivíduos controles, enquanto no *DECIPHER* são depositadas informações sobre variações potencialmente patogênicas encontradas em pacientes. Adicionalmente, as alterações estruturais e os genes presentes nessas e nas regiões de perda de heterozigose observados no genoma dos pacientes foram comparados aos dados presentes no *OMIM (Online mendelian inheritance in man)* e na literatura científica.

Os pais de pacientes que apresentaram variações submicroscópicas também passaram pela análise cromossômica por *microarray*. Ao final da pesquisa, todos os pacientes receberam os resultados do *CMA* e passaram por aconselhamento genético durante consulta com profissional capacitado.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 SELEÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DOS PACIENTES

Foram selecionados 16 pacientes encaminhados pelo serviço de genética clínica do HUB que atenderam os critérios de inclusão. Desses pacientes, quatro foram do sexo feminino e 12 do sexo masculino, sendo oito crianças (1 a 11 anos), cinco adolescentes (12 a 17 anos) e três adultos (18 a 38 anos). Dentre os diferentes tipos de deficiências auditivas apresentadas, 37,5% (6/16) dos casos foram condutivos, 31,25% (5/16) neurosensoriais, 18,75% (3/16) DPAC e 12,5% (2/16) mistos.

De acordo com o diagnóstico clínico, quatro casos apresentaram hipótese diagnóstica (Tabela 2), porém sem causa genética estabelecida. Em um, a suspeita era de síndrome de Robinow e em três, de síndrome de Goldenhar.

Os principais fenótipos adicionais à deficiência auditiva foram alterações craniofaciais diversas (16/16), alterações de membros (9/16), principalmente dos dedos, deficiências cognitivas (6/16), visuais (5/16) e as relacionadas ao sistema reprodutor (5/16). A tabela 3 apresenta todas as alterações adicionais observadas no grupo de estudo.

Tabela 2. Informações referentes aos pacientes selecionados. Em que F significa feminino e M masculino.

ID	Sexo	Data de nascimento	Tipo de deficiência auditiva	Diagnóstico clínico
DA1	F	Nov/77	Condutiva	-
DA2	M	Out/14	Condutiva	S. de Goldenhar
DA3	M	Jun/02	Neurosensorial	-
DA4	F	Nov/08	Neurosensorial	S. de Robinow
DA5	M	Abr/04	DPAC	-
DA6	M	Out/10	Condutiva	-
DA7	M	Jan/07	DPAC	-
DA8	F	Dez/92	Neurosensorial	-
DA9	M	Set/05	Mista	-
DA10	M	Dez/92	Neurosensorial	-
DA11	M	Dez/99	DPAC	-
DA12	M	Mar/15	Condutiva	S. de Goldenhar
DA13	F	Jan/11	Condutiva	S. de Goldenhar
DA14	M	Jun/04	Condutiva	-
DA15	M	Mar/12	Mista	S. de Goldenhar
DA16	M	Set/99	Neurosensorial	-

Tabela 3. Principais características clínicas observadas nos pacientes. MS membro superior, MMSS membros superiores, MI membro inferior; MMII membros inferiores; CIA comunicação interatrial e CIV comunicação interventricular.

		Alterações					
	Auditivas	Visuais	Cognitivas/ comportamentais	Craniofaciais	Membros	Reprodutivas	Outras
DA1	Condutiva bilateral		Deficiência intelectual e distúrbio comportamental	Face assimétrica, nariz desviado para esquerda e olhos situados profundamente	Mãos e pés pequenos		
DA2	Condutiva com microtia grau III unilateral			Face assimétrica e retrognatia			
DA3	Neurosensorial moderada bilateral		Deficiência intelectual	Macrocrania e fendas palpebrais retas	Mãos e pés grandes		
DA4	Neurosensorial leve unilateral			Orelhas baixo implantadas e voltadas para trás, epicanto bilateral, hipertelorismo, boca larga e triangular, ponte nasal larga com filtro curto e dentes irregulares	MS e MI menores à esquerda e sindactilia dos segundos e terceiros dedos dos MMII		Hiperglicemia, hemiparesia esquerda, CIA e CIV
DA5	DPAC			Hipertelorismo, hipoplasia da face média, incisivos proeminentes e palato ogival		Criptorquidia esquerda	
DA6	Condutiva unilateral	Estrabismo		Dolicocefalia			
DA7	DPAC		Deficiência intelectual	<i>Cutis verticis gyrata</i> a esquerda, perfil facial achatado, fenda palpebrais obliquas pra cima, orelhas voltadas para trás e pescoço alado		Hidrocele testicular	

Continuação.

	Auditivas	Visuais	Cognitivas/ comportamentais	Craniofaciais	Membros	Reprodutivas	Outras
DA8	Neurosensorial profunda bilateral	Miopia		Macrocrania, baixa implantação de cabelos e orelhas, fendas palpebrais retas e cantos da boca voltados para baixo	Dolicostenomelia	Baixa pilificação pubiana, hipogonadismo hipogonadotrófico e amenorreia secundária	Diabetes mellitus tipo II, lipodistrofia e hipertrigliceridemia
DA9	Mista moderada à direita e moderadamente grave à esquerda			Fronte alta e plana, fendas palpebrais retas, crista supra-ciliar apagada, ponta do nariz desabada com abas hipoplásicas, mordida cruzada, e prognatismo.	MMSS resistência a supinação e dedos dos MMSS e MMII curtos	Criptorquidia direita	
DA10	Neurosensorial moderada unilateral	Catarata		Face assimétrica, rarefação capilar, orelha esquerda desdobrada e menor que a direita			Estenose da junção uretero-piélica e hipoplasia e hipofunção renal
DA11	DPAC		Deficiência intelectual	Microcefalia, baixa implantação capilar, raiz nasal baixa com ponta bulbosa		Atraso puberal	
DA12	Conditiva por microtia grau III unilateral			Microcefalia, retrognatia, fronte ampla, implantação capilar alta, raiz nasal alta	Prega palmar única na mão direita		
DA13	Mista moderada com microtia grau III unilateral	Dermóide epibulbar		Fronte ampla, fendas palpebrais obliquas para cima, lábio superior fino e face triangular			Hipertrofia de adenoides

Continuação.

	Auditivas	Visuais	Cognitivas/ comportamentais	Craniofaciais	Membros	Reprodutivas	Outras
DA14	Condutiva bilateral, leve à direita e moderada à esquerda		Deficiência intelectual	Fendas palpebrais retas, nariz largo com columela curta e úvula bífida	Sindactilia nos dedos dos MMII		Constipação crônica e vertiligo
DA15	Mista leve com microtia grau III unilateral	Miopia		Apêndice auricular à esquerda	Sindactilia nos dedos dos MMII e membranas interdigitais nos MMSS		
DA16	Neurosensorial grave bilateral		Deficiência intelectual	Microcefalia, fendas palpebrais retas, nariz com raiz alta e asas hipoplásicas, palato alto, orelhas voltadas para trás e agenesia do corpo caloso	MI esquerdo maior que direito e quirodáctilos diminuídos bilateralmente		Crises convulsivas

4.2 MICROARRANJOS SUBMICROSCÓPICOS

Todos os casos apresentaram CNVs classificados convencionalmente como polimorfismo devido a presença de registros no DGV. Porém, foram observadas alterações em cinco (31,25%) dos 16 casos estudados, sendo quatro com CNVs raras e um com perda de heterozigose.

Nesse estudo, considerou-se CNVs raros aqueles em que se observou baixo número de registros no DGV, isto é, abaixo de três alterações que incluem todo o segmento observado ou que incluem minimamente os exons presentes no segmento. Para esses casos, buscou-se informações no DECIPHER e na literatura, como outros pacientes em que se observou ao menos parte do CNV em questão, os genes contidos nessas CNVs e suas respectivas funções. Serão discutidos os cinco casos que apresentaram microarranjos raros. Os demais encontram-se no apêndice A.

Considerando os cinco casos, 40% (2/5) foram variações *de novo* e 60% (3/5) herdadas (Tabela 4). Pelo menos 60% (3/5) dos casos estudados mostram alterações possivelmente patogênicas, e um desses apresentou duas CNVs distintas. As demais alterações observadas destacam regiões que são potencialmente importantes para os casos e destacam genes alvos que devem ser melhor investigados. Nos casos apresentados, todos os CNVs analisados encontram-se no DGV, porém em frequência muito baixa, enquanto nos demais trabalhos dessa natureza esse tipo de CNV foi excluído das análises.

Tabela 4. Alterações submicroscópicas consideradas raras nos pacientes estudados. Em que LOH significa perda de heterozigose (do inglês *loss of heterozygosity*); DEL deleção e DUP duplicação.

Paciente	Tipo	Cromossomo	Banda	Tamanho (kb)	N° de sondas	N° de genes	Origem
DA4	LOH	3	p21.31	6.318	213	171	<i>De novo</i>
DA5	DUP	1	p36.32	241	71	6	<i>De novo</i>
DA8	DUP	14	q24.3	600	172	6	Herdada do pai
DA12	DEL	10	q11.22	1.005	25	13	Herdada da mãe
	DEL	10	q26.2	862	234	4	Herdada do pai
DA14	DEL	2	q13	1.729	427	12	Herdada da mãe

Dois estudos realizados com pacientes com surdez síndrômica identificaram variações raras (não observadas no DGV) entre 27% e 31% dos pacientes e consideraram as CNVs encontradas patogênicas em 14% a 17% dos casos (KREPISCHI-SANTOS *et al.*, 2006 CATELANI *et al.*, 2009). Apesar de nenhuma das alterações encontradas no presente trabalho ser comprovadamente patogênica, os resultados obtidos estão de acordo com o esperado para uma população de deficientes auditivos com quadros síndrômicos (Tabela 5).

Tabela 5. Comparação dos resultados observados no presente estudo com outros trabalhos que avaliaram a presença de alterações submicroscópicas em pacientes com deficiência auditiva síndrômica.

Variações raras (%)	Variações (possivelmente) patogênicas (%)	Referência
31	19	Presente estudo
31	17	KREPISCHI-SANTOS <i>et al.</i> , 2006
27	14	CATELANI <i>et al.</i> , 2009

Ressalta-se que nenhuma alteração recorrente foi observada entre os pacientes e não foi possível identificar nenhuma CNV em *loci* previamente descritos para síndromes conhecidas. Esses fatos reforçam a heterogeneidade genética empregada à deficiência auditiva.

4.3 APRESENTAÇÃO DO CASOS COM ALTERAÇÕES ESTRUTURAIIS

4.3.1 Paciente DA4

Refere-se à paciente com 7 anos de idade do sexo feminino, que nasceu por parto normal com 32 semanas de gestação. No período pós-natal imediato foram observadas pneumonia, hiperglicemia, icterícia, desnutrição e hemorragia digestiva. A paciente apresenta perda auditiva neurosensorial leve à esquerda, dismorfias faciais com hipertelorismo, epicanto, ponte nasal larga e filtro curto, boca larga e triangular, dentes irregulares e microretrognatia. As orelhas são baixo implantadas e voltadas para trás. A paciente apresenta sindactilia do segundo e terceiro dedos de ambos os pés, membros (superior e inferior) menores à esquerda e hemiparesia também à esquerda. Apresenta também cardiopatia congênita, que inclui comunicação interatrial do tipo *ostium secundum* e comunicação interventricular perimembranosa trabecular corrigidas em cirurgia.

