



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

SAMYRA ESPÍNDOLA LIMA

**Busca da etiologia genética de casos de deficiência auditiva  
sindrômicos e não sindrômicos em pacientes do Distrito  
Federal**

Orientadora: Prof. Dra. Silviene Fabiana de Oliveira

Brasília

2022

SAMYRA ESPÍNDOLA LIMA

**Busca da etiologia genética de casos de deficiência auditiva  
sindrômicos e não sindrômicos em pacientes do Distrito  
Federal**

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 orientadora Dr<sup>a</sup> Silviene Fabiana de Oliveira, pela oportunidade, pelo suporte, pelas suas correções e pelos incentivos.

Aos médicos dos ambulatórios de Genética e de Otorrinolaringologia do Hospital Universitário de Brasília.

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

Aos meus pais, pelo amor, incentivo e apoio incondicional.

Meus agradecimentos aos amigos, companheiros de trabalho e irmãos na amizade que fizeram parte dessa etapa da minha vida.

A todos que direta ou indiretamente fizeram parte desse projeto.

## EPÍGRAFE

O degrau de uma escada não serve  
simplesmente para que alguém  
permaneça em cima dele, destina-se  
a sustentar o pé de um homem pelo  
tempo suficiente para que ele  
coloque o outro um pouco mais alto.

**Thomas Huxley**

## RESUMO

A deficiência auditiva é caracterizada como a dificuldade em perceber e ou interpretar o som, sendo o distúrbio sensorial mais comum. A perda auditiva pode estar relacionada a causas genéticas, ambientais ou a uma combinação de ambas. A deficiência auditiva genética pode ser classificada em não-sindrômica (70% dos casos) e sindrômica (30% dos casos). Variantes no gene *GJB2* são a causa mais comum de deficiência auditiva autossômica recessiva não sindrômica, sendo que a mutação 35delG é observada em até 70% dos casos. A deficiência auditiva já foi descrita como sendo uma das características clínicas de mais de 500 síndromes, mas nem sempre é o fenótipo mais comum. Dentre os tipos mais comuns de perda auditiva sindrômica estão a Síndrome branquio-oto-renal, a Síndrome de Waardenburg e a Síndrome de CHARGE. O objetivo principal deste trabalho foi buscar a etiologia genética para casos de deficiência auditiva sindrômica e não sindrômica em pacientes do Distrito Federal. Com esse intuito, foram selecionados pacientes com deficiência auditiva nos ambulatórios de otorrinolaringologia e de genética do Hospital Universitário de Brasília (HUB). Foi realizada a triagem para a variante 35delG desses pacientes, seguida de exoma completo para parte dos casos. A variante 35delG foi detectada em homozigose em um paciente (DA\_06) e em heterozigose em dois pacientes (DA\_15 e 11284). Foi realizado exoma em 12 pacientes e 10/12 tiveram diagnóstico molecular. Em 9/12 casos houve o diagnóstico molecular para a deficiência auditiva do paciente, envolvendo os genes *ACTB* (Síndrome de Baraitser-Winter 1), *EYAI* (Síndrome branquio-oto-renal), *GJB2* (deficiência auditiva autossômica recessiva não sindrômica), *GSDME* (deficiência auditiva neurossensorial progressiva), *MITF* (Síndrome de Waardenburg), *MCM2* (deficiência auditiva não sindrômica autossômica dominante 70) e *STRC* (deficiência auditiva autossômica recessiva não sindrômica 16). Foi encontrado um achado incidental nos pacientes 10970 (no gene *TNNT2*, relacionado a Não-compactação ventricular esquerda) e 11294 (no gene *KCNQ1*, relacionado a Síndrome do QT longo).

**Palavras chaves:** deficiência auditiva sindrômica, deficiência auditiva não sindrômica, 35delG, exoma

## ABSTRACT

Hearing impairment is the difficulty in understanding and or interpreting sound, being the most common sensory disorder. Hearing impairment can be related to genetic factors, environmental factors or both. An estimated 30% of genetic hearing loss is syndromic and 70% nonsyndromic. Variants in the *GJB2* gene are the most common cause of autosomal recessive nonsyndromic hearing loss, and the 35delG variant is observed in up to 70% of cases. Hearing impairment has been described in more than 500 syndromes, considering that it is not always the most common phenotype. Some of the most common types of syndromic hearing loss include Branchio-oto-renal Syndrome, Waardenburg Syndrome and CHARGE Syndrome. The main aim of this study was to search for the genetic etiology for syndromic hearing loss and nonsyndromic hearing loss in patients from Distrito Federal. For this purpose, patients with syndromic and nonsyndromic hearing loss were selected from Ambulatory of Otorhinolaryngology and Ambulatory of Genetics at Hospital Universitário de Brasília (HUB). Screening was performed for the 35delG variant, followed by a complete exome. The 35delG variant was detected in homozygosis in one patient (DA\_06) and in heterozygosis in two patients (DA\_15 and 11284). The exome was performed in 12 patients and 10/12 had a molecular diagnosis. In 9/12 cases there was a molecular diagnosis for the patient's hearing loss, involving the genes *ACTB* (Baraitser-Winter Syndrome 1), *EYAI* (Branchio-oto-renal syndrome), *GJB2* (non-syndromic autosomal recessive hearing loss), *GSDME* (progressive sensorineural hearing loss), *MITF* (Syndrome de Waardenburg), *MCM2* (non-syndromic autosomal dominant hearing loss 70) and *STRC* (autosomal recessive non-syndromic hearing loss 16). An incidental finding was found in the patients 10970 (in the *TNNT2* gene, related to Left Ventricular Noncompaction) and 11294 (in the *KCNQ1* gene, related to Long QT Syndrome).

**Keywords:** syndromic hearing loss, nonsyndromic hearing loss, 35delG, exome

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Anatomia da orelha externa, média e interna. Imagem modificada de Bear, 2017 .....	15
<b>Figura 2.</b> Corte transversal da cóclea. <b>A.</b> Enrolada ao redor do núcleo ósseo, a cóclea protege suas fibras nervosas. <b>B.</b> O labirinto membranoso divide o labirinto ósseo em duas partes: a rampa do vestíbulo acima e a rampa timpânica abaixo. a rampa média aloja o órgão terminal receptor da audição. <b>C.</b> as estruturas do órgão de Corti repousam na membrana basilar. Retirado de Fuller (2014) .....	17
<b>Figura 3.</b> Banco de dados de literatura da Plataforma Franklin. Em destaque, no retângulo vermelho, é possível observar a opção “publicações” .....	38
<b>Figura 4.</b> Eletroferograma do paciente DA_06. Em destaque, no retângulo vermelho, é possível observar a presença de cinco guaninas ao invés de seis, evidenciando a variante 35delG em homozigose .....	40
<b>Figura 5.</b> Eletroferograma do paciente DA_15. Em destaque, no retângulo vermelho, é possível identificar a variante 35delG em heterozigose. Variante de mudança de quadro de leitura .....	41
<b>Figura 6.</b> Eletroferograma do paciente 11284. Em destaque, no retângulo vermelho, é possível identificar a variante 35delG em heterozigose. Variante de mudança de quadro de leitura .....	41
<b>Figura 7.</b> Heredograma da família do paciente 10581 .....	44
<b>Figura 8.</b> Variante c.338C>T identificada em heterozigose com alelo de referência no gene <i>CPT2</i> do paciente 10581. Imagem gerada pelo programa IGV - Integrative Genomes Viewers .....	45
<b>Figura 9.</b> Variante c.863 A>T identificada em homozigose com alelo de referência no gene <i>SERPINA1</i> do paciente 10581. Imagem gerada pelo programa IGV - Integrative Genomes Viewers .....	46
<b>Figura 10.</b> Heredograma da família do paciente 10727 .....	47
<b>Figura 11.</b> Variante c.127G>T em heterozigose com o alelo referência identificada no gene <i>ACTB</i> do paciente 10727. Imagem gerada pelo programa IGV - Integrative Genomes Viewers .....	49
<b>Figura 12.</b> Heredograma da família do paciente 10765 .....	50
<b>Figura 13.</b> Variantes c.145C>T e c.146C>T identificadas no gene <i>GSDME</i> do paciente 10765. Imagem gerada pelo programa IGV - Integrative Genomes Viewers .....	51
<b>Figura 14.</b> Heredograma da família do paciente 10941 .....	52

<b>Figura 15.</b> Variante n.523-1G>A identificada em heterozigose com alelo de referência no gene <i>MCM2</i> do paciente 10941. Imagem gerada pelo programa IGV - Integrative Genomes Viewers .....	52
<b>Figura 16.</b> Variante c.1143_1176delCCTGAACAGCATGTTTGAGGTGTACTTGGTGGGG identificada em heterozigose com alelo de referência no gene <i>CDH23</i> do paciente 10941. Imagem gerada pelo programa IGV - Integrative Genomes Viewers .....	53
<b>Figura 17.</b> Variante c.3579+2T>C identificada em heterozigose com alelo de referência no gene <i>CDH23</i> do paciente 10941. Imagem gerada pelo programa IGV - Integrative Genomes Viewers .....	53
<b>Figura 18.</b> Heredograma da família da paciente 10970 .....	54
<b>Figura 19.</b> Deleção de 4.7kb dos genes <i>STRC</i> , <i>CKMT1B</i> , <i>SNOU13</i> , <i>RNU6-554P</i> do paciente 10970. Imagem gerada pelo programa IGV - Integrative Genomes Viewers .	54
<b>Figura 20.</b> Deleção de 1.1kb dos genes <i>STRC</i> , <i>CKMT1B</i> e <i>RNU6-554P</i> do paciente 10970. Imagem gerada pelo programa IGV - Integrative Genomes Viewers. ....	55
<b>Figura 21.</b> Variante c.692T>C identificada em heterozigose com alelo de referência no gene <i>TNNT2</i> do paciente 10970. Imagem gerada pelo programa IGV - Integrative Genomes Viewers .....	55
<b>Figura 22.</b> Heredograma da família do paciente 11089 .....	57
<b>Figura 23.</b> Variante c.1523C>T identificada no gene <i>EYAI</i> do paciente 11089 em heterozigose com alelo de referência. Imagem gerada pelo programa IGV - Integrative Genomes Viewers .....	57
<b>Figura 24.</b> Variante c.737C>T identificada no gene <i>PTEN</i> do paciente 11089 em heterozigose com alelo de referência . Imagem gerada pelo programa IGV - Integrative Genomes Viewers .....	58
<b>Figura 25.</b> Heredograma da família do paciente 11178 mostrando a segregação de deficiência auditiva e pigmentação da íris .....	61
<b>Figura 26.</b> Variante c.1230G>A em heterozigose com o alelo de referência identificada no gene <i>MITF</i> do paciente 11178. Imagem gerada pelo programa IGV - Integrative Genomes Viewers .....	62
<b>Figura 27.</b> Heredograma da família do paciente 11284 .....	63
<b>Figura 28.</b> Variante c.35delG em heterozigose com alelo referência identificada no gene <i>GJB2</i> do paciente 11284. Imagem gerada pelo programa IGV - Integrative Genomes Viewers .....	65



<b>Figura 29.</b> Variante c.550C>T em heterozigose com alelo referência identificada no gene <i>GJB2</i> do paciente 11284. Imagem gerada pelo programa IGV - Integrative Genomes Viewers .....	65
<b>Figura 30.</b> Variante c.15142C>T identificada em heterozigose com o alelo referência no gene <i>KMT2D</i> do paciente 11284. Imagem gerada pelo programa IGV - Integrative Genomes Viewers .....	66
<b>Figura 31.</b> Variante c.396A>C identificada em hemizigose no gene <i>F8</i> do paciente 11284. Imagem gerada pelo programa IGV - Integrative Genomes Viewers .....	66
<b>Figura 32.</b> Heredograma da família da paciente 11289 .....	67
<b>Figura 33.</b> Deleção de 9.4kb em homozigose englobando os genes <i>STRC</i> , <i>CKMT1B</i> , <i>SNOU13</i> , <i>RNU6-554P</i> do paciente 11289. Imagem gerada pelo programa IGV - Integrative Genomes Viewers .....	68
<b>Figura 34.</b> Heredograma da família do paciente 11294 .....	69
<b>Figura 35.</b> Variante c.1081C>T identificada em heterozigose com alelo de referência no gene <i>EYAI</i> do paciente 11294 . Imagem gerada pelo programa IGV - Integrative Genomes Viewers .....	70
<b>Figura 36.</b> Variante c.1040C>T identificada em heterozigose com o alelo referência no gene <i>KCNQ1</i> do paciente 11294. Imagem gerada pelo programa IGV - Integrative Genomes Viewers .....	70
<b>Figura 37.</b> Heredograma do paciente 10921 .....	71
<b>Figura 38.</b> Heredograma do paciente 11024 .....	73
<b>Figura 39.</b> Heredograma do paciente 10598 .....	74

## **LISTA DE QUADROS**

<b>Quadro 1.</b> Classificação da deficiência auditiva .....	18
<b>Quadro 2.</b> Diferenciação entre os quadros fenotípicos da Síndrome de Waardenburg e seus respectivos genes associados .....	20
<b>Quadro 3.</b> Diferenciação entre os quadros fenotípicos da Síndrome de Usher e seus respectivos genes associados .....	22
<b>Quadro 4.</b> Prevalência da variante 35delG em pacientes com deficiência auditiva no Brasil .....	25

## **LISTA DE TABELAS**

<b>Tabela 1.</b> Concentrações dos reagentes na solução de reação de PCR para amplificação da região contendo a mutação c.35delG. ....	34
<b>Tabela 2.</b> Solução de reação para sequenciamento da região contendo a mutação c.35delG. ....	35
<b>Tabela 3.</b> Informações dos ciclos no termociclador para o sequenciamento .....	35
<b>Tabela 4.</b> Filtros e parâmetros utilizados para análise de exoma .....	38
<b>Tabela 5.</b> Diagnóstico genético molecular obtido para os pacientes com deficiência auditiva incluídos na pesquisa. ....	42
<b>Tabela 6.</b> Classificação das variantes observadas e identificação dos tipos de variantes.....	75

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

°C	Grau Celsius
µL	Microlitro
AATD	do inglês <i>alpha-1-antitrypsin deficiency</i>
ACMG	do inglês <i>American College of Medical Genetics and Genomics</i>
BERA	Potencial evocado auditivo do tronco encefálico
BOR	Síndrome branquio-oto-renal
CEAL	Centro Educacional da Audição e Linguagem
CPT II	Carnitina palmitoil transferase II
CX26	Conexina 26
dB	Decibel
DFNB	deficiência auditiva não sindrômica autossômica recessiva
DNA	do inglês <i>Deoxyribonucleic Acid</i>
dNTPs	Desoxirribonucleotídeos fosfatados
EDTA	do inglês <i>Ethylenediamine Tetraacetic Acid</i>
EIM	Erros Inatos do Metabolismo
ES	Espírito Santo
EUA	Estados Unidos da América
EVA	do inglês <i>enlarged vestibular aqueduct</i>
GWAS	do inglês <i>Genome Wide Association Studies</i>
H <sub>2</sub> O	Água
HD	do inglês <i>homeodomain</i>
HUB	Hospital Universitário de Brasília
IA	inteligência artificial
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
MG	Minas Gerais
MgCl <sub>2</sub>	Cloreto de magnésio
min	Minuto

mM	Milimolar
ng	Nanograma
NGS	do inglês <i>Next-Generation Sequencing</i>
OMIM	do inglês <i>Online Mendelian Inheritance in Man</i>
PA	Pará
pb	Par de base
PCR	do inglês <i>Polymerase Chain Reaction</i>
pmoles/ $\mu$ L	Picomol/microlitro
PR	Paraná
PVC	Policloreto de vinila
rpm	Rotação por minuto
RS	Rio Grande do Sul
SD	do inglês <i>SIX domain</i>
seg	Segundo
SP	São Paulo
TBE	Tris-borato-EDTA
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
U/ $\mu$ L	Unidade/microlitro
UV	Ultravioleta
VUS	Variante de significado incerto
WES	do inglês <i>whole exome sequencing</i>
WGS	do inglês <i>Whole Genome Sequencing</i>

# SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO .....	13
1.1	Funcionamento normal da audição .....	14
1.1.1	Orelha – anatomia .....	14
1.1.2	Ouvir: da vibração ao som .....	17
1.2	Classificação da deficiência auditiva .....	18
1.2.1	Deficiência auditiva sindrômica .....	19
1.2.1.1	Síndrome branquio-oto-renal .....	20
1.2.1.2	Síndrome de Waardenburg .....	20
1.2.1.3	Síndrome de CHARGE .....	21
1.2.1.4	Síndrome de Usher .....	21
1.2.2	Deficiência auditiva não sindrômica .....	22
1.2.2.1	GJB2 ... ..	22
1.2.2.1.1	Variante 35delG .....	23
1.2.3	Genes associados a deficiência auditiva .....	25
1.2.3.1	SLC26A4 .....	26
1.2.3.2	MYO7A .....	26
1.2.3.3	SIX1 .....	26
1.3	Sequenciamento de Nova Geração (NGS) .....	27
1.3.1	Achados Incidentais .....	28
1.3.2	Achados Secundários .....	28
2.	JUSTIFICATIVA .....	29
3.	OBJETIVOS .....	30
4.	MATERIAL E MÉTODOS .....	31
4.1	Aspectos éticos .....	31
4.2	Seleção de pacientes .....	31
4.3	Coleta de material biológico .....	32
4.4	Extração e quantificação de DNA .....	32
4.5	Análise da presença da mutação c.35delG .....	32
4.6	Exoma .....	35
4.7	Plataforma Franklin .....	36
4.8	Análise dos Exomas .....	37

5.	RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	39
5.1	Triagem 35delG .....	39
5.2	Exomas .....	41
5.3	Apanhado geral .....	74
6.	CONCLUSÕES .....	77
7.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	79
	ANEXO 1 .....	84
	ANEXO 2 .....	85
	ANEXO 3 .....	88
	ANEXO 4 .....	91
	ANEXO 5 .....	94
	ANEXO 6 .....	97
	ANEXO 7 .....	99

## 1. INTRODUÇÃO

A deficiência auditiva (perda auditiva e surdez) é considerada o distúrbio sensorial mais comum (DROR; AVRAHAM, 2010). A perda auditiva é um fenótipo caracterizado por qualquer grau de perda da capacidade de ouvir, podendo ser temporária ou permanente. A surdez é um fenótipo caracterizado pela perda da capacidade total ou quase total da audição (ALFORD *et al.*, 2014). Aproximadamente um em cada mil indivíduos é afetado por deficiência auditiva severa ou profunda ao nascimento ou durante a primeira infância e, assim como a perda de outras funções sensoriais, tem uma grande diversidade de causas, podendo ser genética, ambiental ou uma combinação de ambas (DROR; AVRAHAM, 2010; PETIT; LEVILLIERS; HARDELIN, 2001). A deficiência auditiva devido a causas ambientais pode decorrer de vários fatores, tais como a idade/envelhecimento (acarretada pelos efeitos degenerativos do envelhecimento na cóclea) (CUNNINGHAM; TUCCI, 2017), ototoxicidade medicamentosa (disfunção temporária ou permanente da orelha interna após a exposição a drogas ototóxicas (CUNNINGHAM; TUCCI, 2017; DROR; AVRAHAM, 2010; YORGASON *et al.*, 2006), exposição prolongada a ruídos e trauma acústico (um ruído alto repentino) (CUNNINGHAM; TUCCI, 2017; DROR; AVRAHAM, 2010), infecções congênitas (como citomegalovírus, herpes, rubéola, treponema e toxoplasmose) (DROR; AVRAHAM, 2010; KORVER *et al.*, 2018) e trauma (ANGELI; LIN; LIU, 2012). Estima-se que as causas genéticas representem de 50 a 70% dos casos de deficiência auditiva congênita. Embora a maioria dos casos hereditários de deficiência auditiva seja causada por variantes em genes nucleares, alterações em genes mitocondriais foram encontradas em pelo menos 5% dos pacientes com perda auditiva pós-lingual não sindrômica (ALVES *et al.*, 2016; CORDEIRO-SILVA *et al.*, 2010; FREI *et al.*, 2002). No Brasil, cerca de 5% da população apresenta algum tipo de deficiência auditiva e pouco mais de 1% declara não ouvir som algum (IBGE, 2012).

Considerando os casos de deficiência auditiva com etiologia genética, esse é um exemplo clássico de heterogeneidade genética multilocus, ou seja, vários loci diferentes relacionados com a mesma característica (ANGELI; LIN; LIU, 2012). Essa heterogeneidade genética da deficiência auditiva é um desafio ao diagnóstico molecular. Apesar disso, grandes progressos foram feitos na identificação de genes específicos e variantes que contribuem para a deficiência auditiva. Busca das causas moleculares da



deficiência auditiva têm sido bem-sucedidas em desvendar genes, assim como o número e a frequência dos alelos envolvidos na deficiência auditiva (ANGELI; LIN; LIU, 2012). Estudos de associação genômica ampla (GWAS) vem auxiliando na identificação das variantes causais da deficiência auditiva e técnicas como o sequenciamento de nova geração (NGS) - abrangendo testes genéticos como exomas, genomas e painéis de genes -, confirmam molecularmente o diagnóstico clínico dos pacientes (CAMPOS, 2021; LIMA, 2018).

## **1.1 Funcionamento normal da audição**

Para melhor entender a deficiência auditiva, é necessário entender como se dá o funcionamento normal da audição. Nos itens a seguir está apresentada, de forma breve, a anatomia e o funcionamento da orelha humana.