A paciente DA4 foi encaminhada para o Serviço de Genética Clínica com hipótese diagnóstica da síndrome de Robinow (*OMIM* #268310). A síndrome de Robinow é uma síndrome de amplo espectro clínico caracterizada principalmente pelo encurtamento mesomélico de membros, baixa estatura, características faciais típicas (nariz pequeno com narinas antevertidas, hipertelorismo, hipoplasia da face média) e anomalias genitais. Características menos comuns incluem defeitos cardíacos e auditivos (MAZZEU *et al.*, 2007). Essa síndrome pode apresentar herança autossômica recessiva causada por mutações no gene *ROR2* (*OMIM* *602337) ou autossômica dominante causada por mutações em *WNT5A* (*OMIM* *164975) ou em *DVL1* (*OMIM* *601365). Esses três genes participam da via de sinalização WNT, que é essencial para a proliferação, crescimento, migração e diferenciação celular durante o desenvolvimento embrionário (AFZAL, *et al.*, 2000; PERSON *et al.*, 2010; GAO, *et al.*, 2011; YANG, 2012; WHITE, *et al.*, 2015).

O resultado da CMA da paciente (Figura 4) mostrou uma perda de heterozigose de aproximadamente 6 Mb em 3p21.31, que inclui 171 genes (Apêndice B). Dentre esses genes, destacam-se dois, *RHOA* e *TMIE*, por apresentarem funções relacionadas com o quadro clínico da paciente.

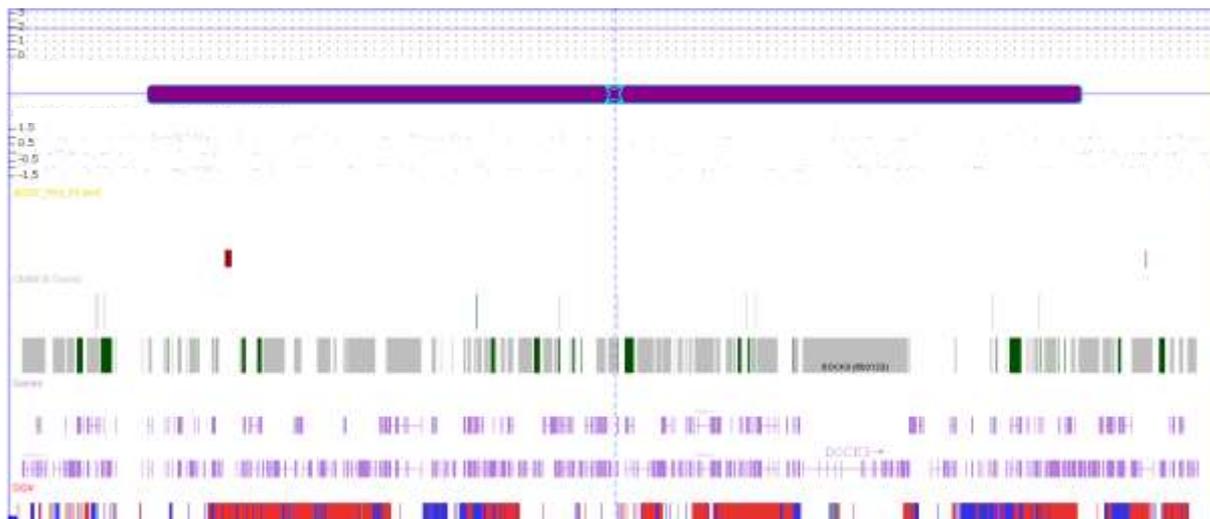


Figura 4. Perda de heterozigose observada em 3p21.31 da paciente DA4. Imagem gerada pelo software ChAS (Affymetrix), onde a barra roxa representa a perda de heterozigose e as barras em cinza e em verde representam os genes presentes nessa alteração.

O gene *TMIE* (OMIM *607237) (*transmembrane inner ear*) destaca-se por seu envolvimento no correto desenvolvimento das células ciliadas da cóclea e mutações nesse gene causam surdez neurossensorial não síndrômica de herança autossômica recessiva (MITCHEM *et al.*, 2002; NAZ *et al.*, 2002; GLEASON *et al.*, 2009). Como trata-se de uma região de perda de heterozigose, a presença de um alelo deletério poderia explicar a deficiência auditiva da paciente.

O gene *RHOA* (OMIM *165390), por sua vez, codifica uma *GTPase* que regula a remodelagem do citoesqueleto celular durante a morfogênese e durante a mobilidade celular. *RHOA* também participa de processos de desenvolvimento tecidual (osteogênese e miogênese) e embrionário (gastrulação) (MCBEATH *et al.*, 2004; NAKAYA *et al.*, 2008). Além disso, esse gene atua como regulador transcricional (HILL *et al.*, 1995). Uma das vias de sinalização, onde *RHOA* atua é a via WNT, a mesma que os três genes já ligados à síndrome de Robinow participam (YANG, 2012).

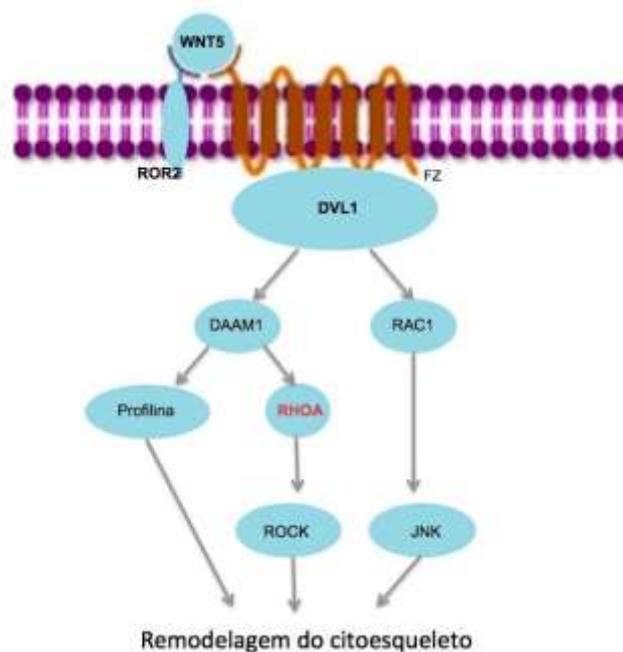


Figura 5. Esquema simplificado da via WNT não canônica. Destaca-se os genes *WNT5*, *ROR2* e *DVL1* associados à síndrome de Robinow. O gene *RHOA*, observado nesse estudo está destacado em vermelho.

Além da paciente apresentar sinais clínicos da síndrome de Robinow, essa hipótese foi reforçada pela presença do gene *RHOA* na perda de heterozigose. Em caso de dissomia uniparental, quando ambos cromossomos homólogos ou parte deles são originados de apenas um genitor (pai ou mãe), o quadro clínico do paciente pode ser causado pela herança de um alelo deletério de um genitor heterozigoto para uma doença recessiva. Sugere-se que os genes *RHOA* e *TMIE* sejam sequenciados para averiguar a presença de mutações pontuais nesses genes.

4.3.2 Paciente DA5

Refere-se ao paciente do sexo masculino com 11 anos de idade diagnosticado com DPAC e deficiência intelectual. Além disso, observou-se criptorquidia à esquerda, hipertelorismo ocular, hipoplasia da face média, incisivos grandes e proeminentes, palato ogival e hérnia inguinal à direita.

Na análise de *CMA* desse paciente foi observada uma duplicação em heterozigose em 1p36.32 de 241 kb (1:3.312.087-3.553.225) não herdada (Figura 5). Essa região abrange os genes *PRDM16* (605557), *MEGF6* (604266), *MIR551A* (615148), *TPRG1L* (611460) e *WRAP73* (606040). Há registros dessa região no *DGV*, porém em um único caso foi observada uma duplicação que abrange todo o segmento notado em DA5. Esse indivíduo compõe uma amostra de 270 sujeitos controles estudados por REDON *et al.*, 2006, o que revela uma frequência de 0,4%. Outros estudos presentes no *DGV* registraram duplicações menores que a observada em DA5.

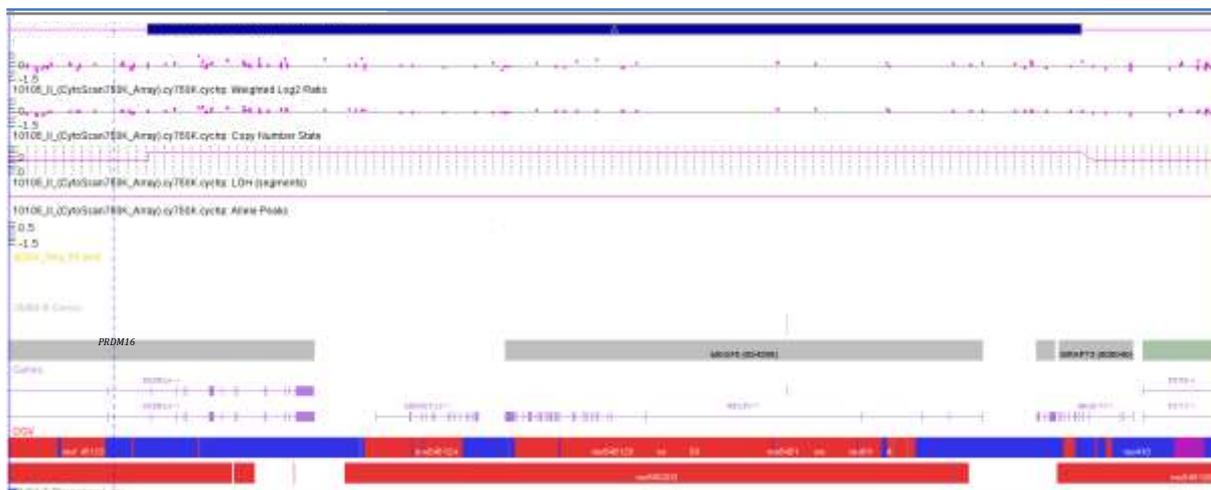


Figura 6. Duplicação observada em 1p36.32 do paciente DA5. Imagem gerada pelo *software* ChAS (*Affymetrix*), em que a barra azul representa a duplicação observada e as barras em cinza e verde representam os genes presentes na alteração.

No banco de dados *DECIPHER* observa-se um paciente (#284022) com orelhas anormais, hérnia diafragmática, hidrocefalia e tetralogia de *Falot*. Esse paciente apresenta uma duplicação de 336 kb que inclui o fragmento duplicado no paciente DA5. No entanto, o indivíduo do *DECIPHER* possui alterações adicionais nos cromossomos 4 e 9, o que dificulta relacionar a duplicação em 1p36.32 com o fenótipo desse paciente.