### **1.1.1 Orelha - anatomia**

A orelha é o órgão do equilíbrio e da audição e pode ser dividida em orelha externa, orelha média e orelha interna (Figura 1). O equilíbrio está relacionado ao aparelho vestibular, que está localizado nos canais semicirculares, e que tem como função detectar a posição do corpo no espaço, seja em situação estática ou em movimento (HIATT; GARTNER, 2011).

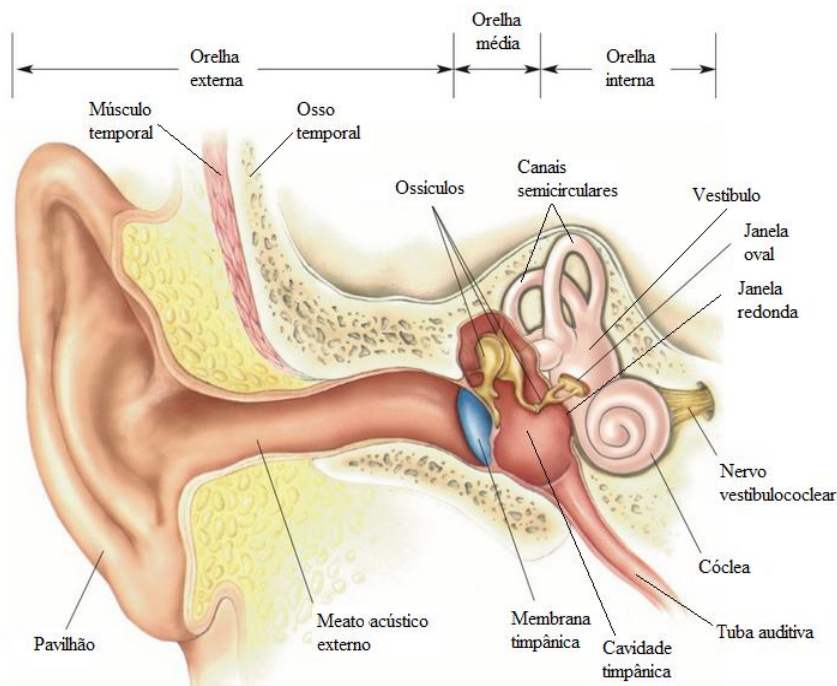


Figura 1. Anatomia da orelha externa, média e interna. Imagem modificada de Bear (2017).

A orelha externa é formada pelo pavilhão auricular e pelo meato acústico externo. A membrana timpânica define o limite da orelha externa e o início da orelha média; a cavidade medial à membrana timpânica é a cavidade timpânica e dentro desse espaço estão os ossículos da audição - martelo, bigorna e estribo, respectivamente. A base do estribo, chamada de platina, faz contato com a janela oval (orelha interna). Com um orifício na parede anterior da cavidade timpânica, a tuba auditiva se estende até a nasofaringe e tem como função o controle da pressão atmosférica. A orelha interna, também intitulada labirinto, pode ser dividida em sistema vestibular (canais semicirculares e vestibulo) e sistema auditivo (cóclea). Os canais semicirculares são três alças que se projetam do vestibulo em diferentes direções (superior e posterior). O vestibulo é a cavidade central da orelha interna e é formado por duas vesículas, o utrículo (contínuo com os canais semicirculares) e o sáculo (contínuo com a cóclea); essas vesículas, por sua vez, compõem as máculas, que contêm sensores biológicos chamados de células ciliadas (FULLER D, 2014).

A cóclea dá duas voltas e meia sobre si mesma, ao redor de seu eixo central, o modíolo (Figura 2 A); isso faz com que tenha o formato espiralado (lembrando a concha de um caracol). A cóclea possui três canalículos: escala vestibular, média e timpânica (Figura 2 B). A escala média está separada da vestibular (posicionada superiormente) pela membrana de Reissner e da escala timpânica (posicionada inferiormente) pela

membrana basilar. A escala vestibular e a timpânica estão preenchidas de perilinfa e, por uma abertura intitulada helicotrema, há a comunicação da perilinfa ao longo do canal ósseo. A escala média é composta pelo órgão específico da audição, o órgão de Corti (Figura 2 C), que recebe terminações nervosas periféricas provenientes da porção coclear do VIII nervo craniano; a parede lateral da rampa média está ligada ao labirinto pelo ligamento espiral. A ligação modiolar da rampa média é a lâmina espiral óssea. Juntando-se à lâmina espiral está a membrana basilar (FULLER D, 2014).

A estrutura básica do órgão de Corti inclui células de suporte (células pilares internas e células pilares externas) e células sensoriais (células ciliadas internas e células ciliadas externas); as células ciliadas internas são sustentadas por células pilares internas, células falangeais internas e células de borda. As células ciliadas externas são sustentadas por células pilares externas e internas e células de Deiters. Mais periféricas a essas estruturas estão as células de Hensen e as células de Claudius que repousam na membrana basilar, preenchem o espaço entre as células de Deiters e a base da estria vascular; no topo, os estereocílios das células ciliadas se fixam na membrana tectória. A endolinfa preenche o espaço entre a membrana tectória e a lâmina reticular (FULLER D, 2014; HIATT; GARTNER, 2011; KIMURA, 1975).

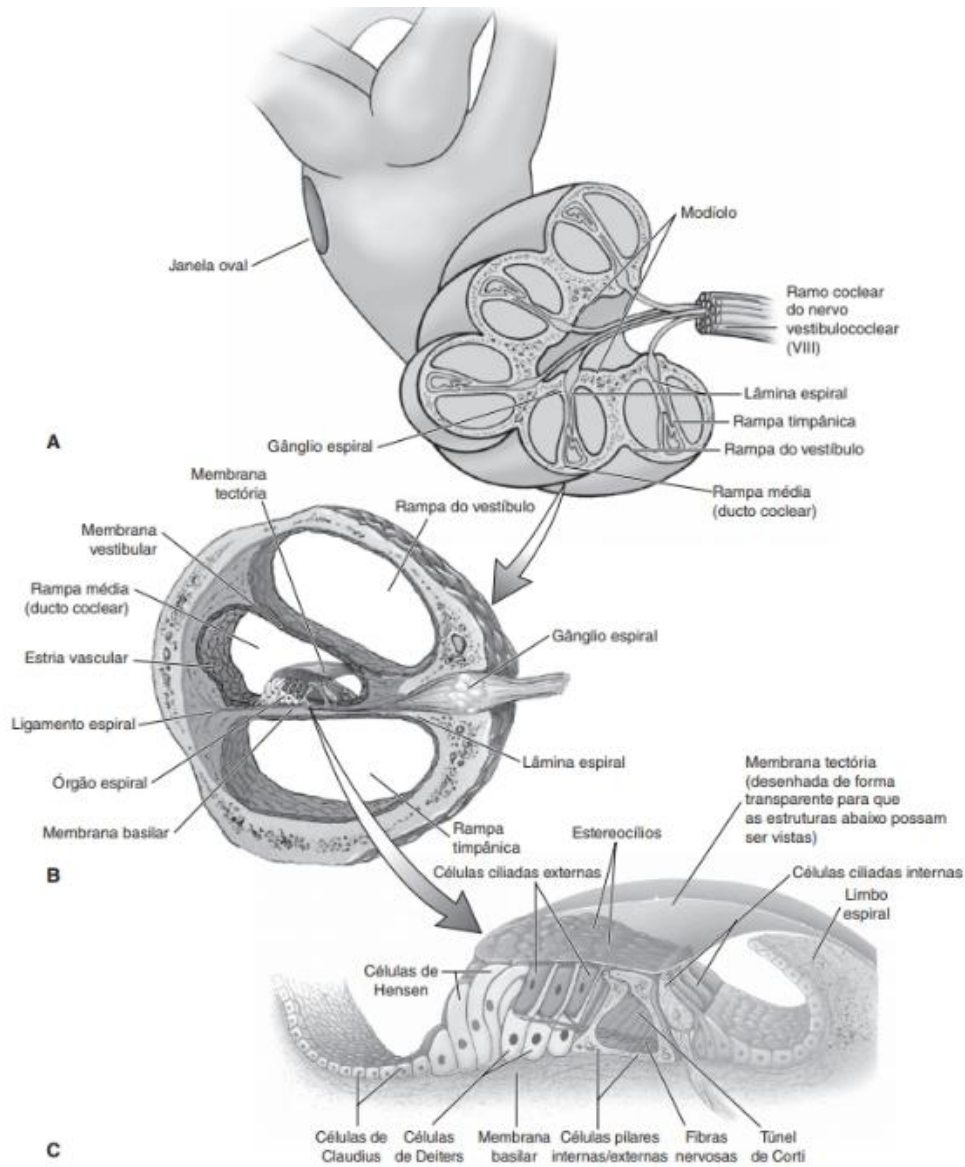


Figura 2. Corte transversal da cóclea. **A.** Enrolada ao redor do núcleo ósseo, a cóclea protege suas fibras nervosas. **B.** O labirinto membranoso divide o labirinto ósseo em duas partes: a rampa do vestíbulo acima e a rampa timpânica abaixo; a rampa média aloja o órgão terminal receptor da audição. **C.** as estruturas do órgão de Corti repousam na membrana basilar. Retirado de Fuller (2014).

### 1.1.2 Ouvir: da vibração ao som

A primeira etapa da percepção auditiva começa na orelha externa e consiste no direcionamento e na propagação das ondas sonoras. Isso ocorre quando as ondas sonoras incidem sobre o pavilhão auditivo que as direciona à concha do pavilhão; essas ondas se propagam pelo meato acústico externo e atingem a membrana timpânica - localizada na orelha média - , resultando em vibração. Essa vibração é transmitida aos

ossículos da orelha média - martelo, bigorna e estribo - em sequência, causando a amplificação do som. A platina do estribo se movimenta para dentro e para fora em um movimento contínuo, como um pistão, na parede da cóclea. Assim, as vibrações atingem a janela oval, na orelha interna e passam para os líquidos presentes na cóclea (perilinf e endolinfa) até atingirem as membranas basilares e tectórias, que são capazes de inclinar as células ciliadas. As células ciliadas fazem sinapses com neurônios cujos corpos celulares estão no gânglio espiral, dentro do modíolo, ou seja, a superfície das células ciliadas é modificada formando dezenas de filamentos ricos em actina, os estereocílios, que se movem de um lado para o outro com o movimento das células. Isso ocorre porque as células do gânglio espiral são bipolares, com os neuritos, estendendo-se para as porções lateral e basal das células ciliadas, onde estabelecem conexões sinápticas com as células ciliadas. Os axônios do gânglio espiral entram no nervo coclear, um ramo do nervo vestibulococlear (VIII nervo craniano), que se projeta aos núcleos cocleares no bulbo que, por sua vez, recebem as informações que são processadas, como tempo e qualidade do som. Outros neurônios se projetam para dois núcleos da ponte, depois a informação segue para os núcleos no mesencéfalo e no tálamo para depois se direcionarem para o córtex auditivo (CURI, 2017; FULLER D, 2014; MOURÃO, 2012).

## 1.2 Classificação da deficiência auditiva

A deficiência auditiva pode ser classificada segundo vários parâmetros. No Quadro 1 estão apresentados os diversos tipos de classificação utilizada.

Quadro 1. Classificação da deficiência auditiva.

PARÂMETROS	CLASSIFICAÇÃO	REFERÊNCIAS
Tipo ou local da alteração	<u>Condutiva</u> : alteração da orelha externa ou média <u>Neurosensorial</u> : alterações na orelha interna (na cóclea ou no gânglio espiral) <u>Mista</u> : combinação do tipo condutiva e neurosensorial	ALFORD <i>et al.</i> , 2014; CUNNINGHAM; TUCCI, 2017
Clínica	<u>Sindrômica</u> : quando apresenta associação com outras características clínicas, como	ALFORD <i>et al.</i> , 2014

	<p>por exemplo, dismorfias, deficiência intelectual, alterações cardíacas, polidactilia, dentre outros</p> <p><u>Não Sindrômica</u>: quando não apresenta associação com outras características clínicas, ou seja, quando a perda auditiva é o único fenótipo presente</p>	
Início da perda auditiva	<p><u>Congênita</u>: observada desde o nascimento</p> <p><u>Pré-lingual</u>: observada antes do desenvolvimento da fala</p> <p><u>Pós-lingual</u>: observada depois do desenvolvimento da fala</p>	ALFORD <i>et al.</i> , 2014
Lateralidade ou simetria	<p><u>Unilateral ou assimétrica</u>: afeta somente um dos lados (direito ou esquerdo)</p> <p><u>Bilateral ou simétrica</u>: afeta ambos os lados (direito e esquerdo)</p>	ALFORD <i>et al.</i> , 2014
Estabilidade	<p><u>Progressiva</u>: limiares aumentam ao decorrer do tempo</p> <p><u>Estacionária</u>: limiares não variam ao decorrer do tempo</p> <p><u>Flutuante</u>: limiares aumentam e diminuem ao decorrer do tempo, ou seja, a perda auditiva não é estável</p>	ALFORD <i>et al.</i> , 2014
Grau	<p><u>Leve</u>: limiar auditivo de 26 – 40 dB</p> <p><u>Moderado</u>: limiar auditivo de 41–55 dB</p> <p><u>Moderadamente grave</u>: limiar auditivo de 56–70 dB</p> <p><u>Grave</u>: limiar auditivo de 71–90 dB</p> <p><u>Profunda</u>: limiar auditivo a partir de 91 dB</p>	ALFORD <i>et al.</i> , 2014; CLARK, 1981

A seguir apresentamos de maneira mais aprofundada a classificação clínica, assim como exemplos de patologias.

### 1.2.1 Deficiência auditiva sindrômica

A deficiência auditiva sindrômica é a deficiência auditiva acompanhada de outras características clínicas (KOFFLER; USHAKOV; AVRAHAM, 2015). Estima-se que 30% dos casos de deficiência auditiva sejam sindrômicos (ALFORD *et al.*, 2014; FRIEDMAN *et al.*, 2003; KOFFLER; USHAKOV; AVRAHAM, 2015). Mais de 500 síndromes que incluem deficiência auditiva já foram descritas, (CUNNINGHAM; TUCCI, 2017) sendo que foram observados padrão de herança autossômico recessivo,

autossômico dominante, ligado ao X e mitocondrial (ALFORD *et al.*, 2014). Abaixo estão brevemente descritas síndromes que apresentam a deficiência auditiva como uma de suas características. As síndromes aqui descritas são consideradas as mais conhecidas (KOFFLER; USHAKOV; AVRAHAM, 2015).

### 1.2.1.1 Síndrome branquio-oto-renal

A Síndrome branquio-oto-renal (BOR) (OMIM 113650) apresenta um padrão de herança autossômico dominante, cuja incidência estimada é de 1:40000 (SONG, M. H. *et al.*, 2013) e é considerada a deficiência auditiva sindrômica com etiologia genética mais comum (LINDAU *et al.*, 2014). O fenótipo é caracterizado por I) fístulas branquiais ou cistos, II) deficiência auditiva neurossensorial, condutiva ou mista (defeitos estruturais dos ouvidos externo, médio e interno) e III) anormalidades renais (SMITH; SCHWARTZ, 1998). Variantes no gene *EYAI* são as mais comuns, com 40% dos casos; variantes nos genes *SIX1* e *SIX5* também foram descritas (LINDAU *et al.*, 2014; SONG, M. H. *et al.*, 2013).

### 1.2.1.2 Síndrome de Waardenburg

A Síndrome de Waardenburg é uma doença genética e clinicamente heterogênea, o que faz com que seja classificada em quatro tipos: tipo I (OMIM 193500), tipo II (OMIM 193510), tipo III (OMIM 148820) e tipo IV (OMIM 277580). A incidência estimada varia entre 1:40000 e 1:42000 (ROSA JÚNIOR *et al.*, 2019; SONG, J. *et al.*, 2016). O fenótipo pode abranger características clínicas como deficiência auditiva neurossensorial congênita, distúrbios pigmentares da íris, pigmentação da pele e/ou cabelos anômala, distopia *canthorum* e alargamento da sobrancelha medial (READ; NEWTON, 1997; SONI; KUMAR, 2010). Características e genes da Síndrome de Waardenburg se encontram no Quadro 2.

Quadro 2. Diferenciação entre os quadros fenotípicos da Síndrome de Waardenburg e seus respectivos genes associados.

Tipo	Padrão de herança	Características	Genes associados	Referências
I	AD	apresenta distopia <i>canthorum</i>	<i>PAX3</i>	READ; NEWTON, 1997; SONG, J. <i>et al.</i> , 2016

II	AR/AD	não apresenta distopia <i>canthorum</i>	<i>MITF</i> , <i>SNAI2</i> e <i>SOX10</i>	READ; NEWTON, 1997; SONG, J. <i>et al.</i> , 2016
III	AD	associado a anormalidades musculoesqueléticas	<i>PAX3</i>	READ; NEWTON, 1997; SONG, J. <i>et al.</i> , 2016
IV	AR/AD	associado a Doença de Hirschsprung	<i>EDN3</i> , <i>EDNRB</i> e <i>SOX10</i>	READ; NEWTON, 1997; SONG, J. <i>et al.</i> , 2016

AD: autossômico dominante; AR: autossômico recessivo.

### 1.2.1.3 Síndrome de CHARGE

A Síndrome de CHARGE (OMIM 214800) é uma doença genética rara e na maioria dos pacientes é explicada por uma variante *de novo*. Quando herdado, apresenta padrão de herança autossômico dominante. O único gene associado à síndrome, até o presente momento, é o *CHD7* (BLAKE; PRASAD, 2006; USMAN; SUR, 2021). A prevalência estimada é de 1:10000 (BLAKE *et al.*, 1998). É caracterizada por ter um padrão de anomalias congênitas, onde há a combinação variável de anomalias múltiplas, incluindo malformações da orelha, atresia coanal, coloboma, malformações do coração, disfunção do nervo craniano, defeitos do sistema nervoso central, hipoplasia genital e características faciais dismórficas (BLAKE; PRASAD, 2006; USMAN; SUR, 2021).

### 1.2.1.4 Síndrome de Usher

A Síndrome de Usher é uma doença caracterizada por perda auditiva neurossensorial, perda de visão devido à retinite pigmentosa e disfunção vestibular (KIMBERLING *et al.*, 2010; MATHUR; YANG, 2014). Apresenta um padrão de herança autossômico recessivo, cuja prevalência é estimada em 4-17:100000 (KIMBERLING *et al.*, 2010; MATHUR; YANG, 2014; WHATLEY, 2020). É classificada em três tipos com base na presença, gravidade e progressão dos sintomas auditivos, visuais e vestibulares: tipo I (OMIM 276900), tipo II (OMIM 605472) e tipo III (OMIM 276902). Características e genes da Síndrome de Usher se encontram no Quadro 3.



Quadro 3. Diferenciação entre os quadros fenotípicos da Síndrome de Usher e seus respectivos genes associados.

Tipo	Características	Genes associados	Referências
I	Forma mais grave. Os pacientes apresentam DA neurossensorial profunda e disfunção vestibular congênitas e retinite pigmentosa progressiva. Ocorre em 1/3 dos casos de Síndrome de Usher.	<i>MYO7A</i> , <i>USH1C</i> , <i>CDH23</i> , <i>PCDH15</i> , <i>USH1G</i> e <i>CIB2</i>	MATHUR; YANG, 2014; WHATLEY, 2020.
II	Forma menos grave. Os pacientes apresentam DA neurossensorial (moderada a grave), função vestibular normal e retinite pigmentosa que começa geralmente durante a puberdade. Ocorre em mais da metade dos casos de Síndrome de Usher.	<i>USH2A</i> , <i>ADGRV1</i> e <i>WHRN</i>	MATHUR; YANG, 2014; WHATLEY, 2020.
III	Forma mais rara. Os pacientes apresentam fisiologia normal ao nascimento, com níveis variáveis de audição, visão e deterioração vestibular ao longo do tempo. Ocorre em aproximadamente 2% dos casos de Síndrome de Usher.	<i>CLRN1</i>	MATHUR; YANG, 2014; WHATLEY, 2020.

## 1.2.2 Deficiência auditiva não sindrômica

A deficiência auditiva não sindrômica é caracterizada por não estar acompanhada de outras características clínicas (VAN CAMP; WILLEMS; SMITH, 1997). Estima-se que 70% da perda auditiva genética seja não sindrômica. O padrão de herança pode ser autossômico recessivo (~ 80%), autossômico dominante (~ 15%), ligado ao X (~ 1%) ou mitocondrial (~ 1%) (ALFORD *et al.*, 2014). Em populações europeias, incluindo eurodescendentes, a causa mais frequente de deficiência auditiva autossômica recessiva não sindrômica é alteração da proteína de junção comunicante codificada pelo gene *GJB2* (CORDEIRO-SILVA *et al.*, 2010; WILCOX *et al.*, 2000).

### 1.2.2.1 *GJB2*

O gene *GJB2* está localizado na região cromossômica 13q12.11. Diversas mutações já foram descritas como associadas com a deficiência auditiva. Esse é o gene responsável por codificar uma proteína de ligação gap, chamada conexina 26 (CX26), e apresenta um único exon (LEFEBVRE; VANDEWATER, 2000). Seis subunidades de CX26 formam uma conexona, sendo que conexonas de duas células adjacentes se ligam criando um canal intercelular (LEFEBVRE; VANDEWATER, 2000) que, por sua vez, é indispensável para o sistema de trocas de eletrólitos e metabólitos das células (BRUZZONE; WHITE; PAUL, 1996). Na cóclea, esses canais são responsáveis por manter a homeostase de íons de potássio nas células ciliadas, cuja função é transformar o estímulo sonoro em sinal bioelétrico pelo fluxo dos íons de potássio (LEFEBVRE *et al.*, 1990). Dessa forma, quando a CX26 não é codificada corretamente, ocorre uma interrupção da reciclagem do potássio e a sua alta concentração na endolinfa dos dutos cocleares causa uma intoxicação no órgão de Corti, ocasionando a perda de audição neurossensorial (LEFEBVRE *et al.*, 1990). Dentre as mutações no gene *GJB2* que ocasionam deficiência auditiva não sindrômica autossômica recessiva (DFNB), a variante c.35delG (rs80338939) é a mais frequente (60-85%) na população europeia e eurodescendente (ANGELI; LIN; LIU, 2012). Nos indivíduos afetados, esta mutação pode estar presente em homozigose ou heterozigose composta (CORDEIRO-SILVA *et al.*, 2010).

#### **1.2.2.1.1 Variante c.35delG**

A c.35delG é uma variante de ponto, a deleção de uma guanina (G) em uma sequência de seis guaninas, que se estendem da posição 30 a 35 dos nucleotídeos, no exon codificante do gene da CX26, resultando na formação de um códon de terminação. Esta deleção resulta na síntese de um polipeptídeo incompleto, com 12 aminoácidos, em vez do normal, com 226 (CORDEIRO-SILVA *et al.*, 2010; PIATTO *et al.*, 2005). É uma variante na região exônica, de efeito *frameshift* (variante de mudança de quadro de leitura) e frequência de 0,62%.

Essa variante é a causa genética mais comum da deficiência auditiva não sindrômica. A prevalência desta variante foi estimada em diversos países, tendo sido observada uma grande variação nas diversas populações. Com exceção de europeus e eurodescendentes, a implicação da c.35delG na perda auditiva é rara, levando à hipótese

de que esta é uma variante fundadora entre populações de ascendência europeia (LEBEKO *et al.*, 2015).

Estudos de prevalência dessa variante foram realizados tanto em amostras populacionais de indivíduos com audição normal, como de indivíduos afetados. Para a realização desses estudos, as amostras podem ser coletadas de pessoas de todas as faixas etárias - recém-nascidos, crianças e/ou indivíduos adultos - podendo ser de uma cidade, um estado, um país ou até mesmo um continente.

Considerando populações de indivíduos com audição normal, no estado de Nova Iorque (EUA), em triagem realizada em uma população de 2089 neonatos, foi encontrada a prevalência de 1,29% de heterozigotos para a variante c.35delG (FITZGERALD *et al.*, 2004). Em uma revisão sistemática sobre a prevalência da variante c.35delG no Oriente Médio, abrangendo 15 populações, a prevalência mínima foi de 0% na Palestina e a máxima foi de 3,39% em Judeu Persa (KOOHIYAN; KOOHIAN; AZADEGAN-DEHKORDI, 2020).

Em Campinas (SP, Brasil), um estudo considerando neonatos com audição normal detectou 6/620 neonatos com a variante c.35delG, onde todos os seis eram heterozigotos; a prevalência de portadores da variante foi de 0,97%, aproximadamente 1:103 heterozigotos (SARTORATO *et al.*, 2000). Em um estudo realizado com neonatos do Hospital de Base de São José do Rio Preto, a variante foi encontrada em 5/223 indivíduos, sendo que todos os 5 eram heterozigotos; a prevalência foi de 2,24%, aproximadamente 1:44 heterozigotos (PIATTO *et al.*, 2005). Outro estudo, realizado em quatro regiões brasileiras (norte, nordeste, sudeste e sul), encontrou a variante c.35delG em 25/1856 recém-nascidos, sendo que todos os 25 eram heterozigotos; a prevalência de portadores da variante foi de 1,35%, aproximadamente 1:74 heterozigotos (OLIVEIRA *et al.*, 2007).

No caso de indivíduos com deficiência auditiva não síndrômica, a contribuição da variante c.35delG tem uma grande variação entre diferentes populações, demonstrando a heterogeneidade genética existente entre os diversos países. Em Omã a contribuição foi de 0% (SIMSEK *et al.*, 2001), na Espanha foi de 55% (RABIONET *et al.*, 1999) e na Itália de 88% (RABIONET *et al.*, 1999).

Uma série de estudos acerca da prevalência desta variante em indivíduos com deficiência auditiva foi realizada no Brasil (Quadro 4). Observa-se que a maior frequência alélica foi em São José do Rio Preto e a menor em Belém.

Quadro 4. Prevalência da variante 35delG em pacientes com deficiência auditiva no Brasil.

Local do estudo	n	Pacientes homozigotos	Pacientes heterozigotos	Referências
Belém (PA)	77	1	6	DE CASTRO <i>et al.</i> , 2013
Campinas (SP)	75	2	4	PFEILSTICKER <i>et al.</i> , 2004
Espírito Santo (ES)	77	3	5	CORDEIRO-SILVA <i>et al.</i> , 2010
Minas Gerais (MG)	53	0	9	SCHÜFFNER <i>et al.</i> , 2018
Porto Alegre (RS)	37	3	4	MOTTA <i>et al.</i> , 2012
São José do Rio Preto (SP)	33	5	4	PIATTO <i>et al.</i> , 2004
São Paulo (SP) e Paraná (PR)	300	22	15	BATISSOCO <i>et al.</i> , 2009
TOTAL	652	36	47	-

### 1.2.3 Genes associados a deficiência auditiva

Para a deficiência auditiva autossômica recessiva, variantes nos genes *GJB2*, *SLC26A4*, *MYO15A*, *OTOF*, *CDH23* e *TMCI* estão mais frequentemente observadas (ANGELI; LIN; LIU, 2012; MEENA; AYUB, 2017). Para a deficiência auditiva autossômica dominante, observam-se mutações em *WFS1*, *MYO7A* e *COCH* (ANGELI; LIN; LIU, 2012). Para a população afrodescendente (afro-americanos, afro-brasileiros, camaroneses, ganeses, quenianos/sudaneses, sul-africanos “*black south african*”, sul-africanos da Província de Limpopo, tribo Yoruba e ugandeses) com deficiência auditiva não síndrômica, os genes causadores mais frequentes são: *GJB2*, *MARVELD2*, *MYO3A*, *MYO6*, *MYO7A*, *POU3F4*, *SIX1*, *SLC26A4*, *TRIOBP*, *MT-CYB*, *MT-ND3* e *MT-RNR1* (RUDMAN *et al.*, 2017).

Os genes *MYO7A*, *POU3F4*, *SIX1*, *SLC26A4* e *WFS1* estão associados tanto na deficiência auditiva síndrômica quanto na não síndrômica. O gene *CDH23* está associado, unicamente, a deficiência auditiva síndrômica. Os genes *COCH*, *GJB2*, *MARVELD2*, *MYO3A*, *MYO6*, *OTOF*, *TMCI*, *TRIOBP*, *MT-CYB*, *MT-ND3* e *MT-RNR1* estão associados a deficiência auditiva não síndrômica.

Os genes aqui descritos foram selecionados por serem causais tanto para a deficiência auditiva sindrômica quanto para a não sindrômica.

### **1.2.3.1 *SLC26A4***

Também conhecido como gene *PDS*, está localizado na região cromossômica 7q22.3. Variantes no gene *SLC26A4* são conhecidamente causativos da Síndrome de Pendred (OMIM 274600) e da deficiência auditiva autossômica recessiva 4, com aqueduto vestibular alargado (EVA) (OMIM 600791). Esse gene codifica um transportador de ânions conhecido como pendrina. Essa proteína é expressa nas células epiteliais cocleares da proeminência espiral, células da raiz, nas células fusiformes da estria vascular, na membrana apical das células epiteliais do saco endolinfático e nas células epiteliais que circundam as células ciliadas do sáculo, utrículo e ampola. A maioria das variantes *missense* associadas à deficiência auditiva leva à perda de função de pendrina com retenção intracelular (ALPER; SHARMA, 2013).

### **1.2.3.2 *MYO7A***

Esse gene está localizado na região cromossômica 11q13.5. Variantes no gene *MYO7A* são conhecidamente a causa da Síndrome de Usher tipo IB (OMIM 276900), deficiência auditiva não sindrômica autossômica recessiva (OMIM 600060) e deficiência auditiva não sindrômica autossômica dominante (OMIM 601317) (TOMS; PAGARKAR; MOOSAJEE, 2020). Esse gene codifica uma miosina não convencional, que é constituída por 55 exons (MEENA; AYUB, 2017). Miosinas não convencionais são moléculas motoras com cabeças estruturalmente conservadas que se movem ao longo dos filamentos de actina (WEIL *et al.*, 1995). A miosina VIIA é geralmente expressa em tecidos epiteliais da retina e do ouvido interno. As células ciliadas e os estereocílios do ouvido interno contêm principalmente a proteína miosina VIIA (Meena R, 2017).

### **1.2.3.3 *SIX1***

Esse gene está localizado na região cromossômica 14q23.1 e codifica um fator de transcrição. Variantes no gene *SIX1* foram descritos como a etiologia de determinados tipos de deficiência auditiva autossômica dominante (OMIM 605192) e de BOR (KOCHHAR *et al.*, 2008; LINDAU *et al.*, 2014). Durante a organogênese de

mamíferos, um complexo SIX1-DACH regula a proliferação celular e a apoptose. *SIX1* tem dois domínios evolutivamente conservados: o domínio SIX (SD) é responsável pelas interações proteína-proteína, e o homeodomínio (HD) é essencial para a ligação proteína-DNA (KOCHHAR *et al.*, 2008).

### **1.3 Sequenciamento de Nova Geração (NGS)**

O sequenciamento de Sanger é considerado como da primeira geração de sequenciamento de nucleotídeos. Por essa técnica, um pequeno fragmento do DNA é sequenciado por vez. Com o advento de novas tecnologias, o sequenciamento em larga escala, intitulado sequenciamento de nova geração (NGS) ou sequenciamento massivo em paralelo (MPS), se tornou possível. Devido à redução de custo e de tempo empregado para a análise de NGS, testes genéticos (abrangendo genotipagem, análise de genes únicos, painéis de genes, exomas, genomas, transcriptoma, epigenoma e metagenoma) se tornaram cada vez mais utilizados, tanto na medicina diagnóstica, quanto na pesquisa (RICHARDS *et al.*, 2015).

O sequenciamento de nova geração vem sendo também utilizado na busca da etiologia genética da deficiência auditiva, sendo que já foi aplicado em pesquisas do grupo de pesquisa ao qual a presente dissertação está vinculada. Em Sakata (2016) foi realizada a técnica de análise cromossômica por *microarray* (CMA), utilizando chips CytoScan 750k Array (Affymetrix) para identificar alterações submicroscópicas, com o intuito de explicar o quadro clínico de pacientes com deficiência auditiva sindrômica; em Lima (2018) foi desenvolvido um painel de exoma direcionado para diagnóstico de deficiência auditiva sindrômica; em Campos (2021) foi realizado sequenciamento de exoma direcionado, utilizando o painel *SeqCap EZ Inherited Disease Panel* e exoma completo para buscar a etiologia genética do deficiência auditiva em pacientes de Boca da Mata (Alagoas).

O sequenciamento do genoma completo (GWS) pode cobrir até 98% de todo o genoma humano, enquanto o exoma (WES) cobre apenas 1-2% do genoma, mas quase 95% das regiões de codificação (ALFARES *et al.*, 2018). Estima-se que 85% das variantes causais estejam no exoma (MAJEWSKI, *et al.*, 2011; PEERSEN *et al.*, 2017). Além disso, as variantes exônicas são causais para a maioria das doenças monogênicas (KUHLENBAÜMER, *et al.*, 2010; PEERSEN *et al.*, 2017).

### 1.3.1 Achados Incidentais

À medida que o sequenciamento passou a ser realizado em larga escala, surgiram questionamentos, dentre eles o grande desafio da definição dos limites de análise de dados. Quando a amostra de um paciente é analisada utilizando NGS, principalmente em análise de exoma e genoma, um grande número de variantes, além das de interesse para a resolução do caso em questão, pode ser detectado. Embora muitas dessas variantes não sejam clinicamente relevantes ou não sejam interpretáveis, uma minoria pode ter implicações médicas importantes para o indivíduo sequenciado, bem como para outros membros da família. Essas variantes são intituladas “achados incidentais” (WATSON, 2015).

Em março de 2013, o Colégio Americano de Genética Médica e Genômica (ACMG) destacou 57 genes para os quais variantes patogênicas estão associadas a predisposição de uma doença. Os genes foram escolhidos com base na possibilidade da realização de tratamentos precoces para doenças que ainda não se manifestaram e que representam grande risco futuro, tendo como consequência direta reduzir morbidade e mortalidade de pacientes diagnosticados (GREEN *et al.*, 2013). A última versão da lista foi publicada em 2021 e conta com 73 genes (MILLER *et al.*, 2021).

O lançamento deste conjunto de recomendações não esclareceu, em um primeiro momento, se a análise desses 57 genes era obrigatória ou não. Em março de 2014, a ACMG atualizou suas recomendações: os pacientes podem recusar a análise de genes não relacionados à indicação do teste; a decisão deve ser tomada durante o processo de consentimento informado antes do teste (WATSON, 2015).

### **1.3.2 Achados Secundários**

A análise de NGS pode, ainda, identificar variantes causais que não respondam a pergunta inicial do teste ou não se enquadrem como achados incidentais. Nesses casos, optou-se por usar o termo “achados secundários” ao se referir a essas variantes.

Os achados secundários podem, portanto, ajudar a elucidar todo o quadro clínico dos pacientes, ou seja, caso o paciente tenha outras doenças/síndromes genéticas, as variantes causais serão consideradas achados secundários.



## **2. JUSTIFICATIVA**

A deficiência auditiva é considerada o distúrbio sensorial mais comum, afetando aproximadamente um em cada mil indivíduos no nascimento ou durante a primeira infância. Pode estar relacionada a causas genéticas, ambientais ou a uma combinação de ambas. Com relação às causas genéticas, foco do presente trabalho, observa-se que o melhor conhecimento associado a ampliação no repertório de novas tecnologias, vem permitindo o encontro do diagnóstico molecular para um número muito maior de casos. O diagnóstico molecular de deficiência auditiva no Distrito Federal, em particular na rede pública de saúde, é ainda deficitário. Neste trabalho buscou-se contribuir na busca da etiologia genética de casos de deficiência auditiva, visando não só possibilitar um melhor aconselhamento genético das famílias envolvidas, como também expandir o conhecimento a respeito.

### **3. OBJETIVOS**

#### **Objetivo geral**

O objetivo principal deste trabalho é buscar a etiologia genética para casos de deficiência auditiva sindrômica e não sindrômica em pacientes do Distrito Federal.

#### **Objetivo específico**

- Implantar e realizar triagem da variante c.35delG em pacientes dos ambulatórios de genética e otorrinolaringologia do Hospital Universitário de Brasília.
- Buscar a etiologia genética de casos de deficiência auditiva utilizando a metodologia de análise de exoma e, por consequência, contribuir para o diagnóstico molecular dessa patologia.
- Avaliar o sucesso diagnóstico utilizando as metodologias eleitas.

## **4. MATERIAL E MÉTODOS**

### **4.1 Aspectos éticos**

Este trabalho integra o projeto intitulado “Desenvolvimento de diagnóstico molecular e fluxograma laboratorial para deficiência auditiva não síndrômica de etiologia genética”, aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade de Brasília, número CAAE 58055816.3.0000.0030 e parecer número 1.874.081 (ANEXO 1). Os pacientes recrutados e/ou seus responsáveis foram informados a respeito dos objetivos e metodologias do projeto de pesquisa, assim como sobre o sigilo a respeito de suas identidades. Aqueles que concordaram em participar assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido – TCLE; no caso de pacientes menores de idade, o TCLE foi assinado por seus responsáveis legais.

### **4.2 Seleção de Pacientes**

Os pacientes foram recrutados no Hospital Universitário de Brasília (HUB) nos ambulatórios de otorrinolaringologia e de genética. Foram recrutados 27 pacientes os quais cumpriam os critérios de inclusão e não foram excluídos. Os seguintes critérios foram utilizados para a inclusão dos pacientes:

- Ter diagnóstico clínico de deficiência auditiva síndrômica ou não síndrômica com proposta de etiologia genética;
- Não ter diagnóstico molecular definido;
- Ser paciente dos ambulatórios de otorrinolaringologia ou de genética do Hospital Universitário de Brasília (HUB).

Ao final, foram recrutados 27 pacientes oriundos dos ambulatórios de Otorrinolaringologia (n=14) e de Genética (n=13) do Hospital Universitário de Brasília, que consentiram com a sua participação ou a de seu dependente no projeto ao assinar o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido –TCLE (ANEXOS 2, 3 e 4). Desses pacientes, 15/27 eram do sexo feminino, 16/27 tem diagnóstico clínico não síndrômico, 6/27 são filhos de pais consanguíneos e 12/27 alegam ter algum parente com perda auditiva/deficiência auditiva precoce.

Para os pacientes oriundos do ambulatório de otorrinolaringologia, optou-se por renomear as amostras dos pacientes seguindo o código DA\_01, DA\_02, DA\_03 e assim por diante. Para os pacientes oriundos do ambulatório de genética, optou-se por manter a nomenclatura interna do ambulatório para cada paciente.

#### **4.3 Coleta de material biológico**

A coleta de material biológico foi feita no Laboratório de Emergência do Hospital Universitário de Brasília. O sangue dos pacientes foi coletado em um tubo com EDTA. Esse tubo, por sua vez, foi encaminhado ao Laboratório de Genética da Faculdade de Medicina da UNB, no campus Darcy Ribeiro. O armazenamento das amostras foi eleito de acordo com o tempo até a extração. Quando a extração de DNA foi feita em até um dia após o recebimento da amostra, esta foi guardada em geladeira, com resfriamento de 4-6°C. Quando a extração de DNA foi feita depois de um dia após o recebimento da amostra, esta foi guardada no freezer, com temperatura de -12°C.

#### **4.4 Extração e quantificação de DNA**

A extração de DNA a partir de sangue total foi feita segundo protocolo adaptado do kit comercial *Gentra Purigene Blood kit* (<https://www.qiagen.com>). O protocolo (ANEXO 5) consiste na lise celular com detergente na presença de um estabilizador de DNA, precipitação de proteínas e contaminantes, precipitação do DNA em isopropanol 100% e remoção de resíduos com etanol 70% e diluição do DNA em TE 1X (ou água mili-Q). Após a extração de DNA a partir do sangue coletado, o material genético foi avaliado qualitativamente e quantitativamente utilizando o sistema *NanoDrop™ 2000* (*Thermo Scientific*) (ANEXO 6). Consecutivamente, foi feita a diluição de parte do material genético para uma concentração de DNA de 20ng/μL.

#### **4.5 Análise da presença da mutação c.35delG**

Tendo em vista que mutações no gene *GJB2* são a causa mais comum de perda auditiva em pacientes não sindrômicos e que a mutação mais comum é a c.35delG (observada em até 70% dos casos), optou-se por sequenciar a região contendo essa mutação (fragmento de 1007 pb) como forma de triagem, utilizando os seguintes primers:

Primer F: 5' ACCTGTTTTGGTGAGGTTGTGT 3'

Primer R: 5' GCATCTGGAGTTTCACCTGAG 3'

Foi realizada amplificação por PCR, utilizando os seguintes parâmetros: estágio 1) 1 ciclo de 95°C por 1 minuto; estágio 2) 34 ciclos de 94°C por 1 minuto, 60°C por 1 minuto e 72°C por 1 minuto e 30 segundos; estágio 3) 1 ciclo de 72°C por 5 minutos e 4°C ∞. Os reagentes utilizados e suas respectivas concentrações encontram-se na tabela 1.

Tabela 1. Concentrações dos reagentes na solução de reação de PCR para amplificação da região contendo a mutação c.35delG.

Reagente	Concentração (solução de trabalho)	µl por amostra	Final
H <sub>2</sub> O	---	28.3	---
MgCl <sub>2</sub>	50 mM	1.5	1.5mM
Buffer	10X	5.0	1X
dNTPs	2 mM	6.0	0.24mM
Primer 1 F	15 pmoles/µl	2.0	0.6µM
Primer 2 R	15 pmoles/µl	2.0	0.6µM
Taq	5U/µl	0.2	1U
Amostra de DNA	Variável	até 5	100ng
<b>Total</b>	<b>---</b>	<b>50.0</b>	

Após a PCR, foi realizado um *checkpoint*, por meio da técnica de eletroforese, onde se averiguou se houve a amplificação do produto do PCR. Para tal, utilizou-se gel de agarose 1% (1g de agarose em 100mL de TBE) com a adição de 5µL de brometo de etídio. A eletroforese foi realizada com os seguintes parâmetros: 100 Volts e 120

Amperes por 60 minutos. A análise do gel foi feita com o uso de um transluminador com luz UV.

Os fragmentos de DNA obtidos na PCR foram purificados com a enzima ExoSAP - IT™ Express da Applied Biosystems®, utilizando o protocolo oferecido pelo fabricante. Em um microtubo de 0,2mL, o produto de PCR (5 µl) foi tratado com o reagente ExoSAP-IT Express (2 µl). O tratamento foi realizado a 37 ° C por 4 minutos, seguido por um período de incubação a 80 ° C por 1 minuto para inativar irreversivelmente ambas as enzimas.

Depois de purificados, os produtos de PCR foram preparados para as reações de sequenciamento em ambas as direções utilizando ABI BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit, polímero POP-7 para ABI 3130 e 3130xL e o aparelho ABI 3730 (Applied Biosystems). Foram preparados dois microtubos para cada amostra, um tubo com a reação do *primer F* e outro com a reação do *primer R* (Tabela 2). Após, os microtubos contendo a solução de reação foram colocados no termociclador para a realização da reação de sequenciamento (Tabela 3).