Deleções em 1p36 são relativamente comuns, atingindo um a cada 5.000 recém nascidos (HEILSTEDT *et al.*, 2003). Essa alteração permite agrupar pacientes na síndrome da deleção 1p36, que abrange deficiência intelectual e múltiplas anomalias congênitas. Shapira *et al.* (1997) caracterizou clinicamente pacientes com deleções em 1p36 identificadas por citogenética clássica. As principais características observadas foram atraso do desenvolvimento motor, deficiência intelectual, atraso de crescimento, problemas visuais, convulsões, clinodactilia, orelhas baixo implantadas e ou assimétricas, deficiência auditiva e distúrbio de comportamento. Adicionalmente, outras características como hipertelorismo, fenda palatina e hipoplasia da face média também foram observadas.

Duplicações na região observada no paciente DA5 são mais raras. Tonk (2005) relatou um caso familiar (três indivíduos afetados) de duplicação de aproximadamente 10 Mb em 1p36. Uma menina de 15 anos com deficiência intelectual grave, face alongada, hipertelorismo, ponta do nariz larga, orelhas malformadas, boca grande com incisivos grandes e dentes mal posicionados. Seu irmão apresentou déficit de atenção, assimetria da face média, ptose, nariz proeminente, orelhas baixo implantadas e incisivos proeminentes. A mãe das crianças não apresentou problemas intelectuais, mas também apresenta assimetrias faciais, orelhas simplificadas e baixo implantadas e incisivos proeminentes.

Outro caso é o de uma garota de 8 anos com um ganho de 5,28 Mb em 1p36.32-p36.33. Essa menina apresentou histórico de convulsão, atraso do desenvolvimento motor e linguagem, deficiência intelectual e distúrbios de comportamento. Além disso, observou-se estrabismo, hipertelorismo, baixa implantação capilar, orelhas malformadas, ponte nasal ampla, boca larga com incisivos grandes e proeminentes (XU *et al.*, 2014).

As características clínicas do paciente DA5 foram observadas, ao menos parcialmente, em outros pacientes com alterações cromossômicas na mesma região (Tabela 6), sugerindo a importância dessa região no quadro clínico do paciente. Os casos de duplicação de 1p36.32 são raros e incluem diversas características. No entanto, ressalta-se a presença de fenótipos comuns como as dismorfias faciais que incluem o hipertelorismo, alterações nas orelhas e nariz, boca grande com incisivos proeminentes e diferentes graus de deficiência intelectual. Embora a duplicação de DA5 seja pequena (241 kb) em relação aos outros pacientes relatados com duplicação na mesma região, a sobreposição de características fenotípicas corrobora a importância dessa duplicação no caso estudado.

Tabela 6. Comparação das características clínicas observadas em DA5 com o observado em outros pacientes presentes na literatura com duplicações em 1p36.

	DA5	Tonk (2005)	Xu, et al. (2014)
Tamanho da alteração	241kb	>10 Mb	>5 Mb
Deficiência auditiva	x		
Deficiência intelectual	x	x	x
Orelhas malformadas		x	x
Hipertelorismo	x	x	x
Incisivos proeminentes	x	x	x
Hipoplasia da face média	x		
Palato ogival	x		

Dentre os genes contidos na duplicação, o *PRDM16* (OMIM *605557) é candidato a explicar, ao menos em parte, a síndrome de deleção de 1p36. Segundo Scott *et al.* (2015), *PRDM16* contribui com o desenvolvimento de cardiomiopatias, que também constituem a clínica da síndrome. Porém, esse gene pode ter uma contribuição ainda maior para os fenótipos de pacientes com rearranjos, tanto deleções como duplicações em 1p36. *Prdm16* codifica um cofator transcricional que regula a sinalização de TGF- β (*transforming growth factor beta*) que atua no desenvolvimento craniofacial. Mutações intrônicas no mesmo gene causam fenda palatina em roedores (Bjork *et al.*, 2010). Ainda, Warner (2013) sugeriu que *Prdm16* funciona como regulador de genes chaves na diferenciação de células mesenquimais em condrócitos e osteócitos. Além disso, um estudo do desenvolvimento embrionário de roedores observou a expressão de *Prdm16* em vários tipos teciduais, cérebro e outros tecidos neurais (como o gânglio vestibulococlear –VIII), arcos branquiais, epitélio pulmonar, fígado, estômago, intestinos e olhos (HORN *et al.*, 2011). Portanto, sugere-se que principalmente as alterações craniofaciais, mas também as alterações neuropsicomotoras observadas no paciente estudado possam estar relacionadas à dosagem desse gene.

4.1.3 Caso DA8

Refere-se à paciente de 22 anos, sexo feminino, filha de pais consanguíneos que desenvolveu perda auditiva neurossensorial profunda pós-lingual com início aos 20 anos. Nega

exposição ocupacional a ruídos ou contato com medicamentos ototóxicos. O exame de ressonância magnética nuclear de mastoides indicou leucodistrofia. A paciente também apresenta miopia, diabetes mellitus tipo 2, amenorreia secundária, hipogonadismo hipogonadotrófico, lipodistrofia e hipertrigliceridemia, além de histórico de diarreias prolongadas, gastrite (por *H. pylori*), cólica e cefaleia frequentes.

A aparência da paciente é emagrecida com dolicoestenomelia. As implantações dos cabelos e orelhas são baixas e apresenta fendas palpebrais retas, ptose, lábios finos com cantos voltados para baixo. Observou-se redução da pilificação pubiana.

O irmão da paciente, com 18 anos, também apresenta aparência emagrecida tendo diminuição global da musculatura e tecido subcutâneo. A face é assimétrica com olhos fundos e fendas oblíquas, nariz bulboso e queixo pontudo. Até o momento, ele não desenvolveu problemas auditivos, mas sofreu perda progressiva da visão.

Foi levantada a hipótese diagnóstica de síndrome de encefalopatia neurogastrointestinal mitocondrial tipo 1 (*MNGIE*) (*OMIM* #603041) pela equipe de genética clínica do HUB. Trata-se de uma síndrome progressiva com aparecimento por volta da segunda década de vida do paciente. A característica mais comum dessa síndrome é a presença de problemas digestivos como dismotilidade gastrointestinal, disfagia, dor abdominal, diarreia e sensação de saciedade ao ingerir uma pequena quantidade de alimento. Esses problemas gastrointestinais levam o paciente a caquexia. A presença de leucoencefalopatia, oftalmoplegia (com ou sem ptose) e perda auditiva também são comuns nessa síndrome. *MNGIE* é causada por mutações no gene *TYMP* (*OMIM* *131222) e tem herança autossômica recessiva. Tratando-se de uma doença progressiva com início na segunda década de vida, caso a paciente DA8 apresente essa síndrome é possível que o quadro clínico sofra alterações ao longo do tempo, em especial com relação aos problemas gastrointestinais. A tabela 7 mostra as principais características clínicas da paciente, do seu irmão e os principais sinais encontrados em pacientes com *MNGIE*. Cabe investigar se a paciente apresenta mutações nesse gene.

Tabela 7. Comparação das principais características clínicas presentes em DA8, seu irmão e na síndrome *MNGIE*.

	DA8	Irmão de DA8	MNGIE
Perda auditiva	x		x
Perda visual	x	x	x
Leucoencefalopatia	x		x
Hipogonadismo hipogonadotrófico	x		
Amenorreia secundária	x		
Lipodistrofia	x		
Hipertrigliceridemia	x		
Diabetes	x		
Problemas gastrointestinais	x	x	x
Aparência emagrecida	x	x	x
Dolicoestenomelia	x	x	

Quando a hipótese de *MNGIE* foi proposta, a paciente já havia passado pelo exame de *CMA*. Nenhum rearranjo submicroscópico foi identificado no cromossomo 22 onde localiza-se o gene *TYMP*. Porém, foi observada uma duplicação em heterozigose de 600 kb em 14q24.3 (14:76.734.585-77.334.380) que contém seis genes, *RNU6-19P*, *RNU6-31P*, *ESRRB* (OMIM *602167), *VASH1* (OMIM *609011), *ANGEL1* e *C14orf166B* (Figura 6). Essa duplicação está presente também no irmão da paciente, que compartilha algumas características com a mesma. A duplicação foi herdada do pai, que não apresenta as alterações fenotípicas dos filhos (Figura 7). Existem poucos registros de alterações nessa região no *DVG* e no *DECIPHER* e nenhum dos registros se assemelha ao caso apresentado.

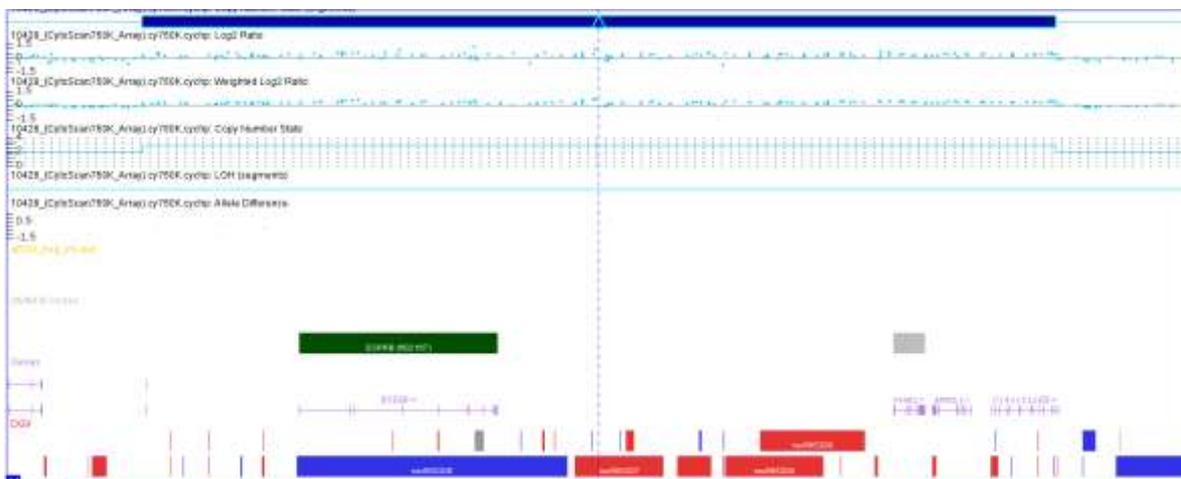


Figura 7. Duplicação observada em 14q24.3 da paciente DA8. Imagem gerada pelo software *ChAS (Affymetrix)*, em que a barra azul representa a duplicação e as barras verde e cinza representam os genes presentes na alteração.