Tabela 2. Solução de reação para sequenciamento da região contendo a mutação c.35delG.

<b>Reagente</b>	<b>µl por amostra</b>
BigDye® Terminator v3.1	2.0
5x Sequencing Buffer	1.0
Primer F ou R (10 pmoles/ µl)	1.0
H2O	4.0
Produto de PCR purificado	2.0
<b>Total</b>	<b>10.0</b>

Tabela 3. Informações dos ciclos no termociclador para o sequenciamento.

<b>Etapa</b>	<b>Temperatura (°C)</b>	<b>Tempo</b>
1. desnaturação	95	20 seg
2. hibridação	**	15 seg
3. extensão	72	1 min

4. repetir 30X a partir da 1º etapa	---	---
5. Frio	10	∞
6. Fim		

---

Para a purificação do produto da reação de sequenciamento, preencheu-se a placa MultiScreen® - HV (MILLIPORE) com Sephadex™ G-50 em Fine, utilizando a Multiscreen Column Loader 45UL, hidratando cada coluna com 300 µL de água estéril. Em seguida a placa foi acoplada em uma placa coletora e centrifugada a 2100 rpm por 5 minutos. Após a centrifugação, o sobrenadante foi descartado e 150µL de água estéril foi adicionado em cada coluna, seguida de centrifugação a 2100 rpm por 8 minutos. Descartou-se o sobrenadante e a placa com Sephadex foi acoplada a uma nova placa. Acrescentou-se 5µL de água milli-Q em cada amostra, assim como 15µL do produto da reação de sequenciamento sobre o Sephadex. Em seguida houve nova centrifugação de 2100 rpm por 5 minutos; após, desprezou-se a placa de Sephadex. A placa com as amostras eluídas foi vedada com selo e identificada. As sequências geradas foram comparadas com a sequência referência do gene *GJB2* (sequence ID: NG\_008358.1) para averiguação da mutação c.35delG, utilizando o software Chromas LITE versão 2.1.1 da Technelysium Pty Ltd com sede na Austrália.

#### 4.6 Exoma

As amostras de DNA selecionadas para o sequenciamento de exoma completo (WES) foram enviadas para a empresa MacroGen® com sede em Seul, Coréia do Sul. Antes do processamento das amostras, elas passaram por um teste de qualidade interno da MacroGen® e as amostras qualificadas seguiram para a etapa seguinte do processo: a construção da biblioteca. A metodologia solicitada para o sequenciamento foi a Illumina NGS.

De acordo com o relatório enviado pela MacroGen®, a construção da biblioteca de sequenciamento consistiu na preparação por fragmentação aleatória da amostra de DNA, seguida por ligação de adaptador 5' e 3'. Alternativamente, a marcação combinou

as reações de fragmentação e ligação em uma única etapa. Os fragmentos ligados ao adaptador foram amplificados por PCR e purificados em gel.

Para geração de *cluster*, a biblioteca foi carregada em uma célula de fluxo onde os fragmentos foram capturados pelos oligos ligados à superfície complementar aos adaptadores da biblioteca. Cada fragmento foi amplificado em *clusters* clonais distintos pela amplificação em ponte. Quando a geração do *cluster* foi concluída, os modelos ficaram prontos para o sequenciamento. A tecnologia Illumina SBS utiliza um método patenteado “baseado em terminador reversível” (*reversible terminator-based*) que detecta bases únicas à medida que foram incorporadas às fitas do molde de DNA. Ao final do sequenciamento, o sequenciador Illumina gera imagens brutas utilizando software de controle de sequenciamento para controle do sistema e *base calling* (chamada de base), por meio de um software de análise primária integrado, chamado RTA (*Real Time Analysis*). O BCL (*base call*) binário é convertido em FASTQ utilizando o pacote Illumina bcl2fastq. Os adaptadores não são retirados das leituras. Os dados assim obtidos nos foram enviados pela MacroGen®.

#### **4.7 Plataforma Franklin**

A plataforma utilizada para a análise dos exomas foi a plataforma de software online Franklin, da Genoox (<https://franklin.genoox.com> - Franklin by Genoox); essa plataforma vem sendo utilizada em diversos estudos (BENITO *et al*, 2022; UZUNHAM; AYAZ, 2022), incluindo estudos relacionados à deficiência auditiva (ALMAGOR *et al*, 2020) Essa plataforma possui um mecanismo de priorização e interpretação de variantes, baseado em inteligência artificial (IA), que coleta evidências de uma variedade de fontes, como de bancos de dados públicos e da literatura. Após analisar fatores como classificação da variante, associação do genótipo com o histórico clínico/fenótipo, segregação familiar e modelo de herança conhecido para o gene/doença, a plataforma evidencia variantes consideradas causais.

A plataforma possui um sistema de filtragem de variantes de fácil utilização e permite o upload de painel de genes personalizado. A configuração usada para filtrar as variantes pode ser salva e utilizada em todas as amostras.

Há, para cada variante encontrada no paciente, a possibilidade de acessar artigos publicados sobre a mesma variante e/ou o mesmo gene através da própria plataforma (Figura 3). Isso se dá devido a um banco de dados de literatura avançada e atualizada.



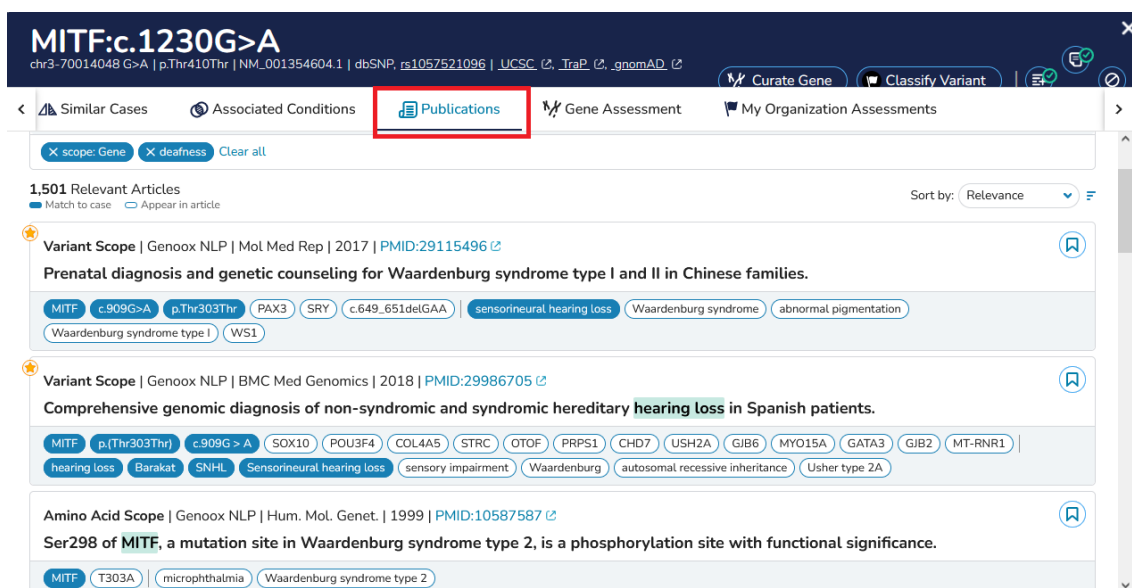


Figura 3. Banco de dados de literatura da Plataforma Franklin. Em destaque, no retângulo vermelho, é possível observar a opção “publicações”.

#### 4.8 Análise dos Exomas

Os dados de cada amostra foram inseridos na plataforma Franklin. Para uma análise mais direcionada, foram selecionados genes associados à deficiência auditiva, que eram os descritos na literatura até o momento da análise (ANEXO 7). Esse painel foi intitulado “Genes D.A.” e foi utilizado como um painel virtual.

A análise das amostras foi realizada em três passos:

- I. analisar as variantes sugeridas automaticamente pela plataforma;
- II. adicionar o painel “Genes DA” e utilizar os filtros disponíveis pela plataforma, para restringir ao máximo os parâmetros de pesquisa de variantes;
- III. usar parâmetros menos restritos, visando aumentar o número de variantes potencialmente causais (Tabela 4), mantendo o painel “Genes DA”.

Tabela 4. Filtros e parâmetros utilizados para análise de exoma.

<b>Filtros</b>	<b>2º Passo Parâmetros</b>	<b>3º Passo Parâmetros</b>
<b>Fenótipos</b>	deficiência auditiva, perda auditiva	deficiência auditiva
<b>Classificação /Predição</b>	Patogênica, Provavelmente Patogênica, Possivelmente Patogênica, VUS (variante de significado incerto	Patogênica, Provavelmente Patogênica, Possivelmente Patogênica, VUS (variante de significado incerto

<b>Painel</b>	Genes D.A.	Genes D.A.
<b>Região</b>	Exônica, doador de splicing(+2), receptor de splicing (-2), região de splicing (+-3>10))	Exônica, doador de splicing(+2), receptor de splicing (-2), região de splicing (+-3>10)
<b>Efeito</b>	De sentido contrário, <i>Stop Gain, Stop Loss, Start Loss, Start Gain</i> , mudança de quadro de leitura, sem mudança de quadro de leitura, Outro	De sentido contrário, <i>Stop Gain, Stop Loss, Start Loss, Start Gain</i> , mudança de quadro de leitura, sem mudança de quadro de leitura, Outro
<b>Frequência</b>	Frequência agregada: N / A, Muito Raro, ExAC (Todos): N / A, Muito Raro Frequência Interna: N / A, Muito Raro, Raro	Frequência agregada: N / A, Muito Raro, ExAC (Todos): N / A, Muito Raro
<b>Confiança</b>	Baixa, média, alta	Baixa, média, alta
<b>Zigose</b>	-	Homozigoto, heterozigoto

---

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 Triagem 35delG

A triagem por sequenciamento da deleção c.35delG (rs80338939) foi realizada para 26/27 pacientes, onde a variante c.35delG foi detectada em homozigose em um paciente (DA\_06) e em heterozigose em dois pacientes (DA\_15 e 11284) (Tabela 5).

A variante c.35delG ocasiona deficiência auditiva não síndrômica autossômica recessiva. Para que ela seja causal para a deficiência auditiva, precisa estar em homozigose ou heterozigose composta no paciente. Dessa maneira, a homozigose da variante c.35delG explica molecularmente o fenótipo do paciente DA\_06 (Figura 4). Por outro lado, a observação da heterozigose no paciente DA\_15 (Figura 5) não explica, molecularmente, o seu fenótipo. Para que a variante c.35delG seja causal, ela deve estar associada a outra variante relacionada a deficiência auditiva. Tendo uma análise molecular inconclusiva, devido ao fato desse paciente ter somente a triagem para a variante c.35delG, se faz necessário salientar que novas análises moleculares devem ser realizadas.

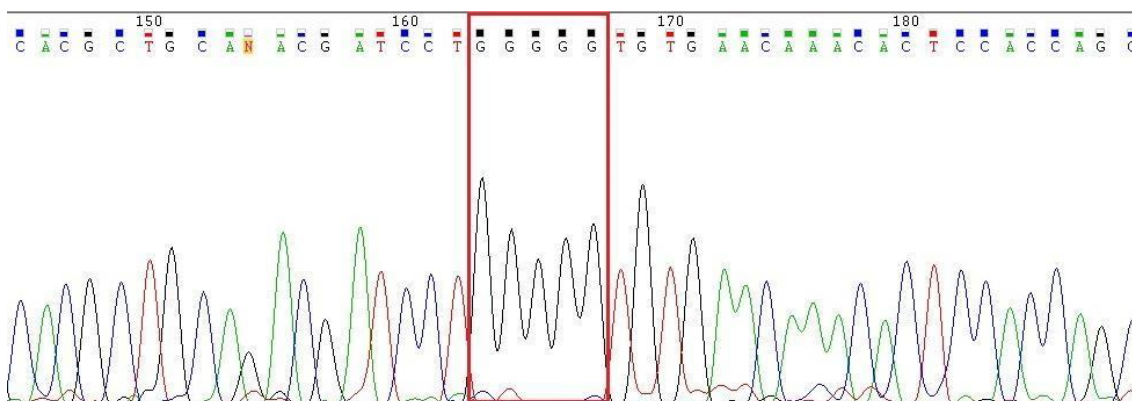


Figura 4. Eletroferograma do paciente DA\_06. Em destaque, no retângulo vermelho, é possível observar a presença de cinco guaninas ao invés de seis, evidenciando a variante 35delG em homozigose.

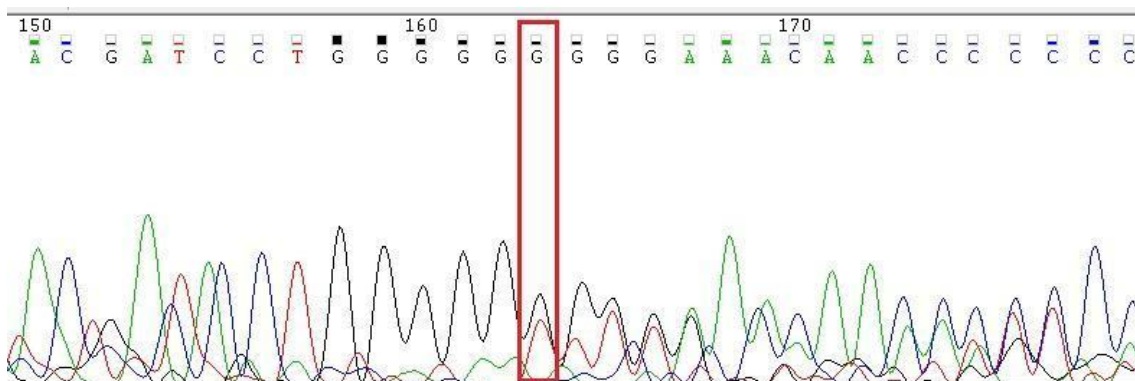


Figura 5. Eletroferograma do paciente DA\_15. Em destaque, no retângulo vermelho, é possível identificar a variante 35delG em heterozigose. Variante de mudança de quadro de leitura.

Caso similar se aplica ao paciente 11284 (Figura 6), que é heterozigoto para a variante c.35delG, ou seja, essa variante sozinha não explica, molecularmente, o seu fenótipo. Porém, foi possível a realização da técnica de exoma como análise posterior e, com isso, observar a presença da variante c.550C>T em heterozigose no gene *GJB2*. Para que essas duas variantes expliquem molecularmente o quadro de deficiência auditiva do paciente, elas precisam estar em alelos diferentes, ou seja, o paciente precisa ter heterozigose composta. Uma forma de verificar se o paciente tem heterozigose composta é verificando se há a presença das variantes c.550C>T e 35delG nos pais. Caso as duas variantes sejam verificadas só no pai ou só na mãe, não há heterozigose composta, pois se encontram no mesmo alelo; caso um dos pais tenha a variante c.550C>T e o outro a variante 35delG, então se confirma a heterozigose composta.

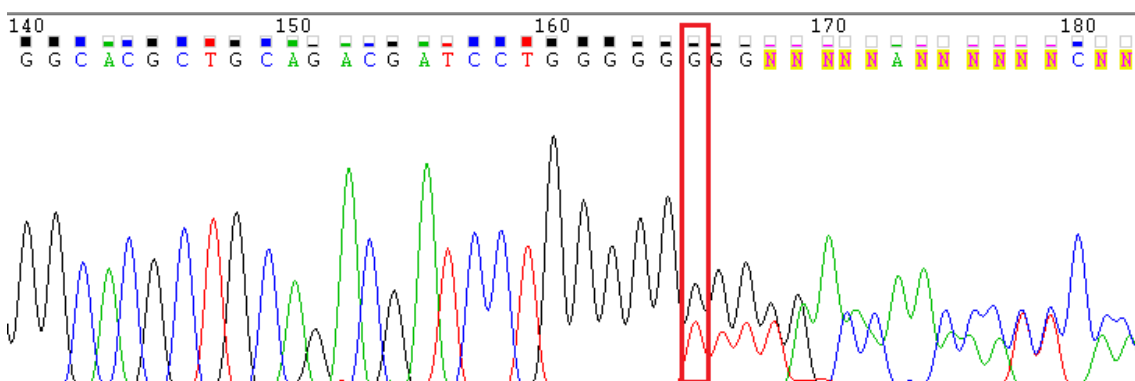


Figura 6. Eletroferograma do paciente 11284. Em destaque, no retângulo vermelho, é possível identificar a variante 35delG em heterozigose. Variante de mudança de quadro de leitura.

Sobre os 2/27 pacientes sem resultado da triagem: o paciente DA\_16 teve um resultado inconclusivo na triagem da variante c.35delG e outro sequenciamento será realizado. O paciente 10765 teve seu DNA enviado para a realização do exoma

juntamente com o DNA dos outros pacientes oriundos do Ambulatório de Genética; tendo isso em vista, optou-se por não realizar a triagem da variante c.35delG.

## 5.2 Exomas

O exoma foi utilizado somente para os pacientes oriundos do Ambulatório de Genética. Destes pacientes, a amostra do 10598 não passou no controle de qualidade interno do protocolo do exoma utilizado pela MacroGen. Portanto, o exoma foi realizado em 12 pacientes.

Dos 12 pacientes, o exoma auxiliou no diagnóstico molecular da deficiência auditiva em sete pacientes síndrômicos (10727, 10765, 10970, 11089, 11178, 11284 e 11294) e em dois pacientes não síndrômicos (10941 e 11289); três pacientes síndrômicos (10581, 10921 e 11024) não tiveram diagnóstico molecular da deficiência auditiva (Tabela 5). Abaixo estão apresentados os quadros clínicos dos pacientes para os quais realizou-se a análise de exoma.

Tabela 5. Diagnóstico genético molecular obtido para os pacientes com deficiência auditiva incluídos na pesquisa.

Amostra	Fenótipo	Análise da deleção 35delG no gene <i>GJB2</i>	Análise do exoma
DA_01	NS	ausente	-
DA_03	NS	ausente	-
DA_04	NS	ausente	-
DA_05	NS	ausente	-
DA_06	NS	Homozigose	-
DA_07	NS	ausente	-
DA_08	NS	ausente	-
DA_09	NS	ausente	-
DA_10	NS	ausente	-
DA_11	NS	ausente	-
DA_12	NS	ausente	-
DA_13	NS	ausente	-
DA_15	NS	Heterozigose com alelo normal	-
DA_16	NS	-	-

10581	S	ausente	<u>CPT2 (c.338C&gt;T) em heterozigose; SERPINA1 (c.863A&gt;T) em homozigose</u>
10598	S	ausente	Não passou no controle de qualidade
10727	S	ausente	ACTB (c.127G>T) em heterozigose
10765	S	-	GSDME (c.145C>T) em heterozigose; GSDME (c.146C>T) em heterozigose
10921	S	ausente	Nenhuma variante associada
10941	NS	ausente	MCM2 ( n.523-1G>A) em heterozigose CDH23 (c.3579+2T>C) em heterozigose; CDH23 (c.1143_1176delCCTGAACAGCATGTTTGAGGTGT ACTTGGTGGGG) em heterozigose;
10970	S	ausente	Del: STRC, STRC, CKMT1B, SNOU13, RNU6-554P em heterozigose de 4.7kb; Del: STRC, CKMT1B, RNU6-554P em heterozigose de 1.1kb; <b><u>TNNT2 (c.692T&gt;C) em heterozigose</u></b>
11024	S	ausente	Nenhuma variante associada
11089	S	ausente	EYAI (c.1523C>T) em heterozigose; <u>PTEN (c.737C&gt;T) em heterozigose</u>
11178	S	ausente	MITF (c.1230G>A) em heterozigose
11284	S	Heterozigose com alelo normal	GJB2 (c.550C>T) em heterozigose; GJB2 (c.35delG) em heterozigose; <u>KMT2D (c.15142C&gt;T) em heterozigose; F8 (c.396A&gt;C) em hemizigose</u>
11289	NS	ausente	Del: STRC, CKMT1B, SNOU13, RNU6-554P em homozigose de 9.4kb
11294	S	ausente	EYAI (1081C>T) em heterozigose; <b><u>KCNQ1 (c.1040T&gt;C) em heterozigose</u></b>

S: síndromico; NS: não síndromico; **em negrito**: achado incidental; sublinhadas: variantes não associadas a deficiência auditiva

### Paciente 10581

Refere-se a paciente do sexo masculino, nascido em 23 de setembro de 1999, filho de pais não consanguíneos e sem relatos de perda auditiva na família. Histórico familiar relata parentes do lado materno com síncope vaso-vagal e glaucoma congênito (Figura 7).

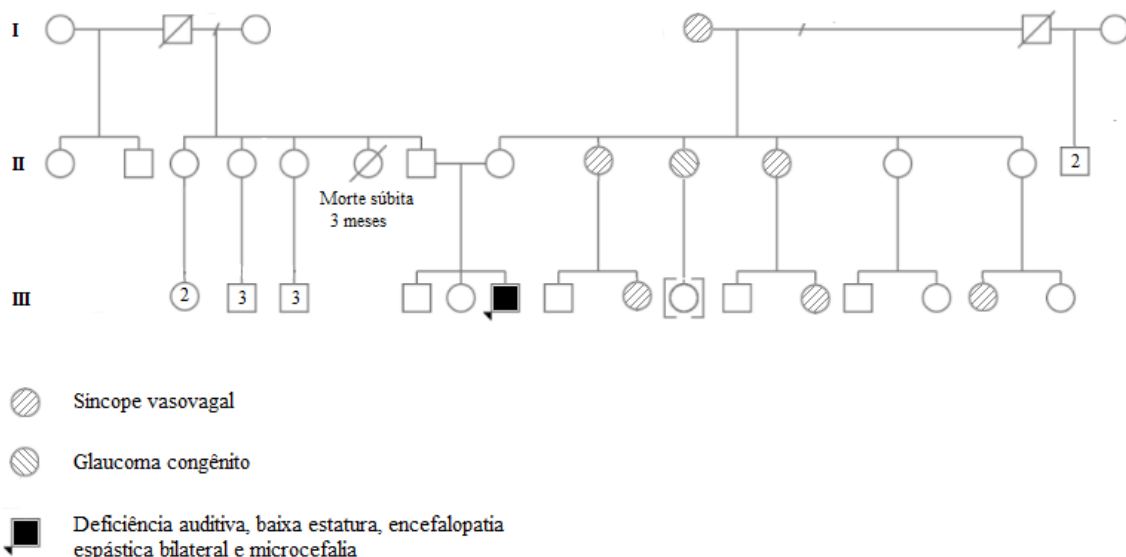


Figura 7. Heredograma da família do paciente 10581.

O paciente foi encaminhado pelo endocrinologista (também é acompanhado por neurologista) para o ambulatório de genética médica do HUB. Avaliação clínica revelou que é um paciente sindrômico, que apresenta fenótipo de deficiência auditiva associado a encefalopatia espástica bilateral, microcefalia, baixa estatura. Ainda, apresenta atraso no desenvolvimento neuropsicomotor, mostrando dificuldade de aprendizado, e com diagnóstico de transtorno de déficit de atenção (TDAH). Já teve varicela, tem asma e fez cirurgia de alongamento de tendões aos 7 anos de idade.

De acordo com o histórico do paciente, na 33ª semana de gestação foi realizada uma ecografia que detectou oligodrâmnio e após 2 dias a mãe sentiu que o feto parou de mexer; após 4 dias, foi realizado o parto por cesariana. Paciente nasceu com 33 semanas de gestação, com 1785g e Apgar 8-9 (líquido amniótico escasso). O paciente passou um mês internado devido a pneumonia intra-uterina, pneumotórax, meningite neonatal, hemorragia intracraniana e crise convulsiva.

O exame de potencial evocado auditivo realizado no ano de 2000 indicou sinais de comprometimento bilateral das vias auditivas, na porção intracraniana do nervo auditivo. As primeiras palavras foram aos 2 anos de idade e a deficiência auditiva bilateral foi descoberta aos 6 anos de idade quando o exame de audiometria (realizado em 2006) indicou deficiência auditiva neurossensorial severa bilateral. Faz uso de aparelho auditivo.

Análise genética:

A análise do exoma revelou a presença de duas variantes, não relacionadas ao fenótipo de deficiência auditiva do paciente. A primeira foi uma variante deletéria localizada no gene *CPT2*, a c.338C>T (rs74315294), já descrita em indivíduos com Deficiência de carnitina palmitoil transferase II, forma miopática (CPT II) (OMIM 255110). Essa variante foi observada em heterozigose com o alelo referência e leva a mudança de uma serina para uma leucina na posição 113 da proteína (Figura 8). A deficiência de CPT II já foi descrita como tendo padrão de herança tanto autossômico recessivo como dominante (ANICHINI *et al.*, 2011). É um distúrbio metabólico hereditário que afeta a oxidação de ácidos graxos de cadeia longa mitocondrial (BONNEFONT *et al.*, 1999). A forma miopática se apresenta mais frequentemente em crianças ou adultos jovens (BONNEFONT *et al.*, 1999; MARTÍN *et al.*, 1999). As manifestações clínicas são caracterizadas por: ataques de rabdomiólise, mialgia, concentração elevada de ácido graxo de cadeia longa em circulação, aumento da concentração de creatina quinase sérica, entre outros. Os sintomas podem ser desencadeados ou exacerbados devido a exercícios físicos prolongados, jejum prolongado e extremos de temperatura (BONNEFONT *et al.*, 1999; MARTÍN *et al.*, 1999). Até o presente momento, o único gene associado a Deficiência de CPT II é o *CPT2* e a variante mais comum é a p.Ser113Leu c.338C>T (BONNEFONT *et al.*, 1999; JOSHI *et al.*, 2012; MARTÍN *et al.*, 1999).

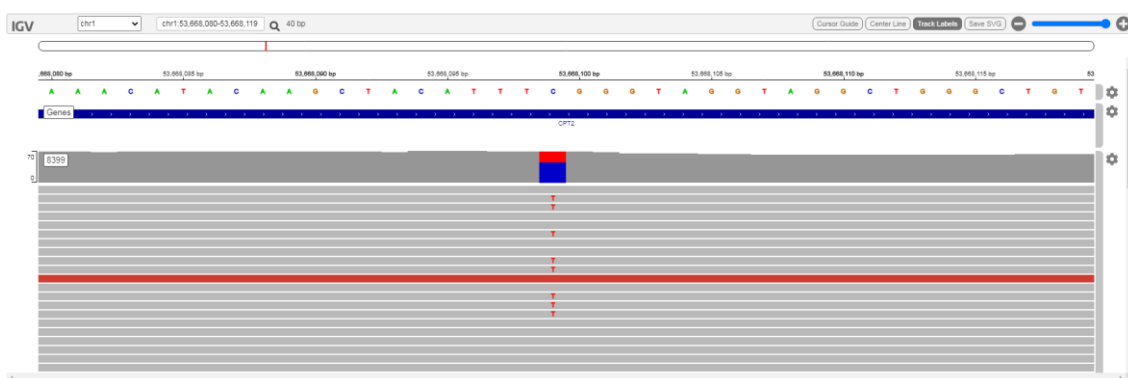


Figura 8. Variante c.338C>T identificada em heterozigose com alelo de referência no gene *CPT2* do paciente 10581. Imagem gerada pelo programa IGV - Integrative Genomes Viewers.

A outra variante encontrada foi a c.863A>T (rs17580) em homozigose no gene *SERPINA1*, que leva a mudança de um ácido glutâmico para uma valina na posição 288 da proteína (Figura 9). Essa variante tem padrão de herança autossômico recessivo, é classificada como VUS e já foi descrita em indivíduos com deficiência de alfa-1



antitripsina (AATD) (OMIM 613490). A AATD é um distúrbio autossômico recessivo, cujas manifestações clínicas são caracterizadas por: enfisema pulmonar, doença hepática e baixos níveis séricos de alfa-1 antitripsina. Até o presente momento, o único gene associado a AATD é o *SERPINA1* (BRANTLY, 2020).

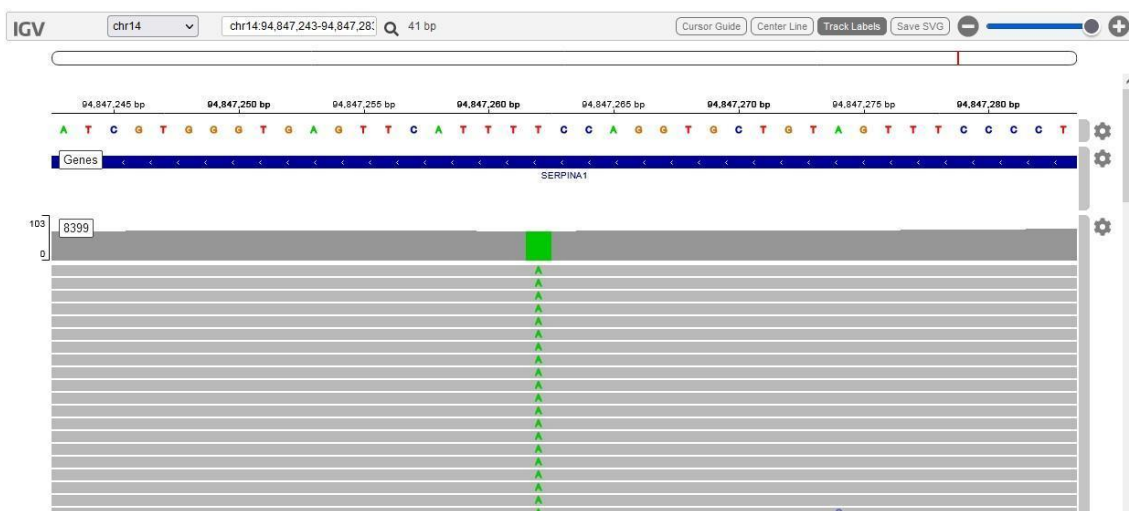


Figura 9. Variante c.863 A>T identificada em homozigose com alelo de referência no gene *SERPINA1* do paciente 10581. Imagem gerada pelo programa IGV - Integrative Genomes Viewers.

Sabendo-se que a deficiência de CPT II de forma miopática pode ser classificada como uma doença autossômica dominante, a variante c.338C>T em heterozigose pode ser causal para a doença. Para a confirmação ou exclusão do diagnóstico molecular de Deficiência de CPT II, é necessário que haja o diagnóstico clínico e laboratorial. Esse diagnóstico é feito com a detecção da redução da atividade enzimática da carnitina-palmitoil transferase 2. Caso o diagnóstico molecular seja confirmado, o paciente deverá ser encaminhado a nutricionista; o tratamento se dá através de uma dieta rica em carboidrato e pobre em gordura. O paciente também deverá evitar jejum prolongado e exercícios físicos intensos.

A variante c.863A>T em homozigose leva ao diagnóstico molecular de deficiência de alfa-1 antitripsina, mesmo o paciente não apresentando um quadro clínico correspondente a AATD. É importante que este paciente faça o exame que detecte o nível sérico de alfa-1 antitripsina e que, caso este esteja baixo, que faça reposição de alfa-1 antitripsina. É importante que o paciente seja acompanhado por uma equipe multidisciplinar, composta por geneticista, pneumologista, hepatologista e nutricionista.

As variantes causais identificadas no paciente estão associadas a duas doenças genéticas classificadas como Erros Inatos do Metabolismo (EIM). Nenhuma variante que explicasse o quadro de deficiência auditiva, encefalopatia espástica bilateral, microcefalia e baixa estatura. A não identificação de variantes causais não exclui a existência delas. Em casos como esse, é imprescindível que o exoma seja reanalisado no futuro, à medida que ocorra avanço no conhecimento.

### Paciente 10727

Refere-se ao paciente do sexo masculino, nascido em 26 de fevereiro de 2006. Paciente síndrômico, cujo fenótipo de deficiência auditiva está associado a deficiência intelectual, dismorfias faciais e polidactilia pós-axial nos pés (removidos cirurgicamente). Filho de pais não consanguíneos, sendo que mãe apresenta alcoolismo. Não há relato de familiares com deficiência auditiva, mas a mãe tem deficiência intelectual e dismorfias faciais, sendo que o paciente apresenta fenótipo similar a mãe (Figura 10). O paciente teve atraso motor importante, sendo que sentou aos 10 meses e andou aos 3 anos. A deficiência auditiva foi diagnosticada aos 10 meses. Além disso, o paciente tem transtorno comportamental.

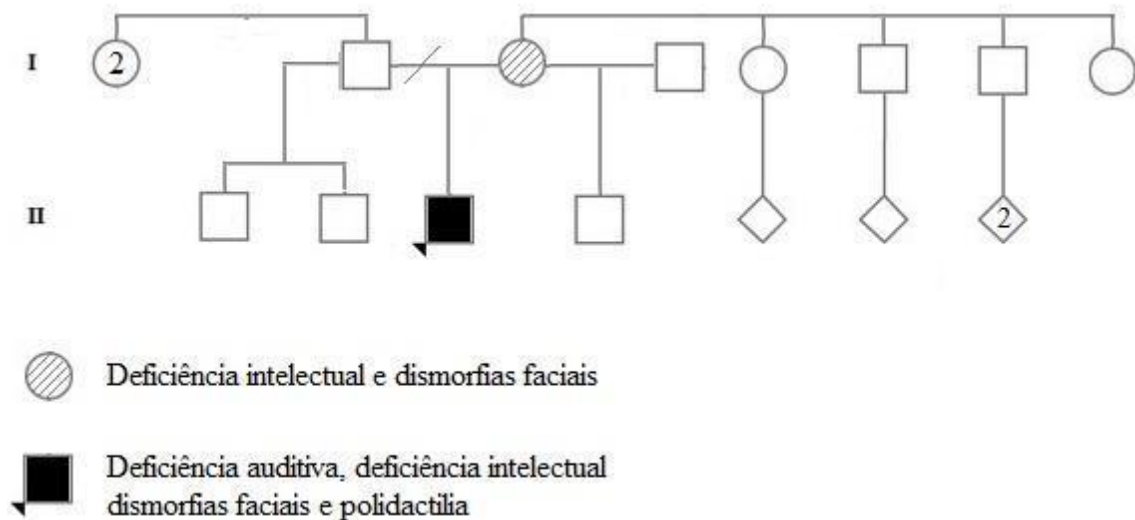


Figura 10. Heredograma da família do paciente 10727.

Ao exame físico apresenta braquicefalia, sobrancelhas grossas levemente arqueadas, fenda palpebral oblíqua para baixo, leve ptose palpebral bilateral, raiz nasal baixa, epicanto bilateral, filtro naso-labial longo, comissuras orais desviadas para baixo, lábio inferior grosso e vertido, dentição anômala. As mãos e pés do paciente

apresentam dedos alongados. Nas mãos observou-se também coxins fetais e aproximação das pregas palmares transversais à direita. Nos pés foi observado que 5º dedo apresenta implantação proximal e que há cicatrizes de excisão de dedos supranumerários. Apresenta abdome plano, depressível, sem visceromegalias. O palato do paciente é ogival e a úvula mostrou-se íntegra. Após a identificação de variante c.127G>T no gene *ACTB*, relatada abaixo, o paciente fez uma ressonância magnética de crânio, que não apresentou anomalias.

Em 2016 foi realizado exame de cariótipo onde foram analisadas 25 metáfases (coradas para bandamento G), obtidas da cultura temporária de linfócitos do sangue periférico. Todas apresentaram cromossomos normais, em número e em estrutura. O cariótipo determinado foi 46,XY, característico de pessoa do sexo masculino. Em 2017 foi realizada investigação de perdas e ganhos cromossômicos submicroscópicos pela análise cromossômica por microarray e não foram detectadas alterações cromossômicas.

#### Análise genética:

Na análise do exoma observou-se a presença da variante c.127G>T em heterozigose com o alelo referência no gene *ACTB*, que leva a mudança de uma valina para uma leucina na posição 43 da proteína (Figura 11). Essa variante é classificada como possivelmente patogênica e variantes nesse gene já foram descritas em pacientes com Síndrome de Baraitser-Winter 1 (OMIM 243310). A Síndrome de Baraitser-Winter 1 é um distúrbio de desenvolvimento raro de herança autossômica dominante. É caracterizada por: deficiência auditiva neurosensorial, deficiência intelectual (leve a grave), dismorfias faciais (trigonocefalia, fissuras palpebrais longas e largas inclinadas para baixo, ptose bilateral, sobrelhas arqueadas, nariz largo com uma ponta grande bulbosa ou plana, raiz do nariz proeminente, filtro longo e leve micrognatia), coloboma ocular (íris ou retina); também podem apresentar lábio leporino e palato ogival, lisencefalia, baixa estatura, doença cardíaca congênita, malformações geniturinárias e microcefalia (pode se desenvolver com o tempo) (YATES, 2017).

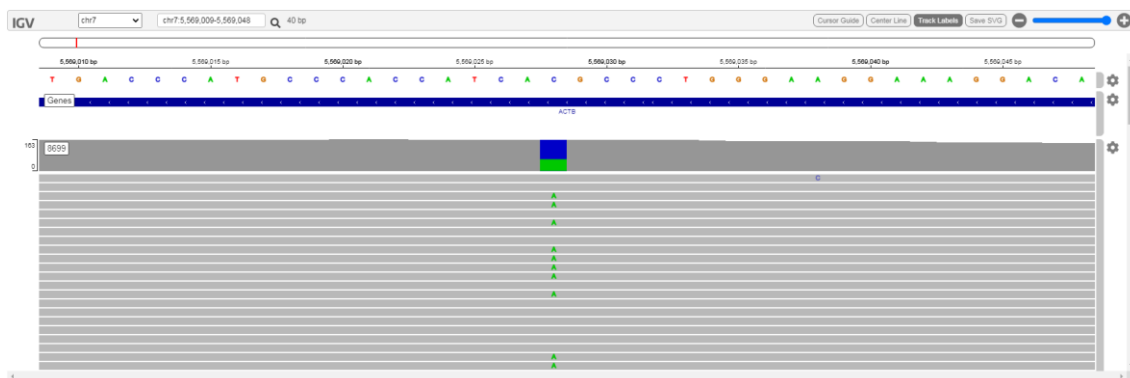


Figura 11. Variante c.127G>T em heterozigose com o alelo referência identificada no gene *ACTB* do paciente 10727. Imagem gerada pelo programa IGV - Integrative Genomes Viewers.

Visto que alguns pacientes podem apresentar uma ressonância magnética normal, considerou-se quadro clínico compatível com o diagnóstico molecular de Síndrome de Baraitser-Winter 1.

Devido a um quadro clínico semelhante entre mãe e filho, e sabendo que a Síndrome de Baraitser-Winter 1 tem padrão de herança autossômico dominante, sugere-se que o paciente tenha herdado a variante c.127G>T da mãe. Não foi possível a confirmação da presença da mutação na mãe do paciente, porque não foi possível contactá-la.

### **Paciente 10765**

Refere-se a paciente do sexo feminino, nascida em 17 de julho de 2015, com 1545g e prematura de 33 semanas, tendo passado 32 dias internada. A paciente apresenta deficiência auditiva sindrômica é filha de pais não consanguíneos e tem um sobrinho com deficiência auditiva (Figura 12).

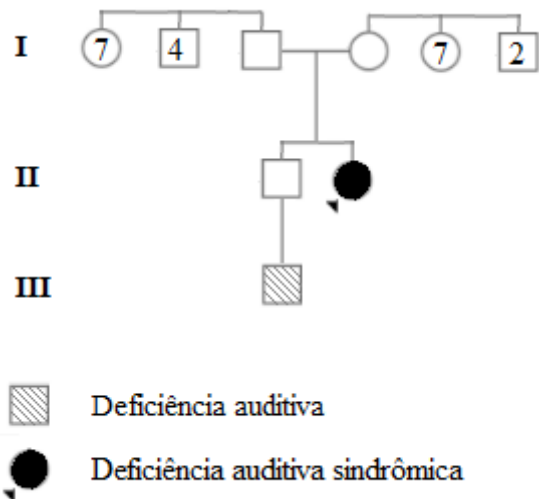


Figura 12. Heredograma da família do paciente 10765.

Ao exame físico apresentou: aparente microcefalia com microbraquicefalia, sinofre, aparente telecanto, epicanto inverso bilateral, raiz nasal baixa, ponta globosa, narinas antevertidas, filtro médio, lábios finos, mordida cruzada, tórax em barril, presença de fosseta sacral, mãos e pés pequenos, pregas palmares normais, clinodactilia do 5º dedo bilateralmente, sindactilia parcial entre o 2º e 3º dedos bilateralmente e cabelos secos.

A paciente falhou três vezes no teste da orelhinha. O exame BERA (potencial evocado auditivo do tronco encefálico) mostrou perda de 70% da audição na orelha esquerda e 50% na orelha direita. Na análise cromossômica por microarray foi identificado um segmento de perda de heterozigose no cromossomo 22: arr[hg19] 22q11.22q13.32 (22,579,821-49,380,710) hmz.

Análise genética:

Na análise do exoma observou-se a presença de duas variantes no mesmo gene que podem estar associadas ao quadro de deficiência auditiva da paciente. A primeira variante é a c.145C>T, observada em heterozigose com o alelo referência no gene *GSDME*, onde ocorre a mudança de uma prolina para uma serina na posição 49. A segunda variante observada foi a c.146C>T em heterozigose com o alelo referência no gene *GSDME*, onde ocorre a mudança de uma prolina para uma leucina na posição 49 (Figura 13).

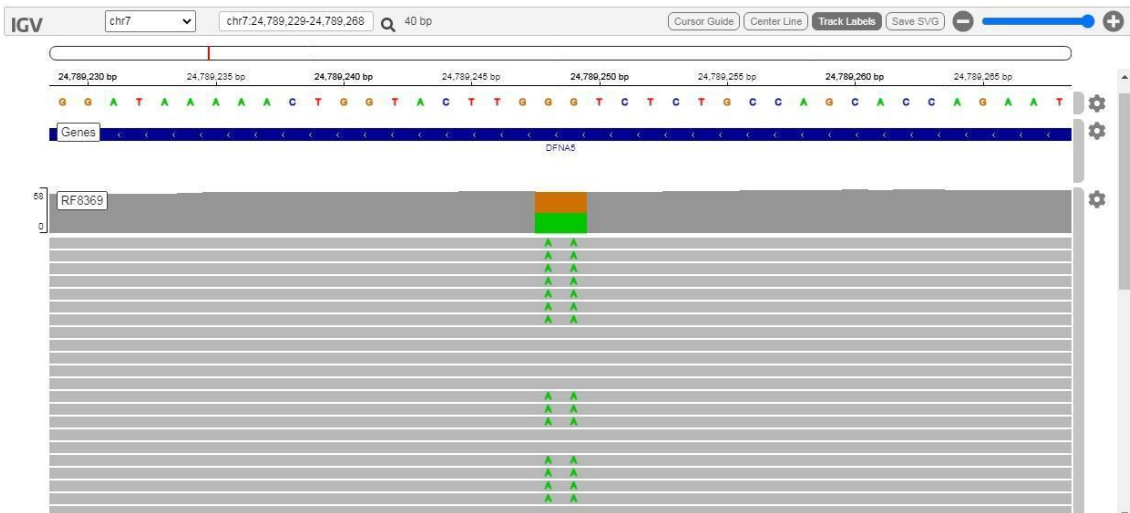


Figura 13. Variantes c.145C>T e c.146C>T identificadas no gene *GSDME* do paciente 10765. Imagem gerada pelo programa IGV - Integrative Genomes Viewers.