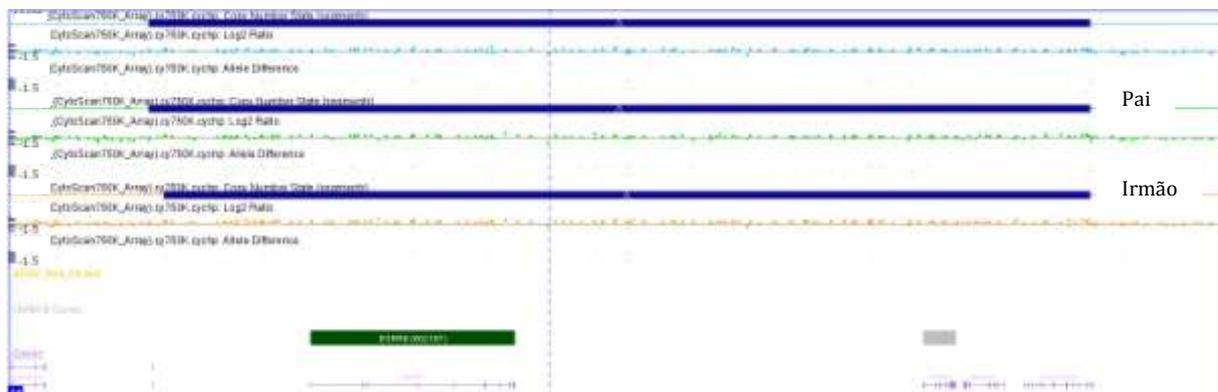


Figura 8. Duplicação observada em 14q24.3 da paciente DA8 é herdada do pai e observada também em seu irmão. Imagem gerada pelo software *ChAS (Affymetrix)*, em que as barras azuis representam as duplicações e as barras verde e cinza representam os genes presentes na alteração.

Dentre os genes contidos nessa duplicação evidencia-se a presença do gene *ESRRB*, que é um receptor relacionado ao estrogênio. Há dois registros de duplicações no *DGV* que incluem esse gene, ambos foram observados em indivíduos controles de estudos com deficientes intelectuais, juntos esses indivíduos representam uma frequência de 0,02% (COE *et al.*, 2014; COOPER *et al.*, 2011). *Esrrb* participa do desenvolvimento da orelha interna de ratos e foi observada a expressão desse gene também no desenvolvimento da cóclea humana. Mutações em *ESRRB* causam perda auditiva não síndrômica autossômica recessiva (*DFNB35*) (COLLIN *et al.*, 2008). Além disso, a

dosagem de *ESRRB* altera a composição corpórea. O trabalho de (BYERLY *et al.*, 2013) mostrou que em ratos com deleção de *Esrrb* observa-se a diminuição da massa gorda e a secreção de hormônios associados ao estresse aumentada em relação ao tipo selvagem. *ESRRB* também é expresso no endométrio de mulheres saudáveis durante o ciclo menstrual (BOMBAIL *et al.*, 2011). Portanto, esse gene pode estar relacionado a parte dos fenótipos apresentados pela paciente.

A avaliação clínica da paciente é indicativa da síndrome de MNGIE e, como a paciente é filha de pais consanguíneos, ela e o irmão possuem chances aumentadas de herdarem alelos que causam doenças recessivas. Torna-se necessário identificar a presença de mutações em *TYMP* que confirmem a proposta diagnóstica. Porém, essa síndrome não explica totalmente o quadro síndrômico apresentado. Portanto sugere-se que a duplicação em 14q24.3 também possa contribuir para a etiologia do quadro clínico da paciente.

4.1.4 Paciente DA12

Refere-se ao paciente do sexo masculino com 1 ano de idade que apresenta microtia grau III, microcefalia, retrognatia, fronte ampla, implantação capilar e raiz nasal alta, além prega palmar única à direita. O paciente apresenta proposta diagnóstica de síndrome de Goldenhar.

Foram observadas duas deleções em heterozigose no cromossomo 10. A primeira, de aproximadamente 1 Mb em 10q11.22 (10:47.121.494-48.126.560) (Figura 8), inclui 13 genes: *LINC00842*, *HNRNPA1P33*, *ANXA8* (602396), *ANXA8L1*, *FAM25G*, *FAM25C*, *FAM25B*, *AGAP9*, *BMS1P6*, *BMS1P2*, *FAM35DP*, *ANXA8L2* e *FAM21B*. A segunda deleção de 862 kb em 10q26.2 (10:128.766.997-129.628.500) (Figura 9) contém quatro genes, *DOCK1* (601403), *FAM196A*, *NPS* (609513) e *FOXI2*.

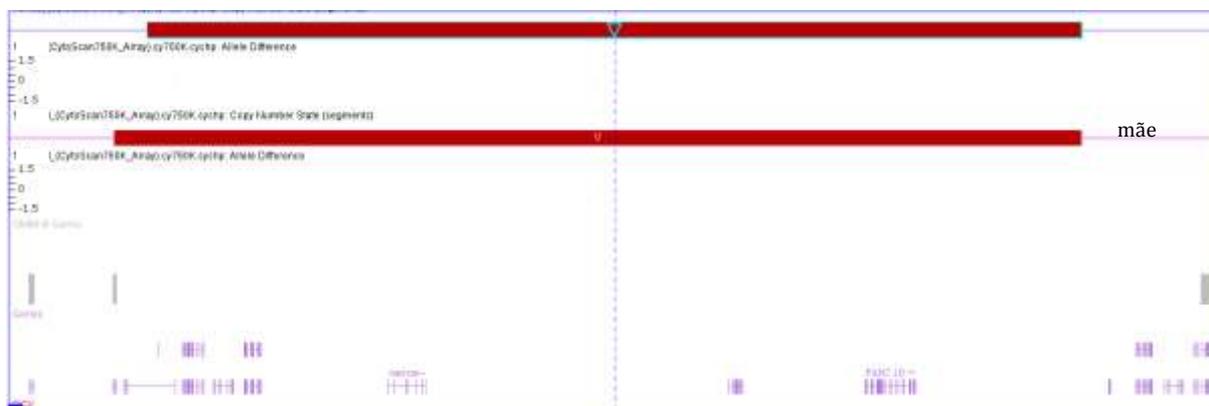


Figura 9. Deleção observada em 10q11.22 do paciente DA12 herdada da mãe. Imagem gerada pelo software ChAS (Affymetrix), em que as barras vermelhas representam as deleções.



Figura 10. Deleção observada em 10q26.2 do paciente DA12 herdada do pai. Imagem gerada pelo software ChAS (Affymetrix), em que as barras vermelhas representam as deleções.

Apesar das deleções serem grandes e englobarem um número considerável de genes, ambas foram herdadas de pais saudáveis (a primeira da mãe e a segunda do pai). Alterações nessas regiões, principalmente duplicações, mas também deleções, foram observadas no DGV. De acordo com o protocolo padrão de análise de CMA, esses microarranjos seriam excluídos de serem explicativos da etiologia da doença, pois observou-se herança dos mesmos e ocorrência em banco de dados de controles. No entanto, deve-se considerar a possibilidade de interação dos genes contidos nas duas duplicações, além da ocorrência de genes ainda pouco conhecidos participarem ou regulararem vias importantes para o quadro observado.

Dentre os genes presentes em 10q26.2, destaca-se o *FOXI2*. Os genes *FOXI* estão envolvidos no desenvolvimento craniofacial e têm sido relacionados a deficiências no sistema auditivo. *FOXI1*, por exemplo, é um fator de transcrição de *SLC26A4* e está relacionado à perda auditiva não síndrômica com alargamento do aqueduto vestibular e à síndrome de Pendred (YANG et al., 2007). Já *FOXI3* foi associado à atresia aural congênita em uma paciente com uma deleção de 2,5 Mb em 2p11.2 (TASSANO, et al., 2015). *FOXI2* não foi diretamente associado a malformações da orelha até o momento. No entanto, estudos em modelo animal (*zebrafish* e ratos) mostram que esse gene é expresso durante o desenvolvimento craniofacial, principalmente no ectoderma do primeiro e segundo arcos faríngeos (SOLOMON et al., 2003; OHYAMA e GROVES, 2004). Em seres humanos, sabe-se que o pavilhão auricular se origina das saliências auriculares que surgem as margens do primeiro e o segundo arco faríngeo (CORREA, 2002). Desta forma, propõe-se que *FOXI2* tenha função na formação do pavilhão auricular e que alterações na dosagem desse gene potencialmente levem a malformações na orelha externa.

Sugere-se, portanto, que a deleção do *FOXI2* esteja ligada ao quadro de microtia apresentado pelo paciente e que ocorra penetrância incompleta dessa alteração, já que trata-se de uma deleção de herança paterna. Ou, ainda, que a baixa dosagem do produto desse gene leve a predisposição ao fenótipo e, associado a outras alterações genéticas, por exemplo, a deleção herdada da mãe, e ou ambientais, levem ao quadro observado.

4.1.5 Paciente DA14

Refere-se ao paciente do sexo masculino com 12 anos de idade que apresenta perda auditiva condutiva leve a direita, moderada à esquerda e deficiência intelectual. Além disso, exibe úvula bífida, constipação intestinal crônica e vitiligo na genitália, pés e tornozelos. O nariz possui ponta e dorso largos com columela curta, as fendas palpebrais são retas e foi observado sindactilia nos dedos dos pés.

Observou-se uma deleção de 1,7 Mb em 2q13 (2:111,382,573-113,111,856) (Figura 10) que inclui os genes *BUB1* (602452), *BCL2L11* (603827), *ANAPC1* (608473), *MERTK* (604705), *FBLN7* (611551), *ACOXL*, *MIR4435-1*, *MIR4435-2*, *LOC541471*, *TMEM87B*, *ZC3H8* e *ZC3H6*.

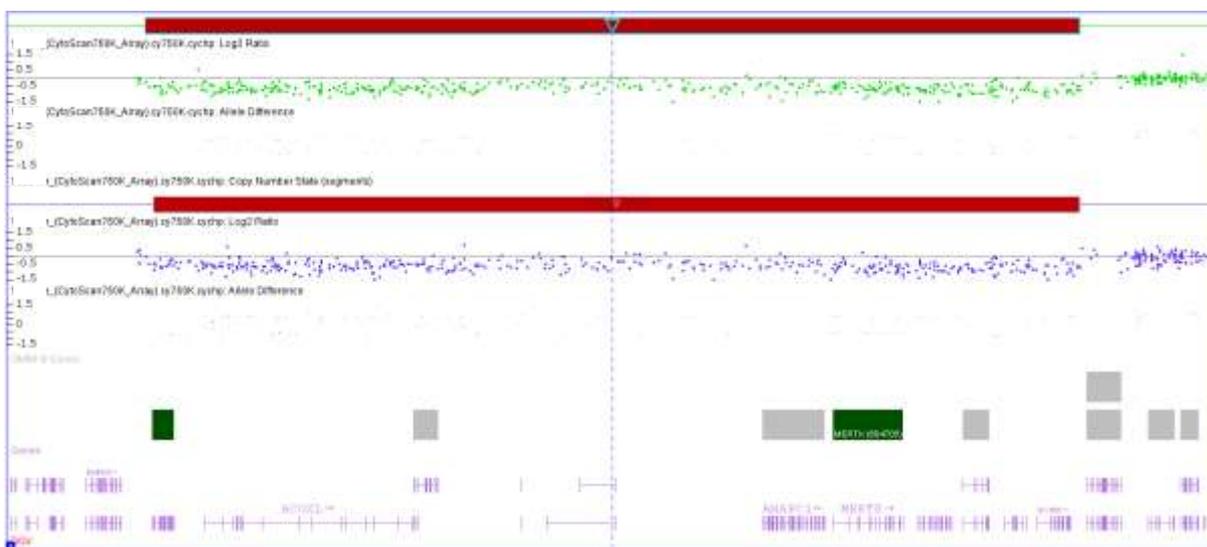


Figura 11. Deleção observada em 2q13 do paciente DA14 herdada da mãe. Imagem gerada pelo software ChAS (Affymetrix), em que as barras vermelhas representam as deleções.