A paciente já possuía análise de exame molecular prévio (microarray) onde foi identificada alteração no cromossomo 22. Essa alteração sugere a presença de mutação patogênica nesse segmento cromossômico, no entanto, não foi possível estabelecer uma relação direta entre o quadro clínico e essa alteração.

Na análise do exoma, foram identificadas duas variantes autossômicas dominantes no gene *GSDME*; variantes nesse gene estão associadas a deficiência auditiva neurossensorial progressiva. Essas variantes, portanto, podem explicar o quadro de deficiência auditiva da paciente. Por se tratar de uma doença progressiva, a paciente pode vir a perder completamente a audição em ambas as orelhas.

### Paciente 10941

Refere-se a paciente do sexo feminino, nascida em 17 de outubro de 2015 com deficiência auditiva não síndrômica e filha de pais não consanguíneos. Em relação ao histórico familiar, é relatado que irmão e tio paterno têm deficiência auditiva (Figura 14).

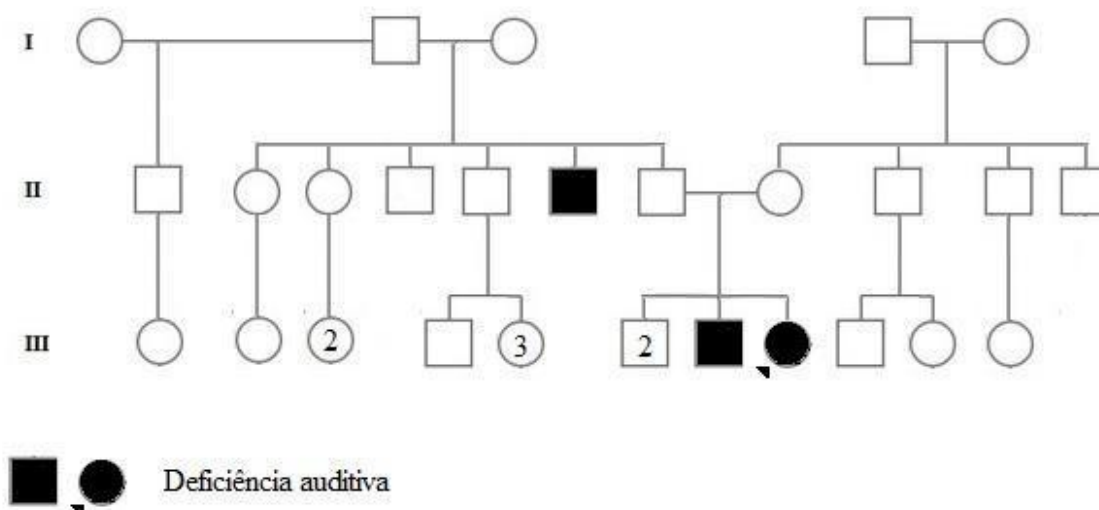


Figura 14. Heredograma da família da paciente 10941.

Análise genética:

Na análise do exoma observou-se a presença da variante n.523-1G>A (rs114616241), em heterozigose com o alelo referência, no gene *MCM2* (Figura 15). É uma variante em uma região de receptor de splicing. Essa variante é classificada como variante de significado incerto e já foi descrita em outros indivíduos com deficiência auditiva não sindrômica autossômica dominante 70 (OMIM 616968).

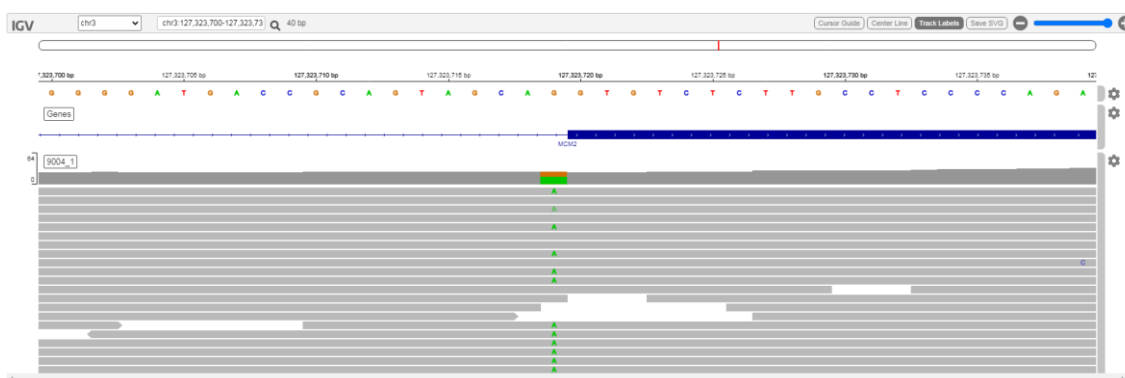


Figura 15. Variante n.523-1G>A identificada em heterozigose com alelo de referência no gene *MCM2* do paciente 10941. Imagem gerada pelo programa IGV - Integrative Genomes Viewers.

Essa variante explicaria, molecularmente, o fenótipo não sindrômico da paciente. No entanto, a análise do exoma também mostrou a presença de outras duas variantes: a c.1143\_1176delCCTGAACAGCATGTTTGAGGTGTACTTGGTGGGG (rs764949139) em heterozigose (Figura 16) e a c.3579+2T>C (rs1385831846) em heterozigose (Figura 17), ambas no gene *CDH23*. Variantes nesse gene estão associadas

à Síndrome de Usher tipo I (vide 1.2.1.4). Como as variantes no gene *CDH23* estão associadas a um quadro de deficiência auditiva síndrômica, as variantes observadas nesse gene são consideradas achados secundários, visto que não estão contribuindo para o fenótipo da paciente (que tem deficiência auditiva não síndrômica).

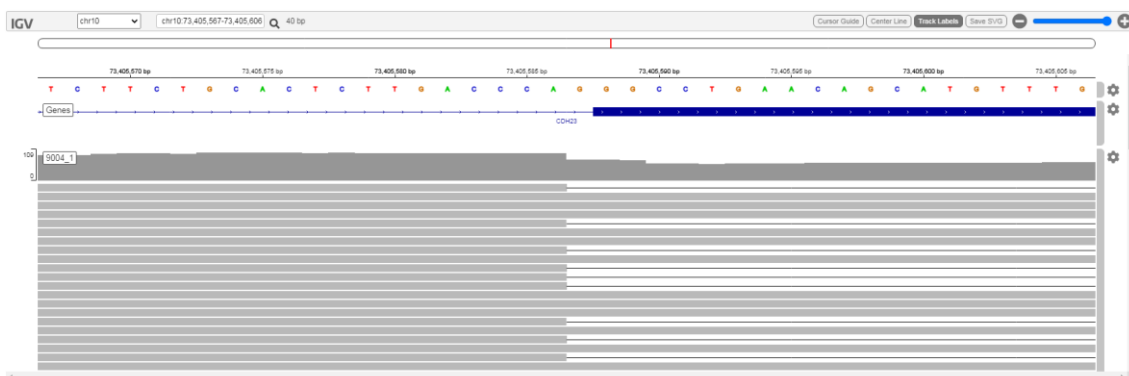


Figura 16. Variante c.1143\_1176delCCTGAACAGCATGTTTGAGGTGTACTTGGTGGGG identificada em heterozigose com alelo de referência no gene *CDH23* do paciente 10941. Imagem gerada pelo programa IGV - Integrative Genomes Viewers.

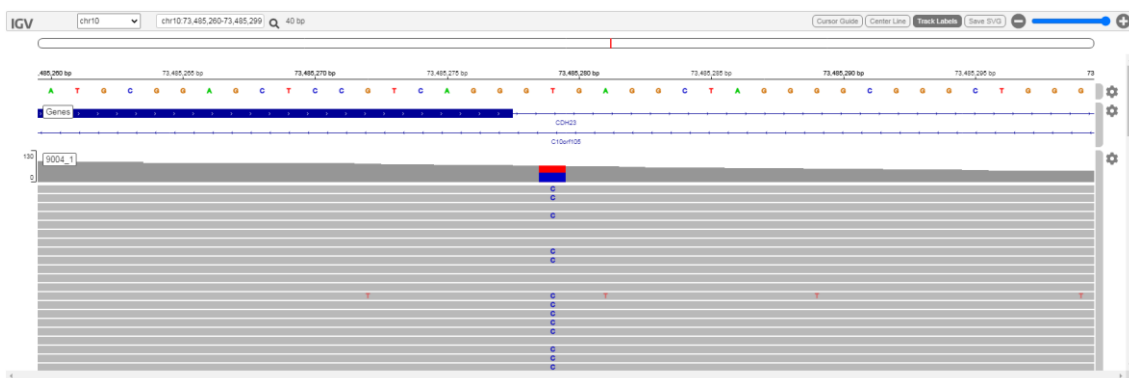


Figura 17. Variante c.3579+2T>C identificada em heterozigose com alelo de referência no gene *CDH23* do paciente 10941. Imagem gerada pelo programa IGV - Integrative Genomes Viewers.

### Paciente 10970

Refere-se a paciente do sexo feminino, nascida em 30 de dezembro de 2003. Filha de pais consanguíneos, primos de primeiro grau, a paciente é síndrômica, cujo fenótipo de deficiência auditiva está associado a microcefalia, dismorfias, malformações no olho e deficiência intelectual. Em relação ao histórico familiar, é relatado que a irmã tem um quadro similar e que o pai e quatro tios paternos têm deficiência auditiva (Figura 18).



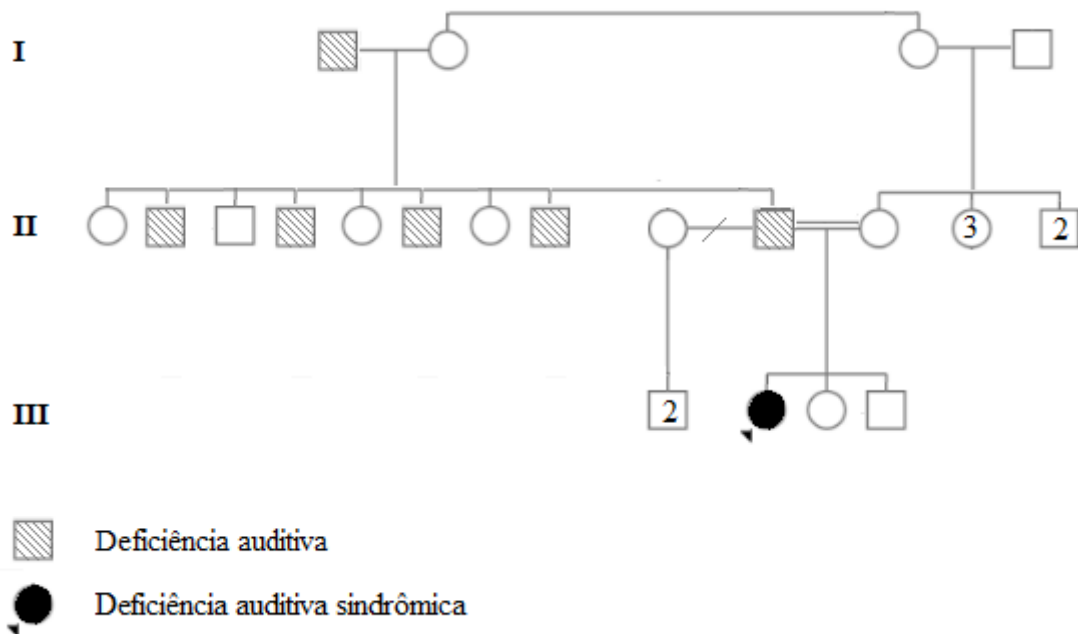


Figura 18. Heredograma da família da paciente 10970.

Em 2017 foi realizado exame de cariótipo onde foram analisadas 25 metáfases (coradas para bandamento G), obtidas da cultura temporária de linfócitos do sangue periférico. Todas as metáfases apresentaram cromossomos normais, em número e em estrutura. O cariótipo determinado foi 46,XX, característico de pessoa do sexo feminino.

Análise genética:

Na análise do exoma observou-se a presença de duas deleções associadas a deficiência auditiva: uma deleção de 4.7kb em heterozigose (Figura 19) e uma deleção de 1.1k em heterozigose (Figura 20).

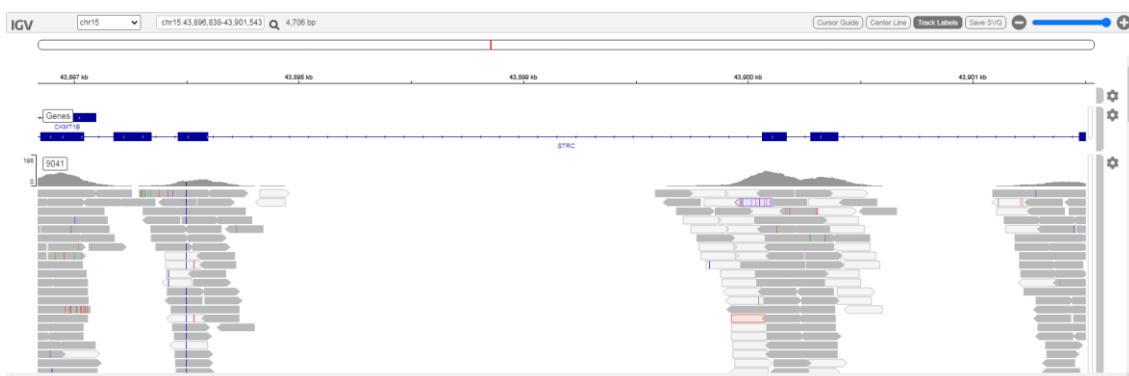


Figura 19. Deleção de 4.7kb dos genes *STRC*, *CKMT1B*, *SNOU13*, *RNU6-554P* do paciente 10970. Imagem gerada pelo programa IGV - Integrative Genomes Viewers.

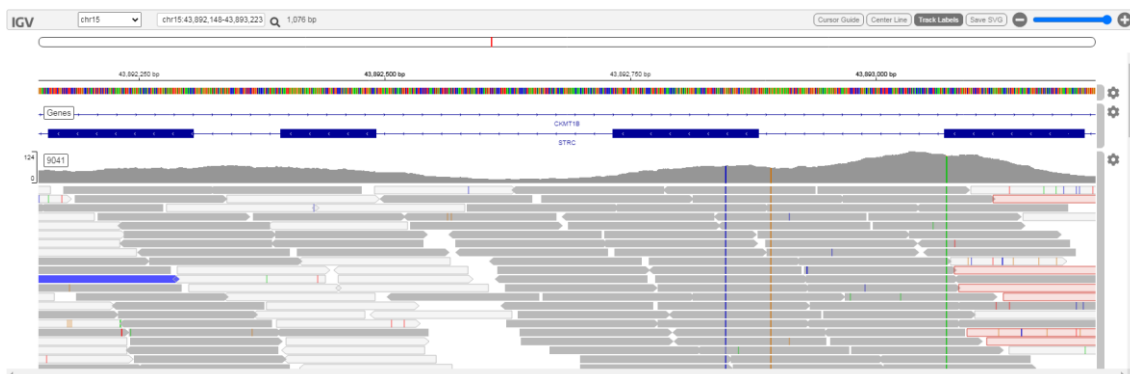


Figura 20. Deleção de 1.1kb dos genes *STRC*, *CKMT1B* e *RNU6-554P* do paciente 10970. Imagem gerada pelo programa IGV - Integrative Genomes Viewers.

Também se observou a presença de um achado incidental, a variante c.692T>C, em heterozigose com o alelo referência no gene *TNNT2*, responsável pela mudança de uma isoleucina para uma treonina na posição 231 da proteína (Figura 21).

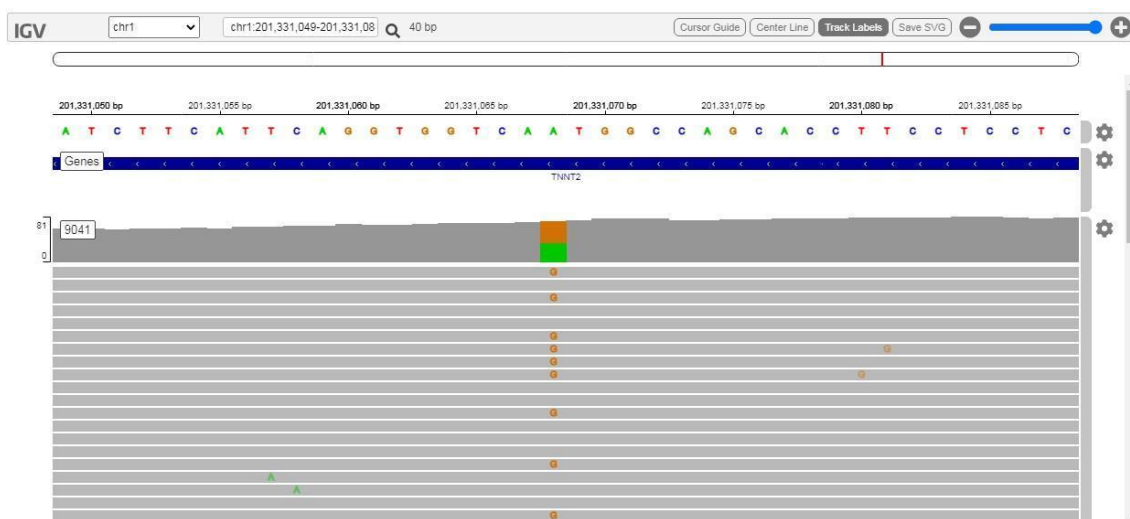


Figura 21. Variante c.692T>C identificada em heterozigose com alelo de referência no gene *TNNT2* do paciente 10970. Imagem gerada pelo programa IGV - Integrative Genomes Viewers.

Foi encontrada uma deleção de 4.7kb que foi descrita na literatura como causal para deficiência auditiva autossômica recessiva não síndrômica 16 (OMIM 603720). No entanto, a deleção foi encontrada em heterozigose e, por se tratar de uma doença descrita como autossômica recessiva, essa deleção sozinha não explica o quadro de deficiência auditiva do paciente. Como há uma segunda deleção em heterozigose, que também abrange uma região do gene *STRC*, há a possibilidade de se tratar de

heterozigose composta, o que explicaria o quadro de deficiência auditiva da paciente. Para as demais características fenotípicas (microcefalia, dismorfias, malformações no olho e deficiência intelectual), não foi proposto um diagnóstico molecular.

A variante c.692T>C no gene *TNNT2* está descrita como associada à Não-compactação ventricular esquerda. Apesar dessa variante não estar relacionada com o fenótipo do paciente e ser um achado incidental, ela tem implicações médicas importantes. A doença com a qual essa mutação está associada é caracterizada por trabéculas ventriculares esquerdas proeminentes e recessos intratrabeculares profundos, conseqüentemente, há disfunção sistólica e diastólica progressiva, anormalidades de condução e, ocasionalmente, eventos tromboembólicos (FILHO *et. al.*, 2021; RIPOLL-VERA *et. al.*, 2016).

### **Paciente 11089**

Refere-se a paciente do sexo feminino, nascida em 28 de novembro de 2013, com 2700g, gêmea univitelina, filha de pais não consanguíneos. Gemelar falecida aos três meses apresentava quadro clínico semelhante ao da paciente (Figura 22); mãe relata que o falecimento foi por engasgo, devido a fenda palatina. A mãe relatou perceber atraso no desenvolvimento neuropsicomotor e deficiência intelectual na paciente.

A paciente é sindrômica, sendo que o fenótipo de deficiência auditiva está associado a deficiência intelectual, fenda palatina (corrigida cirurgicamente), macrocefalia e dismorfias faciais discretas (fronte ampla, sobrancelhas arqueadas no terço distal, sinófise leve, fenda palpebral esquerda reta e direita oblíqua para cima, epicanto bilateral invertido, raiz nasal média, dorso nasal alto e médio largo, base nasal larga, columela grossa, filtro bem marcado e curto).

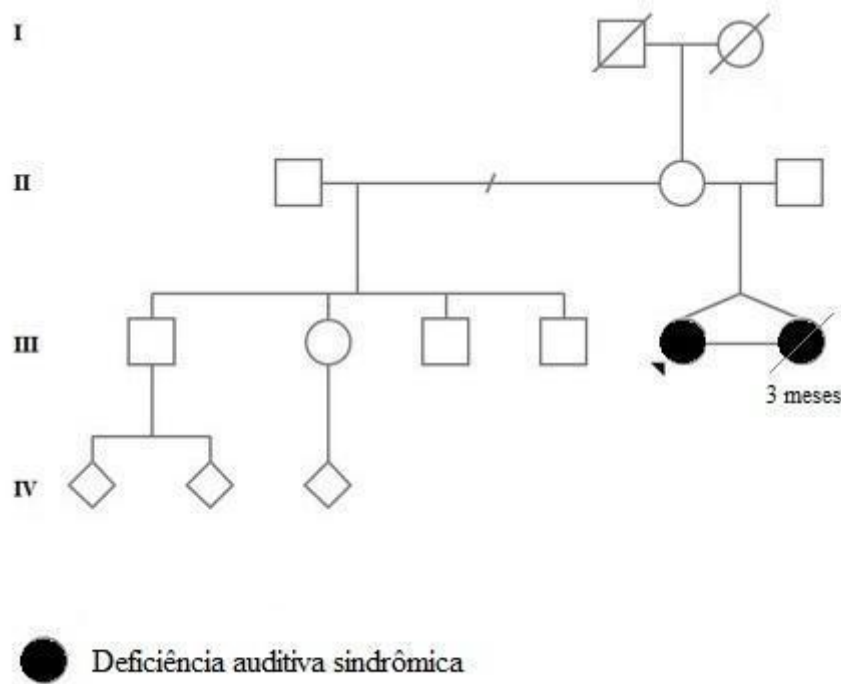


Figura 22. Heredograma da família do paciente 11089.

Análise genética:

Na análise do exoma observou-se a presença de duas variantes patogênicas que potencialmente explicam o quadro fenotípico do paciente:

i. Variante c.1523C>T (rs754901033) em heterozigose no gene *EYAI*, onde ocorre a mudança de uma alanina para uma valina na posição 508 (Figura 23). Variantes nesse gene foram descritos como associados a Síndrome branquio-oto-renal (vide 1.2.1.1).

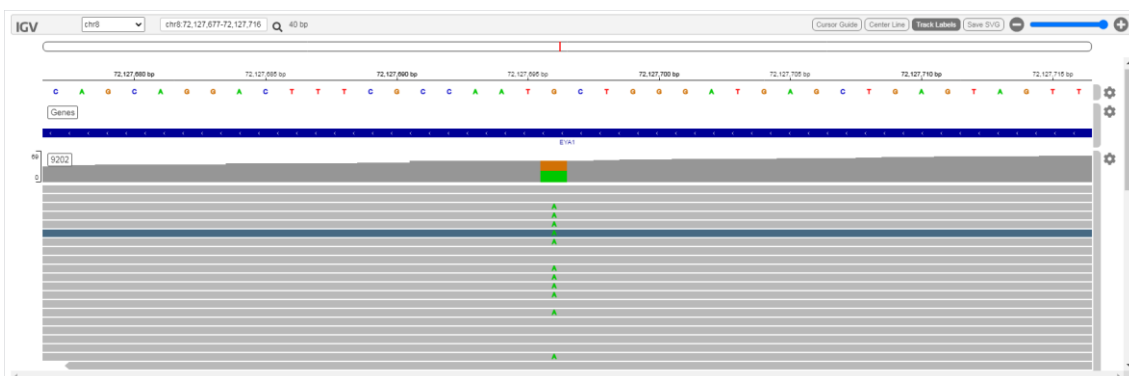


Figura 23. Variante c.1523C>T identificada no gene *EYAI* do paciente 11089 em heterozigose com alelo de referência. Imagem gerada pelo programa IGV - Integrative Genomes Viewers.

ii. Variante c.737C>T (rs587782350) em heterozigose com o alelo de referência no gene *PTEN*, onde ocorre a mudança de uma prolina para uma leucina na posição 246 (Figura

24). Essa variante é causal para Síndrome de Cowden (SC) (OMIM 158350). A Síndrome de Cowden é um distúrbio hamartomatoso de origem endo, ecto e mesodérmica, caracterizado por macrocefalia, triquilemomas faciais, ceratoses acrais, pápulas papilomatosas e um risco aumentado para o desenvolvimento de carcinoma de mama, tireoide e endometrial (YEHIA; ENG, 2001); tem um padrão de herança autossômica dominante e o fenótipo entre pacientes é variável (BLUMENTHAL; DENNIS, 2008; VETTORATO *et al.*, 2003; YEHIA; ENG, 2001).

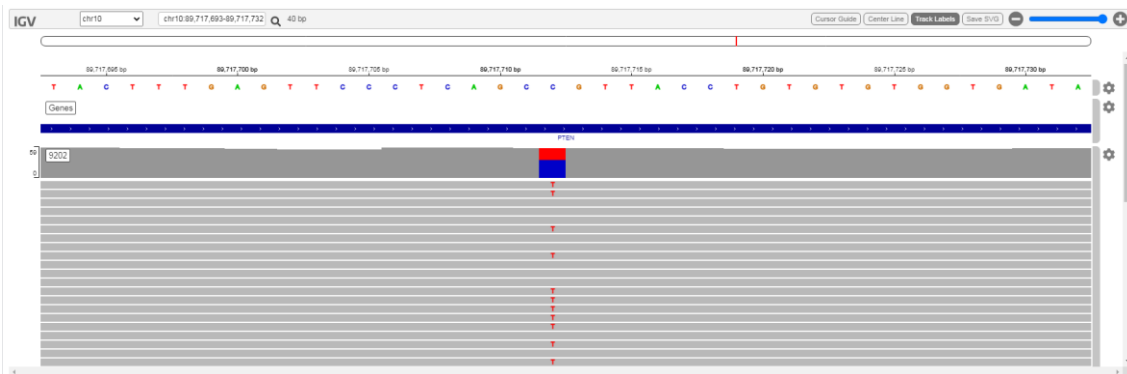


Figura 24. Variante c.737C>T identificada no gene *PTEN* do paciente 11089 em heterozigose com alelo de referência. Imagem gerada pelo programa IGV - Integrative Genomes Viewers.

Esse paciente, portanto, possui duas síndromes genéticas raras, resultando em um fenótipo diverso. A Síndrome branquio-oto-renal explica a perda auditiva e a fenda palatina da paciente, enquanto a Síndrome de Cowden explica as demais características (atraso no desenvolvimento, deficiência intelectual, dismorfias faciais e macrocefalia). A análise molecular ajudou a elucidar a clínica do paciente, possibilitando um diagnóstico mais acurado.

A fenda palatina já foi corrigida cirurgicamente. Alguns pacientes com Síndrome branquio-oto-renal podem desenvolver problemas renais, por isso o acompanhamento por nefrologista é recomendado.

Uma abordagem interprofissional para o manejo de pacientes com Síndrome de Cowden é necessária, devido ao fenótipo variado e ao envolvimento de múltiplos órgãos. Especialistas como ginecologistas e obstetras, gastroenterologistas, endocrinologistas, dermatologistas, neurologistas ou radiologistas podem vir a fazer parte da equipe de cuidados da paciente.

O gene *PTEN* é um gene supressor de tumor e codifica uma proteína que contribui para o controle da apoptose e do ciclo celular (WORBY; DIXON, 2014).

Visto que a Síndrome de Cowden está associada a hamartomas (mais comumente encontrados na pele e no trato gastrointestinal, mas podem ser encontrados em praticamente todos os órgãos) (BLUMENTHAL; DENNIS, 2008), se faz necessário o monitoramento de longo prazo desses pacientes, devido ao risco de malignidade. Estima-se que as características mucocutâneas, incluindo triquilemomas e pápulas papilomatosas, tenham uma penetrância de 99% na SC na quarta década de vida (YEHIA; ENG, 2001). Anormalidades benignas da tireóide - como adenomas, hamartomas, bócio multinodular e tireoidite de Hashimoto - são comuns e ocorrem em até 75% dos pacientes (BLUMENTHAL; DENNIS, 2008; YEHIA; ENG, 2001). O risco de câncer de tireoide ao longo da vida é estimado em cerca de 10%, em comparação a menos de 1% na população em geral e o risco de câncer de tireoide do tipo carcinoma é aumentado em até 30% (BLUMENTHAL; DENNIS, 2008). O câncer de pele com melanoma também está aumentado e pode ocorrer em 5% dos pacientes e o risco de câncer de cólon é ligeiramente elevado. Malignidades como câncer epitelial de tireoide, câncer renal e carcinoma endometrial costumam aparecer mais tarde na vida. Algumas malformações geniturinárias descritas incluem rim em ferradura e útero bicornio (BLUMENTHAL; DENNIS, 2008). Além disso, aproximadamente metade das mulheres desenvolve leiomiomas uterinos, geralmente na terceira década de vida e também podem ocorrer cistos ovarianos. Dessa forma, mulheres com SC podem apresentar anormalidades menstruais, junto com um possível aumento de 20% a 30% no risco de carcinoma endometrial. Até metade das mulheres com SC sofrem de doença benigna da mama, que pode ser extensa e bilateral. O risco de câncer de mama ao longo da vida, em mulheres, é estimado em em 50%, em comparação com menos de 11% na população em geral (BLUMENTHAL; DENNIS, 2008); cerca de 85% das mulheres com SC desenvolvem carcinoma de mama em algum momento de suas vidas. O diagnóstico de câncer de mama ocorre em uma idade mais jovem em comparação com a população em geral, com a idade média do diagnóstico de 36 a 46 anos (BLUMENTHAL; DENNIS, 2008; YEHIA; ENG, 2001).

Existe uma diretriz de vigilância para pacientes com Síndrome de Cowden que tiveram uma variante identificada no gene *PTEN*: ultrassonografia da tireoide, começando aos 7 anos; colonoscopia e imagens renais bienais começando entre 35 e 40 anos, a menos que o paciente seja sintomático; mulheres devem realizar autoexames

mamários mensais e exames mamários anuais, bem como ultrassonografias transvaginais ou biópsias endometriais a partir dos 35 anos (YEHIA; ENG, 2021).

A Síndrome branquio-oto-renal tem um padrão de herança autossômica dominante e somente 10% dos casos são causados por variantes patogênicas *de novo*. Por isso é recomendado fazer uma avaliação física e genética dos pais da paciente. A avaliação física consiste em identificar os seguintes fenótipos: perda auditiva, fossas pré-auriculares, estenose do ducto lacrimal, fístulas branquiais e / ou cistos e anomalias renais. A avaliação genética consiste em verificar se algum dos pais tem a variante encontrada na paciente (SMITH, 2018). Caso seja confirmada se tratar de uma variante *de novo*: a paciente tem 50% de chance de ter filhos portadores da Síndrome branquio-oto-renal a cada gestação. O risco não é aumentado para os demais familiares, incluindo futuros irmãos. Caso algum dos pais seja diagnosticado com BOR, o pai ou a mãe terá 50% de chance de ter filhos portadores da Síndrome branquio-oto-renal a cada gestação; se a mãe for a portadora, os irmãos da paciente deverão ter uma consulta com geneticista.

A Síndrome de Cowden tem também um padrão de herança autossômica dominante. Visto que os pais da paciente são hígidos, ou seja, não apresentam fenótipo compatível com nenhuma das duas síndromes, considera-se que o caso da paciente é uma mutação nova. A paciente tem 50% de chance de ter filhos portadores da Síndrome de Cowden a cada gestação. O risco não é aumentado para os demais familiares, incluindo futuros irmãos. O fato da paciente ter gemelar univitelina com quadro clínico semelhante corrobora a hipótese de que a mutação ocorreu na gametogênese.

### **Paciente 11178**

Refere-se a paciente do sexo masculino nascido em 03 de fevereiro de 2016, filho de pais não consanguíneos e com relato de meio irmão paterno com deficiência auditiva unilateral de 25% (Figura 25).

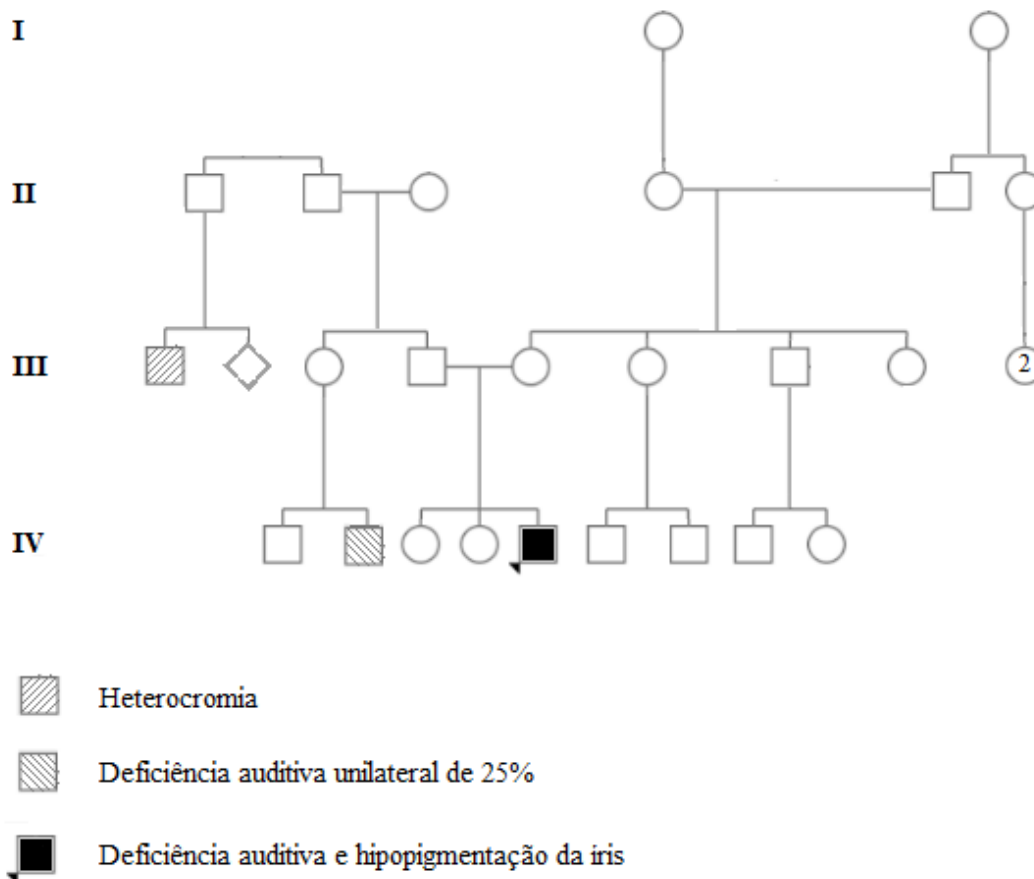


Figura 25. Heredograma da família do paciente 11178 mostrando a segregação de deficiência auditiva e pigmentação da íris.

Paciente teve suspeita de deficiência auditiva logo após o nascimento, quando falhou no teste da orelhinha. Realizou BERA (potencial evocado auditivo do tronco encefálico) e foi confirmado o diagnóstico de deficiência auditiva neurossensorial bilateral. A hipótese diagnóstica do paciente era de deficiência auditiva bilateral congênita não síndrômica.

A neurologista encaminhou o paciente ao serviço de genética do HUB por suspeita de Síndrome de Waardenburg, devido a íris azul clara (deficiência auditiva síndrômica). Mãe relata que há familiares com olhos verdes, mas nenhum com olhos azuis como o do paciente. Relata ainda que o pai do paciente tem um primo com um olho marrom e o outro preto, e que está perdendo a visão em um dos olhos. Paciente teve desenvolvimento neuropsicomotor adequado e não tem déficit cognitivo.

Análise genética:

Na análise do exoma observou-se a presença de uma variante causal para Síndrome de Waardenburg, a variante c.1230G>A (rs1057521096) em heterozigose



com o alelo de referência no gene *MITF*, que é uma mutação silenciosa (Figura 26). No artigo em que foi descrita, a variante está referida como c.1212 G>A, em outra versão do genoma (BRENNER *et al.*, 2011; SWANSON, 2011). (vide 1.2.1.2).

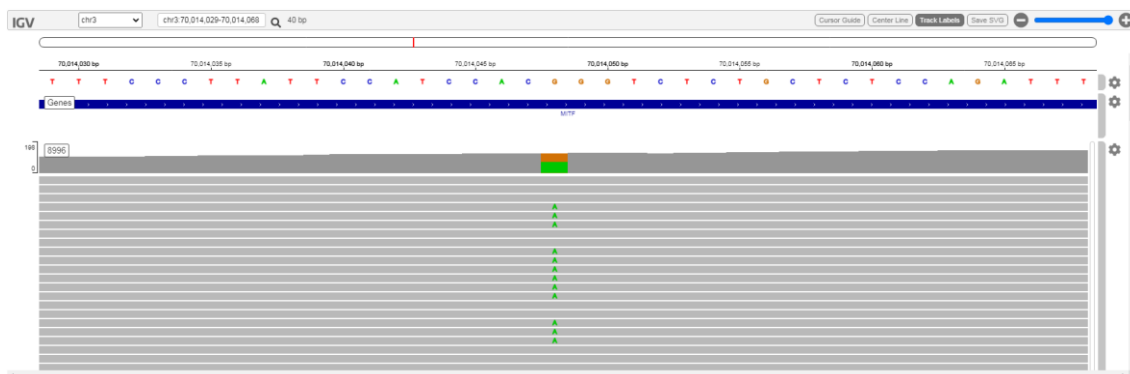


Figura 26. Variante c.1230G>A em heterozigose com o alelo de referência identificada no gene *MITF* do paciente 11178. Imagem gerada pelo programa IGV - Integrative Genomes Viewers.

Durante a análise desse caso, o filtro utilizado na análise não incluiu mutação silenciosa/sinônima, no entanto a plataforma detectou a variante patogênica. O fato de uma mutação silenciosa ser patogênica torna a análise molecular mais complexa.

A Síndrome de Waardenburg tipo II se caracteriza, principalmente, por deficiência auditiva neurossensorial congênita e hipopigmentação da íris. O cognitivo é preservado. Por ser uma doença autossômica dominante, considera-se que o caso do paciente é uma mutação nova, visto que os pais do mesmo não são portadores da síndrome. O paciente tem 50% de chance de ter filhos portadores da Síndrome de Waardenburg para cada filho/gestação. O risco não é aumentado para os demais familiares, incluindo as irmãs.

O paciente não apresenta outras características da Síndrome de Waardenburg, tais como mecha branca no cabelo, leucodermia, telecanto ou fendas palpebrais pequenas. É possível que isso se deva pelo paciente ter uma variante silenciosa, ou seja, por não haver uma troca no aminoácido que forma a proteína.

A deficiência auditiva e a heterocromia observada nos familiares provavelmente tem etiologia diferente do observado no paciente.

### **Paciente 11284**

O paciente do sexo masculino, nasceu em 03 de abril de 1994. É um paciente sindrômico (encaminhado ao serviço de genética por endocrinologista), com deficiência

auditiva neurossensorial, Síndrome de Kabuki e alterações faciais típicas, deficiência intelectual, diabetes mellitus e baixa estatura. Filho de pais não consanguíneos e com uma irmã com deficiência auditiva não síndrômica e um irmão com deficiência auditiva não síndrômica e transtorno psicótico. Histórico familiar do lado paterno relata um primo de segundo grau com deficiência auditiva, um primo de segundo grau com deficiência intelectual e um primo de segundo grau com distúrbio psicótico (Figura 27).

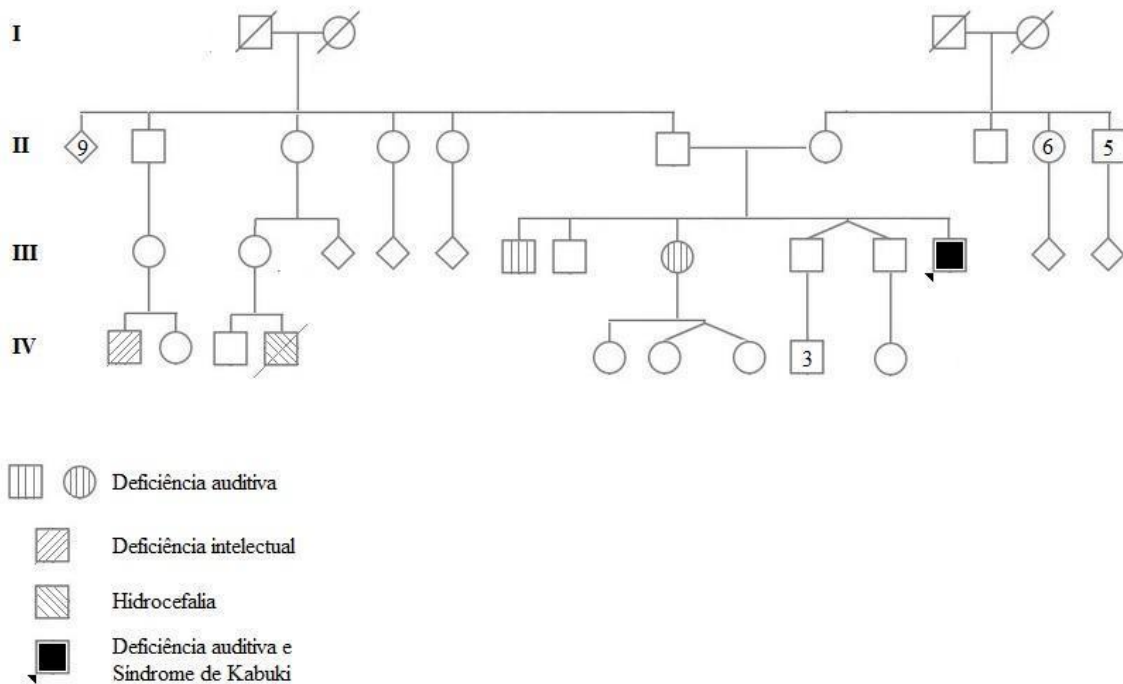


Figura 27. Heredograma da família do paciente 11284.

Paciente compareceu ao serviço de genética do HB com sua mãe, que foi quem relatou o histórico do filho. Com 19 horas de vida apresentou episódio de enterorragia e também de hipoglicemia e ficou sete dias internado na UTI. Evoluiu com atraso no desenvolvimento neuropsicomotor, apesar do início da estimulação precoce aos 6 meses de idade.

No período neonatal, paciente apresentou episódios convulsivos, mas nega uso de medicação. Aos 4 anos foi avaliado pela primeira vez por geneticista e diagnosticado com Síndrome de Kabuki. Em 2010 apresentou episódio de hematúria maciça e sufusões hemorrágicas. Houve acompanhamento na hematologia com diagnóstico de plaquetopenia recidivante, recebendo alta da hematologia entre 2011 e 2012. Em 2016

foi diagnosticado com diabetes mellitus e faz tratamento com insulina. Frequentou ensino especial até os 22 anos.