Foram observadas três deleções em 2q13 presentes no *DGV* que se sobrepõem ao rearranjo observado no paciente (COOPER *et al.*, 2011; COE *et al.*, 2014). Bisgaard *et al.* (2007) também observaram uma deleção de 1,8 Mb em um paciente com deficiência intelectual, assim como em seu irmão com atraso do desenvolvimento motor. A deleção foi considerada irrelevante para o caso, pois foi herdada da mãe que não apresentava alterações fenotípicas.

Apesar de deleções em 2q13 terem sido relatadas em indivíduos controles ou como não causativas de doenças, o trabalho realizado por Cooper *et al.* (2011) identificou a presença da alteração estudada em um dentre 8.329 (0,01%) indivíduos controles analisados. Esse paciente foi relatado no *DGV*. Por outro lado, alterações em 2q13 foram observadas em 12 dos 15.767 (0,07%) pacientes com deficiência intelectual ou atraso do desenvolvimento analisados no mesmo estudo. Esse trabalho sugere que alterações nessa região podem ser patogênicas (COOPER *et al.*, 2011).

Indivíduos registrados no *DECIPHER* com alterações em 2q13 também foram observados e apresentam principalmente deficiências cognitivas e motoras. Dentre eles, destaca-se um caso semelhante ao de DA14. O paciente (#275128) apresenta deficiência intelectual e perda auditiva condutiva. Nesse caso, a deleção 2q13 do paciente foi herdada do pai que também é deficiente intelectual e a alteração foi classificada como patogênica no banco de dados.

Além desses pacientes, Hladilkova *et al.* (2015) descreveram dois casos de deleção em 2q13. Um dos pacientes nasceu com hérnia umbilical, microcefalia, estrabismo e dismorfias faciais, além disso, desenvolveu deficiência intelectual. O segundo paciente apresentou autismo, habilidades cognitivas limítrofes, deficiência auditiva devido a infecções recorrentes da orelha média, déficit de atenção e dismorfias da face média. A sobreposição dos rearranjos identificados nos dois pacientes, com cerca de 1,7 Mb, coincide com a região de deleção do paciente DA14. Além disso, o quadro clínico desses dois pacientes se assemelha, em parte, ao caso estudado, o que corrobora a importância dessa região para o quadro clínico observado (Tabela 8).

Tabela 8. Comparação das características clínicas observadas no paciente DA14 com as características presentes no paciente #2755128 do *DECIPHER* e os pacientes estudados por Hladilkova *et al.* (2015).

	DA14	<i>DECIPHER</i>	Hladilkova <i>et al.</i> (2015)	
		#2755128	Paciente 1	Paciente 2
Deficiência auditiva condutiva	x	x		x
Deficiência intelectual	x	x	x	x
Microcefalia			x	
Estrabismo			x	
Hérnia umbilical			x	
Úvula bífida	x			
Sindactilia (pés)	x			
Constipação intestinal	x			
Vitiligo	x			

Cabe ressaltar que a deleção 2q13 do paciente DA14 foi herdada da mãe que não apresenta as alterações fenotípicas do filho. A herança dessa deleção de genitores saudáveis se repete em outros pacientes descritos na literatura. Um dos pacientes descritos por Hladilkova *et al.* (2015), por exemplo, herdou a deleção em 2q13 da mãe e a mesma alteração foi observada na avó materna, ambas saudáveis. Dessa forma, apesar dos padrões de herança observados, não é possível descartar a patogenicidade dessa alteração, pois pode se tratar de um caso de penetrância incompleta.

Outros sinais clínicos também foram associados a deleção em 2q13, como esquizofrenia e malformações cardíacas (COSTAIN *et al.*, 2013; RUSSELL *et al.*, 2014). Um estudo que utilizou *zebrafish* como modelo animal identificou contribuições dos genes *TMEM87B* e *FBLN7* no desenvolvimento cardíaco e craniofacial. Esses genes podem ser responsáveis também por outros fenótipos observados em pacientes, porém o modelo utilizado limitou a observação de outras características como a deficiência intelectual (RUSSELL *et al.*, 2014). As deficiências do neurodesenvolvimento já foram atribuídas a outros genes presentes nesse intervalo, principalmente *BCL2L11* e *ACOXL*, previamente descritos como associados ao autismo (WIEST, 2009 e SHEIKH *et al.*, 2010). O gene *BCL2L1* codifica a proteína reguladora de apoptose neuronal (ADAMS e CORY, 1998). Enquanto *ACOXL* codifica uma proteína importante no metabolismo de ácidos graxos (WIEST,

2009).

Os pacientes com deleção 2q13 apresentam um quadro possivelmente patogênico com expressividade variável e penetrância incompleta. Algumas explicações para esses padrões seriam diferentes *breakpoints* das deleções entre os pacientes, uma alteração em heterozigose em acréscimo à CNV, ou ainda a deleção de 2q13 poderia ser um fator de risco que associada à mutação de um gene que interage com algum dos contidos na deleção poderia levar ao fenótipo observado (HLADILKOVA *et al.*, 2015).

5 CONCLUSÃO

- Alterações cromossômicas submicroscópicas, comuns ou raras, estão presentes nos pacientes estudados e as raras podem auxiliar no melhor entendimento dos quadros sindrômicos descritos.
- Dos pacientes estudados, cinco (31,25%) apresentaram alterações cromossômicas submicroscópicas raras.
- A presença de perda de heterozigose em 3p21.31 da paciente DA4 revelou dois genes candidatos a explicarem o quadro observado. O gene *TMIE* pode estar contribuindo para o desenvolvimento da perda auditiva da paciente, enquanto o gene *RHOA* corrobora a hipótese diagnóstica de síndrome de Robinow, já que esse gene participa de uma via importante dessa síndrome.
- A duplicação em 1p36.32 identificada no paciente DA5 foi considerada possivelmente patogênica devido a presença de casos semelhantes relatados com alterações na mesma região cromossômica, que inclui o gene *PRDM16* relevante no desenvolvimento craniofacial.
- A avaliação clínica da paciente DA8 é indicativa da síndrome de *MNGIE*, porém, essa síndrome não explica totalmente o quadro sindrômico apresentado. Propõe-se que a duplicação em 14q24.3 também possa contribuir para a etiologia do quadro clínico da paciente.
- Sugere-se que os genes contidos nas duas deleções observadas no cromossomo 10 do paciente DA12 possam interagir e contribuir para o fenótipo observado. Dentre os genes presentes nas alterações, destaca-se o gene *FOXI2* e propõe-se que esse gene esteja ligado ao quadro de microtia apresentado pelo paciente.
- A deleção em 2q13 identificada no paciente DA14 é observada em outros pacientes com quadros sindrômicos semelhantes e com deleções na mesma região cromossômica. Os quadros clínicos desses pacientes são variáveis com penetrância incompleta.
- Nenhuma das alterações observadas foi recorrente entre os pacientes estudados, assim como nenhum microarranjo previamente descrito como causativo de síndrome genética bem estabelecida foi identificado nesses pacientes, o que corrobora a heterogeneidade genética observada na etiologia da deficiência auditiva sindrômica.

6. REFERÊNCIAS

- ADAMS, J.M. e CORY, S. The Bcl 2 protein Family: arbiters of cell survival. **Science**, v. 281, p. 1322-1326, 1998.
- AFZAL, A.R. *et al.* Recessive Robinow syndrome, allelic to dominant brachydactyly type B, is caused by mutation of *ROR2*. **Nature Genetics**, v. 25, p. 419-422, 2000.
- 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 : Official Journal of the American College of Medical Genetics**, v. 16, n. 4, p. 347–55, 2014.
- ANGELI, S.; LIN, X.; LIU, X. Z. Genetics of Hearing and Deafness. **Anatomical Record**, v. 295, n. 11, p. 1812–1829, 2012.
- BJORK, *et al.* *Prdm16* is required for normal palatogenesis in mice. **Human Molecular Genetics**, v. 19, p. 774-789, 2010.
- BATISSOCO, A. C. *et al.* Prevalence of GJB2 (connexin-26) and GJB6 (connexin-30) mutations in a cohort of 300 Brazilian hearing-impaired individuals: implications for diagnosis and genetic counseling. **Ear and Hearing**, v. 30, n. 1, p. 1–7, 2009.
- BISGAARD, A.M. *et al.* Transmitted cytogenetic abnormalities in patients with mental retardation: Pathogenic or normal variants? **European Journal of Medical Genetics**, v. 50, n. 4, p. 243–255, 2007.
- BITNER-GLINDZICZ, M. Hereditary deafness and phenotyping in humans. **British Medical bulletin**, p. 73–94, 2002.
- BOMBAIL, V. *et al.* Estrogen receptor related beta is expressed in human endometrium throughout the normal menstrual cycle. **Human Reproduction**, v. 23; 18, n. 12, p. 2782; 227A–2790; 227A, 2011.
- BRASIL. Portaria 2.073 de 28 de setembro de 2004. Institui a Política Nacional de Atenção à Saúde Auditiva.
- BRASIL. Lei n° 12.303 de agosto de 2010. Dispõe sobre a obrigatoriedade de realização do exame denominado Emissões Otoacústicas Evocadas.
- BRIDGES, C. The BAR gene a duplication. **Bulletin of the Neurological Institute of New York**, v. 76, n. 2148, p. 106–107, 1936.
- BYERLY, M. S. *et al.* Estrogen-related receptor β deficiency alters body composition and response to restraint stress. **BMC Physiology**, v. 13, n. 1, p. 10, 2013.
- CALLIER, P. *et al.* Array-CGH in a Series of 30 Patients With Mental Retardation, Dysmorphic Features, and Congenital Malformations Detected an Interstitial 1p22.2-p31.1 Deletion in a Patient With Features Overlapping the Goldenhar Syndrome. **American Journal of Medical Genetics**, v. 146, p. 2109-2115, 2008
- CATELANI, A. *et al.* Chromosome imbalances in syndromic hearing loss. **Clinical Genetics**, v. 76, n. 5, p. 458–464, 2009.
- COE, B. P. *et al.* Refining analyses of copy number variation identifies specific genes associated with developmental delay. **Nature Genetics**, v. 46, n. 10, p. 1063–1071, 2014.
- COLLIN, R. W. J. *et al.* Mutations of *ESRRB* encoding estrogen-related receptor beta cause autosomal-recessive nonsyndromic hearing impairment DFNB35. **American Journal of**

- Human Genetics**, v. 82, n. 1, p. 125–138, 2008.
- CONRAD, D.F. *et al.* Origins and functional impact of copy number variation in the human genome, **Nature**, 464:704-712, 2010.
- COOPER, G. M. *et al.* A copy number variation morbidity map of developmental delay. **Nature Genetics**, v. 43, n. 9, p. 838–846, 2011.
- CORREA, E. M. Embriologia e histologia fonoaudiológica. **Guanabara Koogan**, 2002.
- COSTAIN, G. *et al.* Pathogenic rare copy number variants in community-based schizophrenia suggest a potential role for clinical microarrays. **Human Molecular Genetics**, v. 22, n. 22, p. 4485–4501, 2013.
- DANIEL, E. Noise and hearing loss: A review. **Journal of School Health**, v. 77, n. 5, p. 225–231, 2007.
- DROR, A. A.; AVRAHAM, K. B. Hearing loss: mechanisms revealed by genetics and cell biology. **Annual Review of Genetics**, v. 43, p. 411–437, 2009.
- DROR, A. A.; AVRAHAM, K. B. Hearing impairment: A panoply of genes and functions. **Neuron**, v. 68, n. 2, p. 293–308, 2010.
- ELLISON, J. W. *et al.* Clinical Utility of Chromosomal Microarray Analysis. **Pediatrics**, v. 130, n. 5, p. e1085–e1095, 2012.
- EMY DORFMAN, L. *et al.* Microarray- based comparative genomic hybridization analysis in neonates with congenital anomalies: detection of chromosomal imbalances. **Jornal de Pediatria (Versão em Português)**, v. 91, n. 1, p. 59–67, 2015.
- ESTIVILL, X. *et al.* Familial progressive sensorineural deafness is mainly due to the mtDNA A1555G mutation and is enhanced by treatment of aminoglycosides. **American Journal of Human Genetics**, v. 62, n. 1, p. 27–35, 1998.
- FEUK, L.; CARSON, A. R.; SCHERER, S. W. Structural variation in the human genome. **Nature Genetics Reviews**, v. 7, n. 2, p. 85–97, 2006.
- FINSTERER, J.; FELLINGER, J. Nuclear and mitochondrial genes mutated in nonsyndromic impaired hearing. **International Journal of Pediatric Otorhinolaryngology**, v. 69, n. 5, p. 621–647, 2005.
- GANANÇA, M. M., MUNHOZ, M. S. L., CAOVILLA, H. H., & SILVA, M. D. Utilidade clínica do exame otoneurológico. **RBM-ORL Otologia**, 57, 2-7, 2000.
- GAO, B. *et al.* Wnt signaling gradients establish planar cell polarity by inducing Vangl2 phosphorylation through Ror2. **Developmental Cell**, v. 20, p. 163-176, 2011.
- GATES, G. A; MILLS, J. H. Seminar Presbycusis. **Seminar**, p. 1111–1120, 2005.
- GLEASON, M. R. *et al.* The transmembrane inner ear (Tmie) protein is essential for normal hearing and balance in the zebrafish. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 106, n. 50, p. 21347–21352, 2009.
- GONZALEZ, E. *et al.* The influence of *CCL3L1* gene containing segmental duplications on HIV 1 AIDS susceptibility. **Science**. v. 307, p. 1434, 2005.
- HALLIDAY; RESNICK; WALKER . Fundamentos da Física, v. 2, 8ª Edição, **LTC**, 2009.
- HEILSTEDT, H. A *et al.* Population data suggest that deletions of 1p36 are a relatively common chromosome abnormality. **Clinical Genetics**, v. 64, n. 4, p. 310–316, 2003.

- HILL, C. S.; WYNNE, J.; TREISMAN, R. The Rho family GTPases RhoA, Rac1, and CDC42Hs regulate transcriptional activation by SRF. **Cell**, v. 81, n. 8, p. 1159–1170, 1995.
- HLADILKOVA, E. *et al.* A recurrent deletion on chromosome 2q13 is associated with developmental delay and mild facial dysmorphisms. **Molecular Cytogenetics**, v. 8, n. 1, p. 57, 2015.
- HOISCHEN, A. *et al.* Array-CGH in unclear syndromic nephropathies identifies a microdeletion in Xq22.3-q23. **Pediatric Nephrology**, v. 24, n. 9, p. 1673–1681, 2009.
- HORN, K. H. *et al.* PRDM16 expression in the developing mouse embryo. **Acta Histochemica**, v. 113, n. 2, p. 150–155, 2011.
- IAFRATE, A J. *et al.* Detection of large-scale variation in the human genome. **Nature Genetics**, v. 36, n. 9, p. 949–951, 2004.
- KEATS, B. J. B.; BERLIN, C. I. Genomics and Hearing Impairment Genomics and Hearing Impairment. **Genome Research**, n. 504, p. 7–16, 1999.
- KELSELL, D.P. *et al.* Connexin 26 mutations in hereditary non-syndromic sensorineural deafness. **Nature**, v. 387, n. 6628, p. 80–83.
- KNIJNENBURG, J. *et al.* A homozygous deletion of a normal variation locus in a patient with hearing loss from non-consanguineous parents. **Journal of Medical Genetics**, v. 46, n. 6, p. 412–417, 2009.
- KOCHHAR, A.; HILDEBRAND, M. S.; SMITH, R. J. H. Clinical aspects of hereditary hearing loss. **Genetics in Medicine : Official Journal of the American College of Medical Genetics**, v. 9, n. 7, p. 393–408, 2007.
- KOKOTAS, H.; PETERSEN, M. B.; WILLEMS, P. J. Mitochondrial deafness. **Clinical Genetics**, v. 71, n. 5, p. 379–391, 2007.
- KREPISCHI-SANTOS, A. C. V *et al.* Whole-genome array-CGH screening in undiagnosed syndromic patients: Old syndromes revisited and new alterations. **Cytogenetic and Genome Research**, v. 115, n. 3-4, p. 254–261, 2006.
- KVAM, M. H.; LOEB, M.; TAMBS, K. Mental health in deaf adults: Symptoms of anxiety and depression among hearing and deaf individuals. **Journal of Deaf Studies and Deaf Education**, v. 12, n. 1, p. 1–7, 2007.
- LAMMENS, F. *et al.* Aetiology of congenital hearing loss: A cohort review of 569 subjects. **International Journal of Pediatric Otorhinolaryngology**, v. 77, n. 9, p. 1385–1391, 2013.
- MAZZEU, J.F. *et al.* Clinical characterization of autosomal dominant and recessive variants of Robinow syndrome. **American Journal of Medical Genetics**. v. 143A. p. 320-325, 2007.
- MCBEATH, R. *et al.* Cell shape, cytoskeletal tension, and RhoA regulate stem cell lineage commitment. **Developmental Cell**, v. 6, p. 483–495, 2004.
- MILLER, D. T. *et al.* Consensus Statement: Chromosomal Microarray Is a First-Tier Clinical Diagnostic Test for Individuals with Developmental Disabilities or Congenital Anomalies. **The American Journal of Human Genetics**, v. 86, n. 5, p. 749–764, 2010.
- MITCHEM, K. L. *et al.* Mutation of the novel gene *Tmie* results in sensory cell defects in the inner ear of spinner, a mouse model of human hearing loss DFNB6. **Human Molecular Genetics**, v. 11, n. 16, p. 1887–1898, 2002.
- MOORE, D. R. *et al.* Evolving Concepts of Developmental Auditory Processing Disorder (APD): A British Society of Audiology APD Special Interest Group “White Paper”. **International Journal of Audiology**, v. 52, n. 1, p. 3–13, 2013.

- MORTON, C. C. Genetics, genomics and gene discovery in the auditory system. **Human Molecular Genetics**, v. 11, n. 10, p. 1229–1240, 2002.
- MUSIEK, F. Habilitation and management of auditory processing disorders: overview of selected procedures. **Journal of American Academy of Audiology**, v. 342, p. 329–342, 1999.
- NAGAMANI, S. C. S. *et al.* Interstitial deletion of 6q25.2–q25.3: a novel microdeletion syndrome associated with microcephaly, developmental delay, dysmorphic features and hearing loss. **European Journal of Human Genetics**, v. 17, n. 5, p. 573–581, 2009.
- NAKAYA, Y. *et al.* RhoA and microtubule dynamics control cell-basement membrane interaction in EMT during gastrulation. **Nature cell biology**, v. 10, n. 7, p. 765–775, 2008.
- NAZ, S. *et al.* Mutations in a novel gene, TMIE, are associated with hearing loss linked to the DFNB6 locus. **American Journal of Human Genetics**, v. 71, n. 3, p. 632–636, 2002.
- OHYAMA, T.; GROVES, A. K. Expression of mouse foxi class genes in early craniofacial development. **Developmental Dynamics**, v. 231, n. 3, p. 640–646, 2004.
- OUYANG, L. *et al.* Whole-genome sequencing of matched primary and metastatic hepatocellular carcinomas, **BMC Medical Genomics**, 7:2, 2014.
- PERSON, A.D. *et al.* WNT5A mutations in patients with autosomal dominant Robinow syndrome. **Developmental Dynamics**, v. 239, p. 327–337, 2010.
- PICKLES, J.O. An introduction to the physiology of hearing. **Emerald**, 4 ed, 2012.
- PROJECT 1000 GENOMES. An integrated map of genetic variation from 1,092 human genomes. **Nature**, v. 135, n. V, p. 0–9, 2012.
- REDON, R. *et al.* Global variation in copy number in the human genome. **Nature**, v. 444, n. 7118, p. 444–454, 2006.
- ROSENBERG, C. *et al.* Short Report - Clinical Genetics Genomic copy number alterations in non-syndromic hearing loss. **Clinical Genetics**, v. doi: 10.11, 2015.
- RUDD, M. K. *et al.* Segmental duplications mediate novel, clinically relevant chromosome rearrangements. **Human Molecular Genetics**, v. 18, n. 16, p. 2957–2962, 2009.
- RUSSELL, M. W. *et al.* Functional analysis of candidate genes in 2q13 deletion syndrome implicates FBLN7 and TMEM87B deficiency in congenital heart defects and FBLN7 in craniofacial malformations. **Human Molecular Genetics**, v. 23, n. 16, p. 4272–4284, 2014.
- SCOTT, D.; JORDAN, V.; ZAVERI, H. 1P36 Deletion Syndrome: an Update. **The Application of Clinical Genetics**, p. 189–200, 2015.
- SEBAT, J. *et al.* Large-scale copy number polymorphism in the human genome. **Science (New York, N.Y.)**, v. 305, n. 5683, p. 525–528, 2004.
- SHAPIRA, S. K. *et al.* Chromosome 1p36 deletions: the clinical phenotype and molecular characterization of a common newly delineated syndrome. **American Journal of Human Genetics**, v. 61, p. 642–650, 1997.
- SHARMA, M. *et al.* Electrophysiological and behavioral evidence of auditory processing deficits in children with reading disorder. **Clinical Neurophysiology**, v. 117, n. 5, p. 1130–1144, 2006.
- SHARP, A. J. Emerging themes and new challenges in defining the role of structural variation in human disease. **Human Mutation**, v. 30, n. 2, p. 135–44, 2009.
- SHAW-SMITH, C. *et al.* Microdeletion encompassing MAPT at chromosome 17q21.3 is associated

- with developmental delay and learning disability. **Nature Genetics**, v. 38, n. 9, p. 1032–1037, 2006.
- SHEIKH, A.M. *et al.* Cathepsin D and apoptosis related proteins are elevated in the brain of autistic subjects. **Neuroscience**, v. 165, p. 363-370, 2010.
- SHINAWI, M.; CHEUNG, S. W. The array CGH and its clinical applications. **Drug Discovery Today**, v. 13, n. 17-18, p. 760–770, 2008.
- SHISHIDO, E., ALEKSIC, B., OZAKI, N. Copy-number variation in the pathogenesis of autism spectrum disorder, **Psychiatry and Clinical Neurosciences**, 1-11, 2013.
- SILVERTHORN, D. U. Fisiologia humana uma abordagem integrada. **Artmed**, 5 ed, 2010.
- SMITH, M. *et al.* Molecular genetic delineation of a deletion of chromosome 13q12q13 in a patient with autism and auditory processing deficits. **Cytogenetic and Genome Research**, v. 98, n. 4, p. 233–239, 2002.
- SMITH, R. J. H.; BALE, J. F. J.; WHITE, K. R. Sensorineural hearing loss in children. **Lancet (London, England)**, v. 365, n. 9462, p. 879–890, 2005.
- SOLINAS-TOLDO, S. *et al.* Matrix-based comparative genomic hybridization: Biochips to screen for genomic imbalances. **Genes Chromosomes and Cancer**, v. 20, n. 4, p. 399–407, 1997.
- SOLOMON, K. S.; LOGSDON, J. M.; FRITZ, A. Expression and Phylogenetic Analyses of Three Zebrafish Foxl Class Genes. **Developmental Dynamics**, v. 228, n. 3, p. 301–307, 2003.
- STAMATIOU, G. A; STANKOVIC, K. M. A comprehensive network and pathway analysis of human deafness genes. **Otology & neurotology: official publication of the American Otological Society, American Neurotology Society [and] European Academy of Otology and Neurotology**, v. 34, n. 5, p. 961–70, 2013.
- STANKIEWICZ, P.; BEAUDET, A. L. Use of array CGH in the evaluation of dysmorphology, malformations, developmental delay, and idiopathic mental retardation. **Current Opinion in Genetics & Development**, v. 17, n. 3, p. 182–192, 2007.
- STEEL, K. P.; KROS, C. J. A genetic approach to understanding auditory function. **Group**, v. 27, n. february, p. 143–149, 2001.
- TASSANO, E. *et al.* Congenital aural atresia associated with agenesis of internal carotid artery in a girl with a FOXI3 deletion. **American Journal of Medical Genetics**. p. 537-544, 2015.
- TEKIN, M.; ARNOS, K. S.; PANDYA, A. Advances in hereditary deafness. **Lancet**, v. 358, n. 9287, p. 1082–1090, 2001.
- TONK, V. *et al.* Molecular Cytogenetic Characterization of a Familial der(1)del(1)(p36.33)dup(1)(p36.33p36.22) With Variable Phenotype. **American Journal of Medical Genetics**, v. 143A, n. 18, p. 2106–2112, 2005.
- TORIELLO e SMITH. Hereditary hearing loss and its syndromes. **Oxford**, v. 3, 2013.
- TURNER, O.; WINDFUHR, K.; KAPUR, N. Suicide in deaf populations: a literature review. **Annals of General Psychiatry**, v. 6, p. 26, 2007.
- TUZUN, E. *et al.* Fine-scale structural variation of the human genome. **Nature Genetics**, v. 37, n. 7, p. 727–732, 2005.
- VIANNA-MORGANTEA, A. *et al.* Whole-genome array-CGH screening in undiagnosed syndromic patients: old syndromes revisited and new alterations, **Cytogenet Genome Research**, 115:254-261, 2006.

- VISSERS, L. E. L. M. *et al.* Array-based comparative genomic hybridization for the genomewide detection of submicroscopic chromosomal abnormalities. **American Journal of Human Genetics**, v. 73, n. 6, p. 1261–1270, 2003.
- WARNER, D. R. *et al.* Gene expression changes in the secondary palate and mandible of Prdm16^{-/-} mice. **Cell Tissue Research**. v. 351, p. 445-452, 2013.
- WHITE, J. *et al.* DVL1 frameshift mutations clustering in the penultimate exon cause autosomal dominant Robinow syndrome. **The American Journal of Human Genetics**, v. 96, p. 612-622, 2015.
- WIEST, M.M.; GERMAN, J.B.; HARVEY, D.J. *et al.* Plasma fatty acid profiles in autism: a case - control study. **Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids**, v. 80, p. 221-227, 2009.
- XU, F. *et al.* The first patient with a pure 1p36 microtriplication associated with severe clinical phenotypes. **Molecular Cytogenetics**, v. 7, n. 1, p. 64, 2014.
- YANG, T. *et al.* Transcriptional control of SLC26A4 is involved in Pendred syndrome and nonsyndromic enlargement of vestibular aqueduct (DFNB4). **American Journal of Human Genetics**, v. 80, n. 6, p. 1055–1063, 2007.
- YANG, Y. Wnt signaling in development and disease. **Cell & Bioscience**, v. 2, n. 1, p. 14, 2012.
- YOST, W. Fundamentals of hearing: an introduction. **Elsevier**, 5 ed, 2007.

Organização Mundial da Saúde

<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs300/en/index.html> (Acesso: 03/01/2014).

Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística

<http://www.pessoacomdeficiencia.gov.br/app/sites/default/files/publicacoes/cartilha-censo-2010-pessoas-com-deficiencia-reduzido.pdf> (Acesso: 03/01/2014).

Genetics Home Reference

<http://ghr.nlm.nih.gov/BrowseConditions> (Acesso: 29/01/2015).

Hereditary Hearing Loss

<http://hereditaryhearingloss.org> (Acesso: 28/01/2015)

American Speech-Language-Hearing Association

<http://www.asha.org/docs/html/TR2005-00043.html> (Acesso: 08/10/2015)

Canadian Guidelines on Auditory Processing Disorder

http://www.cshhpb.org/docs/canadian_guidelines_on_auditory_processing_disorder_in_children_and_adults_english_final_2012.pdf (Acesso: 10/11/2015)

APÊNDICE A -DESCRIÇÃO CLÍNICA DOS PACIENTES SEM ALTERAÇÕES NO CMA

Paciente DA1

Paciente do sexo feminino, 38 anos, aos 10 anos foi diagnosticada com perda auditiva condutiva bilateral predominante à direita. Apresenta assimetria facial com nariz desviado para a esquerda, olhos situados profundamente e lábios finos. Além disso, nota-se mãos e pés pequenos em relação ao corpo. A paciente apresenta distúrbios de comportamento caracterizado por atitudes infantis e deficiência intelectual. Há histórico de deficiência intelectual na família paterna e casos de otoesclerose na família materna.

Paciente DA2

Paciente do sexo masculino, 1 ano de idade. O paciente foi encaminhado à genética devido a microtia grau III na orelha direita e consequente perda auditiva condutiva leve da mesma orelha. Criança apresenta assimetria facial discreta com o lado esquerdo maior que o direito e retrognatia.

Paciente DA3

Paciente do sexo masculino, 13 anos de idade. Aparenta macrocrania, fendas palpebrais retas, mãos e pés grandes. Foi identificado déficit cognitivo desde os 4 anos de idade e apresenta surdez neurossensorial bilateral grave.

Paciente DA6

Paciente do sexo masculino, 15 anos. O paciente apresenta dolicocefalia e estrabismo e foi encaminhado ao serviço de genética clínica devido a microtia de grau III da orelha direita. A orelha direita é hipodesenvolvida com a extremidade do pavilhão auricular superior sobredobrada e lóbulo solto. Os pais relataram malformação dos ossículos da orelha interna, também à direita.

Paciente DA7

Paciente do sexo masculino, 8 anos. Foi diagnosticado com distúrbio do processamento auditivo central (DPAC) e deficiência intelectual. O paciente apresenta perfil facial achatado, fendas palpebrais oblíquas para cima, ponte nasal baixa, orelhas voltadas para trás, pescoço alado, hidrocele testicular, *cutis verticis gyrata* concentrada no lado esquerdo.

Paciente DA9

Paciente do sexo masculino, 10 anos. Paciente apresenta perda auditiva mista moderada à direita e moderadamente grave à esquerda. O paciente foi encaminhado à genética por suspeita de mucopolissacaridose. Paciente apresenta apagamento da crista supra orbital, fendas palpebrais retas, prognatismo mandibular, lábio superior fino, criptorquidia à esquerda, membros superiores com resistência a supinação, dedos das mãos curtos com clinodactilia do quinto dedo, resistência à flexão dos dedos dos pés.

Paciente DA10

Paciente com 23 anos do sexo masculino. Aos 11 anos foi diagnosticado com catarata no olho direito e cerca de 2 anos depois foi observada perda auditiva neurosensorial moderada à esquerda com configuração descendente. Possui face assimétrica com o lado esquerdo maior que o direito, o couro cabeludo revela regiões de rarefação capilar e a orelha esquerda é menor e mais simples que a direita. O paciente apresenta hipoplasia e hipofunção do rim direito e estenose da junção uretero-piélica.

Paciente DA11

Paciente com 16 anos de idade do sexo masculino diagnosticado pelo neurologista com transtorno do déficit de atenção e hiperatividade TDAH e distúrbio do processamento auditivo central (DPAC). O adolescente tem baixa estatura e atraso puberal, apresenta microcefalia, baixa implantação dos cabelos na frente, nariz com raiz baixa e ponta bulbosa.

Paciente DA13

Paciente do sexo feminino com 4 anos. A criança apresenta microtia grau III à esquerda com perda auditiva mista moderada do mesmo lado. A paciente tem frente ampla, fendas palpebrais oblíquas para cima, lábio superior fino e face triangular. Apresenta hipertrofia de adenoides e dermóide epibulbar.

Paciente DA15

Paciente do sexo masculino, 4 anos. Apresenta perda auditiva mista leve a direita com microtia de grau III e subluxação congênita do martelo e bigorna. Além disso, foi observado sindactilia parcial do segundo e terceiro dedo de um dos pés, membranas interdigitais nas mãos e alto grau de miopia.

Cabe ressaltar que o cariótipo desse paciente apresentou resultado 46, XYqh-, ou seja, cromossomo Y diminuído, esse achado foi considerado polimórfico e sem relação com o fenótipo investigado.

Paciente DA16

Paciente do sexo masculino, 16 anos. Encaminhado ao serviço de genética clínica por baixa estatura, encefalopatia crônica não progressiva e deficiência auditiva neurosensorial bilateral grave. O paciente tem histórico de crise convulsiva com um mês de idade, apresenta deficiência intelectual, microcefalia, fendas palpebrais retas, raiz nasal alta com asas hipoplásicas, palato alto, orelhas voltadas para trás, quinto quirodáctilo diminuído bilateralmente, membro inferior esquerdo maior que o direito e agenesia de corpo caloso.

**APÊNDICE B – GENES CONTIDOS NA PERDA DE HETEROZIGOSE NO CROMOSSOMO 3
DA PACIENTE DA4**

CCR3, CCR2, CCR5, CCRL2, LTF, RTP3, LRRC2, LRRC2-AS1, TDGF1, LOC100132146, ALS2CL, TMIE, PRSS50, PRSS46, PRSS45, PRSS42, MYL3, PTH1R, CCDC12, NBEAL2, NRADDP, SETD2, KIF9-AS1, KIF9, KLHL18, PTPN23, SCAP, ELP6, CSPG5, SMARCC1, DHX30, MIR1226, MAP4, CDC25A, MIR4443, CAMP, ZNF589, NME6, SPINK8, FBXW12, PLXNB1, CCDC51, TMA7, ATRIP, TREX1, SHISA5, PFKFB4, UCN2, COL7A1, MIR711, UQCRC1, TMEM89, SLC26A6, CELSR3, MIR4793, NCKIPSD, IP6K2, PRKAR2A, SLC25A20, ARIH2OS, ARIH2, P4HTM, WDR6, DALRD3, MIR425, NDUFAF3, MIR191, IMPDH2, QRICH1, QARS, USP19, LAMB2, LAMB2P1, CCDC71, KLHDC8B, LOC646498, CCDC36, C3orf62, MIR4271, USP4, GPX1, RHOA, TCTA, AMT, NICN1, DAG1, BSN-AS2, BSN, APEH, MST1, RNF123, AMIGO3, GMPPB, IP6K1, CDHR4, FAM212A, UBA7, MIR5193, TRAIP, CAMKV, MST1R, MON1A, RBM6, RBM5, RBM5-AS1, SEMA3F, GNAT1, SLC38A3, GNAI2, SEMA3B, LSMEM2, IFRD2, HYAL3, NAT6, HYAL1, HYAL2, TUSC2, RASSF1, ZMYND10, NPRL2, CYB561D2, TMEM115, CACNA2D2, C3orf18, HEMK1, CISH, MAPKAPK3, MIR4787, DOCK3, MANF, RBM15B, VPRBP, RAD54L2, TEX264, GRM2, IQCF6, IQCF4, IQCF3, IQCF2, IQCF5, IQCF1, RRP9, PARP3, GPR62, PCBP4, ABHD14B, ABHD14A, ABHD14A-ACY1, ACY1, RPL29, DUSP7, LINC00696, POC1A, ALAS1, TLR9, TWF2, PPM1M, WDR82, MIRLET7G, GLYCTK, MIR135A1, DNAH1, BAP1, PHF7, SEMA3G, TNNC1, NISCH, STAB1, NT5DC2, SMIM4, PBRM1.

ANEXO A – PRONTUÁRIO UTILIZADO DURANTE A ANAMNESE DOS PACIENTES

 Universidade de Brasília Faculdade de Medicina		
AMBULATÓRIO DE GENÉTICA MÉDICA FICHA DE ATENDIMENTO CLÍNICO		
		DATA _____
1	RESUMO FINAL	RF
PEDIDO DE CONSULTA DE: _____		
MOTIVO DA CONSULTA: _____		
segundo o pedido - <input type="checkbox"/> acons. <input type="checkbox"/> diag. <input type="checkbox"/> outro <input type="checkbox"/> _____		
segundo a família - <input type="checkbox"/> acons. <input type="checkbox"/> diag. <input type="checkbox"/> outro <input type="checkbox"/> _____		
MOTIVO DO ENCAMINHAMENTO: (marcar com um ou mais "x")		
1 <input type="checkbox"/> Suspeita de doença genética em paciente que apresenta: 2 <input type="checkbox"/> malformação isolada ou múltipla 3 <input type="checkbox"/> retardo neuromotor e/ou deficiência mental 4 <input type="checkbox"/> deficiência de crescimento e/ou distúrbios ósteo-articulares 5 <input type="checkbox"/> deficiência visual 6 <input type="checkbox"/> deficiência auditiva 7 <input type="checkbox"/> distúrbios da diferenciação sexual 8 <input type="checkbox"/> infertilidade e/ou abortamento habitual 9 <input type="checkbox"/> distúrbio metabólico 10 <input type="checkbox"/> outro (indique qual) _____ 11 <input type="checkbox"/> manejo de doença genética já diagnosticada (qual?) _____ 12 <input type="checkbox"/> aconselhamento genético em _____		
DIAGNÓSTICO CLÍNICO: _____ CID <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>		
_____ VMK <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>		
ACONSELHAMENTO GENÉTICO: <input type="checkbox"/> sim <input type="checkbox"/> não		CONSAGUINIDADE: <input type="checkbox"/> sim <input type="checkbox"/> não PROCEDÊNCIA: Cidade: _____ Est.: _____
DIAGNÓSTICO ETIOLÓGICO 13 <input type="checkbox"/> Familiar, sugere AD 14 <input type="checkbox"/> Familiar, sugere AR 15 <input type="checkbox"/> Familiar, sugere XR 16 <input type="checkbox"/> Familiar, sugere AD ou XD 17 <input type="checkbox"/> Familiar, nada sugere 18 <input type="checkbox"/> Esporádica, AD 19 <input type="checkbox"/> Esporádica, AR 20 <input type="checkbox"/> Esporádica, XR ou XD 21 <input type="checkbox"/> Esporádica, ? 22 <input type="checkbox"/> Consangüinidade 23 <input type="checkbox"/> Gêmeos 24 <input type="checkbox"/> Expressividade variável 25 <input type="checkbox"/> Penetrância incompleta 26 <input type="checkbox"/> Anomalia cromossômica 27 <input type="checkbox"/> Etiologia ambiental provável 28 <input type="checkbox"/> Poligenia provável 29 <input type="checkbox"/> "Imprinting" genômico 30 <input type="checkbox"/> Mitocondrial 43 <input type="checkbox"/> Não determinado		TÉCNICAS DE ESTUDO: 31 <input type="checkbox"/> Análise Cromossômica (uniforme) 32 <input type="checkbox"/> Análise Cromossômica (bandas) 33 <input type="checkbox"/> Análise dermatoglífica 34 <input type="checkbox"/> Análise genealógica 35 <input type="checkbox"/> Fotos Clínicas 36 <input type="checkbox"/> Marcadores gênicos 37 <input type="checkbox"/> Radiografias 38 <input type="checkbox"/> Testes para erros metabólicos 39 <input type="checkbox"/> Cromatina sexual X 40 <input type="checkbox"/> Cromatina sexual Y 41 <input type="checkbox"/> Testes moleculares 42 <input type="checkbox"/> FISH CARIÓTIPO: <input type="checkbox"/> não <input type="checkbox"/> sim - n° _____ <input type="checkbox"/> _____ bandas _____
		DOCUMENTAÇÃO FOTOGRÁFICA <input type="checkbox"/> sim <input type="checkbox"/> não

2	SUMÁRIO DO ATENDIMENTO	
1º atend. em / / médico: consult.: ret. prev. p/ / /		
2º atend. em / / médico: consult.: ret. prev. p/ / /		
3º atend. em / / médico: consult.: ret. prev. p/ / /		
4º atend. em / / médico: consult.: ret. prev. p/ / /		
5º atend. em / / médico: consult.: ret. prev. p/ / /		
6º atend. em / / médico: consult.: ret. prev. p/ / /		
7º atend. em / / médico: consult.: ret. prev. p/ / /		
8º atend. em / / médico: consult.: ret. prev. p/ / /		
9º atend. em / / médico: consult.: ret. prev. p/ / /		

5	EXAME FÍSICO	MEDIDA	ÍTEM	PERCENTIL
CRÂNIO FACE:		_____ g	Peso	_____
Com quem se parece? _____		_____ cm	Estatura	_____
Aspecto global: _____		_____ cm	Vértex-púbis	_____
CRÂNIO: tamanho, forma, simetria, fontanelas, suturas, couro cabeludo, cabelos, fronte.		_____ cm	Púbis-planta	_____
FACE: supercílios, olhos.		_____ cm	Relação SS/SI	_____
NARIZ (tipo, raiz, dorso, ponta, base, asas, narinas, columelas), nalgares, linha trago-oral,		_____ cm	Envergadura	_____
BOCA (lábios, comissuras, língua, palato, gengiva, dentes, maxilares),		_____ cm	Envergadura / estatura	_____
ORELHAS (tamanho, implantação, hélix, trago, antitrigo, lóbulo, concha, antihélix, escafa, fossa triangular).		_____ cm	Perímetro cefálico	_____
PESCOÇO: tamanho, movimentação, implantação do cabelo, tireóide.		_____ cm	Perímetro torácico	_____
TÓRAX: forma, simetria, deformidade, mamas.		_____ cm	Crânio: D. AP.	_____
RESPIRATÓRIO:		_____ cm	Crânio D. T.	_____
CORAÇÃO: palpação, percussão e ausculta		_____ mm	Índice cefálico	_____
ABDOME: fígado, baço		_____ mm	Comprimento da mão	_____
GENITÁLIA: distribuição pilosa, grandes lábios, pequenos lábios, clitóris, escroto, pênis, testículos, meato, orifício vaginal, fúrcula, hímen, tipo de genitália.		_____ mm	Comprimento do dedo médio	_____
PERÍNEO E ÂNUS:		_____ mm	Distância intercantal interna	_____
COLUNA: deformidades		_____ mm	Distância intercantal externa	_____
MEMBROS: proporções tronco-membros e de segmentos, mobilidade articular, exame das mãos, (atitude, posição, região palmar, dorso, dedos), exame dos pés (idem), unhas.		_____ mm	Distância interpupilar	_____
PELE:		_____ mm	Distância interorbital externa	_____
		_____ mm	Fenda palpebral D.	_____
		_____ mm	Fenda palpebral E.	_____
		_____ cm	Distância intermamilar	_____
		_____ cm	Comprimento do esterno	_____
		_____ cm	Diâmetro bitrocantérico	_____
		_____ cm	Diâmetro biacromial	_____
		_____		_____
		_____		_____
		_____		_____
Descrição:				

13

HEREDOGRAMA E INFORMAÇÕES GRÁFICAS

15	ACONSELHAMENTO GENÉTICO
PREOCUPAÇÃO INICIAL EM RELAÇÃO AO PROBLEMA (anotar na 1ª consulta):	
<input type="checkbox"/> não realizado (Indique o motivo).	
<input type="checkbox"/> realizado (descreva).	
DATA	DESCRIÇÃO

ANEXO B – PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA



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: ceptsunb@gmail.com

ANEXO C - 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 Campus Universitário Darcy Ribeiro – Brasília/DF
Tel: (61) 3107-1947/ (61) 8334-8973/ (63) 8114-1174

ANEXO D – PROTOCOLO DE EXTRAÇÃO DE DNA ADAPTADO (MÉTODO *GENTRA****PURIGENE BLOOD KIT*)****Soluções****Solução de lise RBC**

5mM MgCl₂ + 1mM EDTA (pH 8,0)

Solução de lise celular (CLS)

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

Solução de precipitação de proteínas

7,5M NH₄Ac

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 µL 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.