Ao exame físico o paciente apresenta: peso e altura abaixo de terceiro percentil e perímetro cefálico dentro da normalidade; fendas palpebrais retas e alongadas; cílios longos, eversão das pálpebras inferiores; sobrancelhas retas e curtas, com rarefação de  $\frac{2}{3}$  externos, raiz nasal média, dorso e base alargados, columela curta; palato alto, ausência de incisivo central inferior esquerdo, sendo que o direito é diminuído de tamanho; prognatismo discreto; orelhas simples e protusas, normoimplantadas; pescoço alargado; pectus excavatum; abdome sem visceromegalias; testículos tópicos; retificação da lordose lombar e cifose torácica. fosseta sacral; discreta restrição articular de pequenas e grandes articulações; mãos sem alteração de pregas; quintos (5º) quirodáctilos diminuídos de tamanho; apagamento de prega interfalangeana distal de quarto (4º) quirodáctilos bilateralmente; “Pads” discretos nos dedos; pés planos com descamação em dedos e unhas.

#### Análise genética:

Apesar de já ter o diagnóstico clínico para Síndrome de Kabuki, esse diagnóstico não explicava o quadro de deficiência auditiva do paciente. Considerando seu histórico familiar (irmãos com deficiência auditiva não sindrômica), optou-se por fazer a triagem para a variante c.35delG, que foi observada em heterozigose no paciente, o que também não explicava o fenótipo de deficiência auditiva por esta ser uma condição com herança autossômica recessiva. Pela análise do exoma, confirmou-se a presença da variante c.35delG (rs80338939) (Figura 28) e observou-se a presença de outra variante no mesmo gene *GJB2*. A segunda variante, c.550C>T (rs998045226), detectada em heterozigose com o alelo referência no gene *GJB2*, leva a mudança de uma arginina para um triptofano na posição 184 da proteína (Figura 29). Se for confirmado que as duas variantes encontradas no gene *GJB2* estão em posição cis nos cromossomos, será constatada uma heterozigose composta, e o quadro de deficiência auditiva do paciente estará explicado. Não foi possível a confirmação da fase da mutação até o momento.



Figura 28. Variante c.35delG em heterozigose com alelo referência identificada no gene *GJB2* do paciente 11284. Imagem gerada pelo programa IGV - Integrative Genomes Viewers.

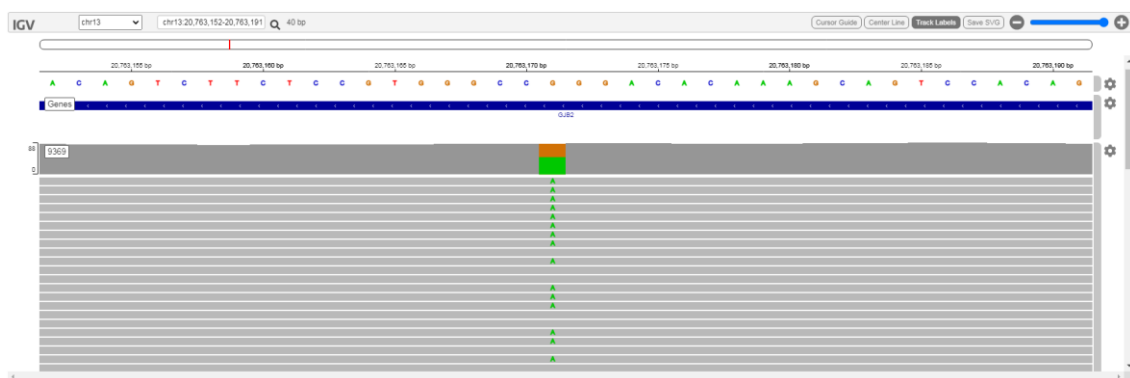


Figura 29. Variante c.550C>T em heterozigose com alelo referência identificada no gene *GJB2* do paciente 11284. Imagem gerada pelo programa IGV - Integrative Genomes Viewers.

Também foi encontrada a variante c.15142C>T (rs398123724) em heterozigose com o alelo referência no gene *KMT2D*, onde ocorre a mudança de uma arginina para uma cisteína na posição 5048 (Figura 30). Essa variante foi descrita como causal para Síndrome de Kabuki (OMIM 147920). Essa é uma síndrome congênita cuja prevalência estimada é de 1:32000 (BOKINNI, 2012; WANG *et al.*, 2019). Na Austrália e Nova Zelândia a incidência é de 1:86000 (WHITE *et al.*, 2004). O fenótipo inclui características faciais (eversão da pálpebra lateral inferior, sobrancelhas arqueadas com um terço lateral disperso ou esparso, ponta nasal deprimida, fenda labial e/ou palatina, orelhas proeminentes), defeitos cardíacos, deficiência intelectual, baixa estatura (retardo de crescimento pós-natal), anomalias geniturinárias, oftalmológicas, renais e vertebrais (BOKINNI, 2012; SHANGGUAN *et al.*, 2019; WANG *et al.*, 2019). Além do gene *KMT2D* (inicialmente chamado de *MLL2*), também há mutações descritas no gene *KDM6A* como causais dessa síndrome (HANNIBAL *et al.*, 2011; NG *et al.*, 2010; SHANGGUAN *et al.*, 2019). A variante no gene *KMT2D* confirma, molecularmente, o

diagnóstico clínico para a Síndrome de Kabuki do paciente. Essa síndrome explica parte do fenótipo do paciente: as alterações faciais, a deficiência intelectual e a baixa estatura.

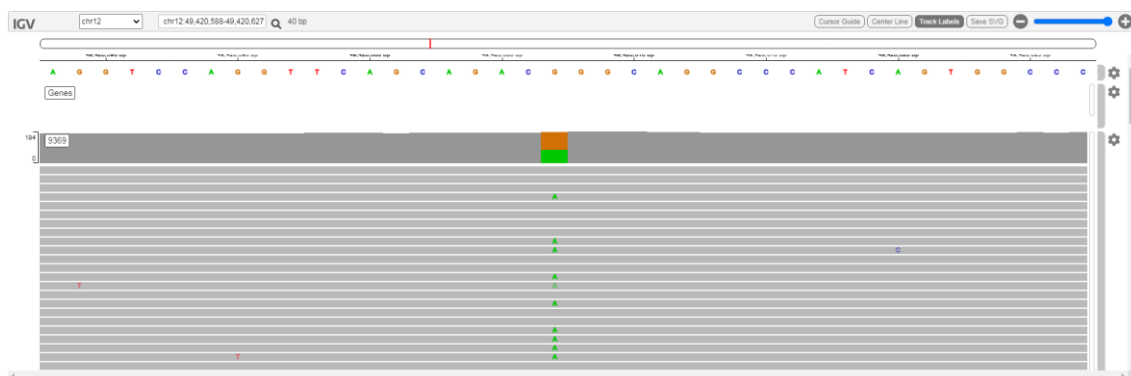


Figura 30. Variante c.15142C>T identificada em heterozigose com o alelo referência no gene *KMT2D* do paciente 11284. Imagem gerada pelo programa IGV - Integrative Genomes Viewers.

A análise do exoma também revelou a variante c.396A>C (rs137852388) em hemizigose no gene *F8*, onde ocorre a mudança de um ácido glutâmico para um ácido aspártico na posição 132 (Figura 31). Variantes nesse gene estão associadas à hemofilia A.

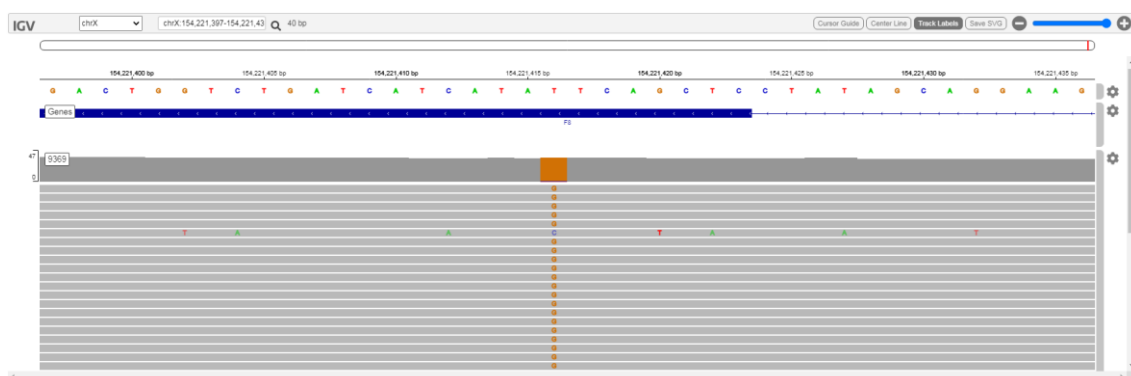


Figura 31. Variante c.396A>C identificada em hemizigose no gene *F8* do paciente 11284. Imagem gerada pelo programa IGV - Integrative Genomes Viewers.

Devido ao fato do paciente não ter diagnóstico clínico para distúrbios de coagulação, foi feita uma revisão no prontuário do paciente, em busca de ocorrências que poderiam corroborar, clinicamente, o achado molecular. Após a revisão, dois episódios se destacaram: 1º) que com 19 horas de vida apresentou episódio de

enterorragia e que outros episódios se sucederam e 2º) que em 2010 apresentou episódio de hematúria maciça e sufusões hemorrágicas. Os achados clínico e molecular levaram a geneticista a diagnosticar o paciente com hemofilia A.

### Paciente 11289

Refere-se a paciente do sexo feminino, nascida em 01 de abril de 2009, filha de pais não consanguíneos e com relato de avô e bisavô paternos com deficiência auditiva de origem desconhecida (Figura 32). O diagnóstico clínico desta paciente foi deficiência auditiva neurossensorial moderada, bilateral, não sindrômica.

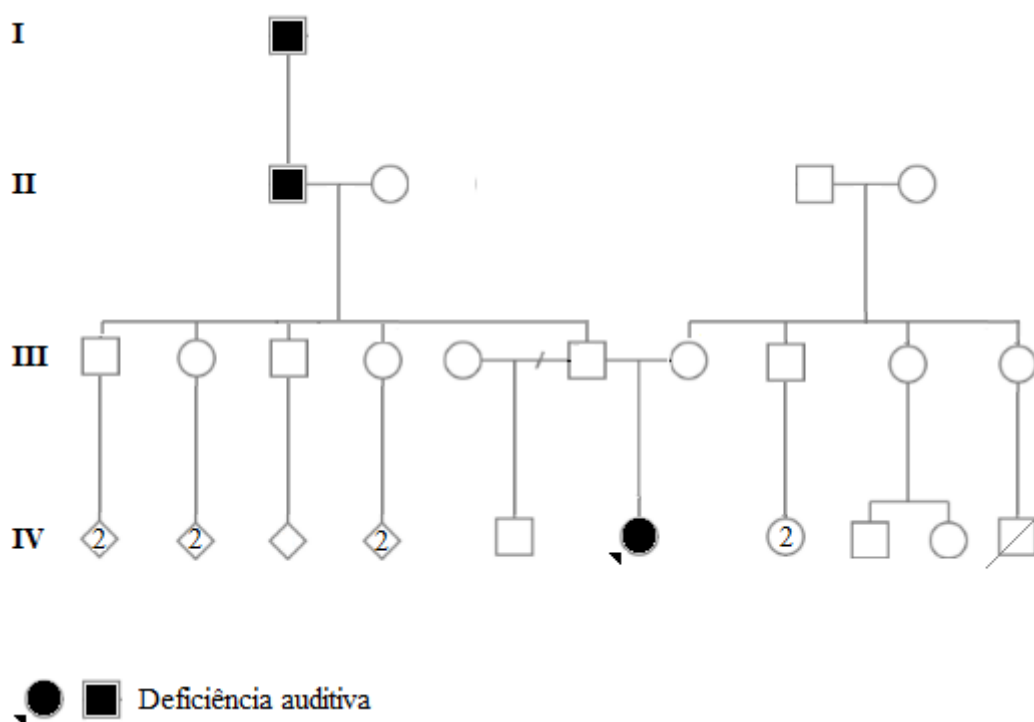


Figura 32. Heredograma da família da paciente 11289.

#### Análise genética:

Na análise do exoma observou-se a presença de uma deleção de 9.4kb englobando os genes *STRC*, *CKMT1B*, *SNOU13*, *RNU6-554P* em homozigose, em 15q15.3 (Figura 33). A deleção do gene *STRC* está descrita como causal para deficiência auditiva autossômica recessiva não sindrômica 16 (OMIM 603720). O *STRC* é um gene conhecidamente associado à deficiência auditiva, que causa perda auditiva leve a moderada (YOKOTA *et al.*, 2019). Nesta paciente, o *STRC*, juntamente com outros genes, são deletados na região 15q15.3, levando a uma grande deleção.

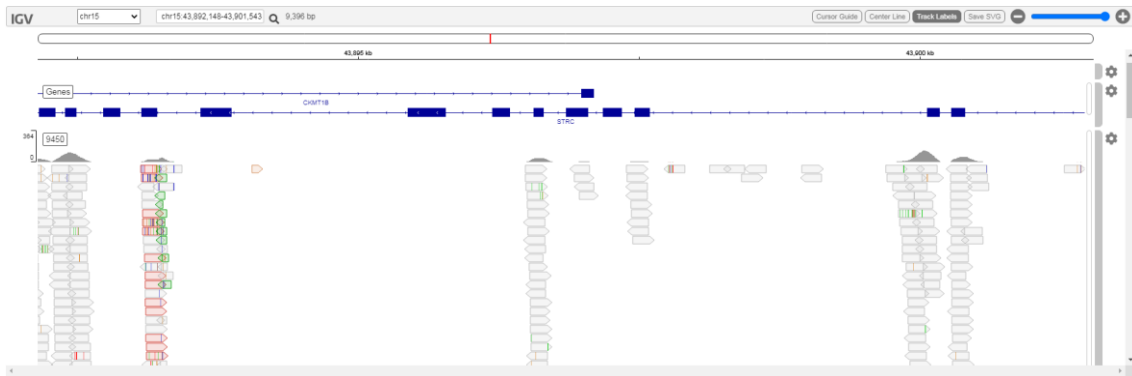


Figura 33. Deleção de 9.4kb em homozigose englobando os genes *STRC*, *CKMT1B*, *SNOU13*, *RNU6-554P* do paciente 11289. Imagem gerada pelo programa IGV - Integrative Genomes Viewers.

Portanto, essa grande deleção explica o quadro de deficiência auditiva não síndrômica da paciente. No entanto, ela não pode ser a causa da deficiência auditiva relatada na família, pois se trata de uma variante autossômica recessiva.

### Paciente 11294

Refere-se ao paciente do sexo masculino, nascido em 26 de maio de 2014, filho de pais não consanguíneos. Paciente síndrômico, cujo histórico familiar (Figura 34) apresenta o relato de ambos os pais terem deficiência auditiva e de múltiplos casos de deficiência auditiva por parte paterna. O quadro de deficiência auditiva da mãe foi descrito como associado a rubéola congênita.

Ao exame físico apresentou: fronte ampla, fendas palpebrais discretamente oblíquas para baixo, palato sem anormalidades, microtia bilateralmente, apêndice pré-auricular na orelha direita e sinus pré-auricular na orelha esquerda.

Paciente falhou no teste da orelhinha. Pai e avó perceberam que o paciente, aos 8 meses, apresentava dificuldade para ouvir. Atualmente fala palavras-chaves.

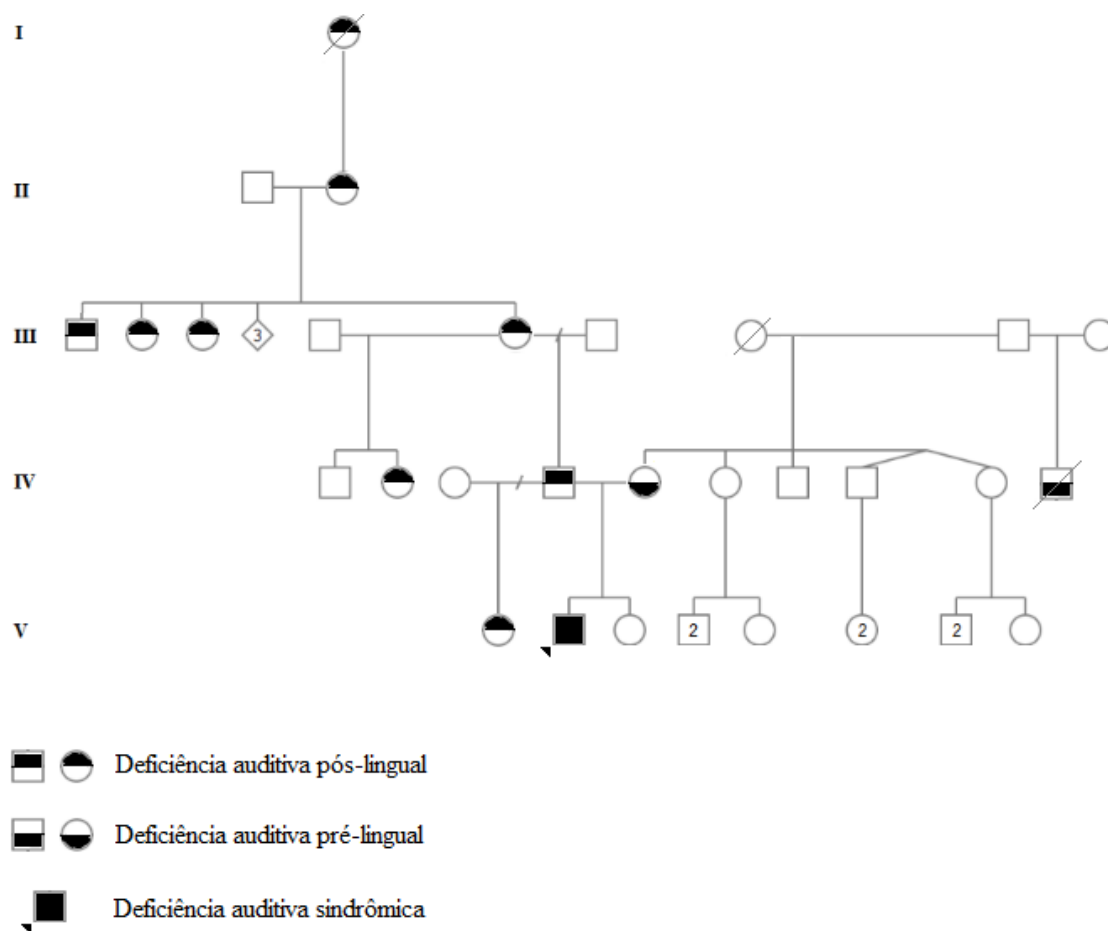


Figura 34. Heredograma da família do paciente 11294.

Análise genética:

Na análise do exoma observou-se a presença de duas variantes patogênicas, sendo que uma explica o quadro fenotípico do paciente e a outra se caracteriza como achado incidental.

A primeira variante, c.1081C>T (rs121909202), observada em heterozigose com o alelo referência no gene *EYA1*, na região exônica é uma mutação sem sentido que leva a truncagem da proteína posição 361 (Figura 35). Variantes nesse gene são conhecidas como causa para a Síndrome branquio-oto-renal (vide 1.2.1.1). Essa variante sozinha explica o quadro de microtia do paciente e esse defeito estrutural ocasiona a deficiência auditiva e, potencialmente, é a mutação recorrente na família paterna do paciente. O quadro de deficiência auditiva devido a rubéola, apresentado pela mãe, se trata de deficiência auditiva de etiologia ambiental, fazendo com que seja descartada como causa genética da deficiência auditiva do paciente.



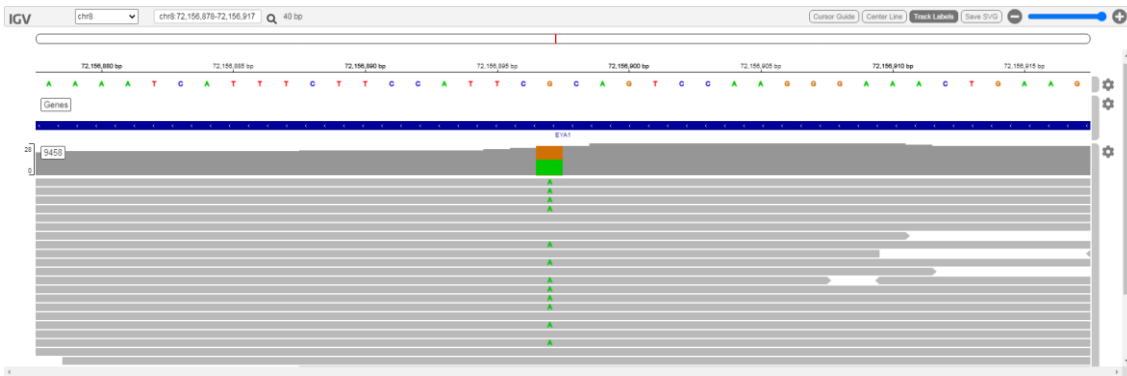


Figura 35. Variante c.1081C>T identificada em heterozigose com alelo de referência no gene *EYAI* do paciente 11294 . Imagem gerada pelo programa IGV - Integrative Genomes Viewers.

A segunda variante observada foi um achado incidental. A mutação c.1040C>T foi encontrada em heterozigose com o alelo de referência no gene *KCNQ1*, que leva a mudança de uma valina para uma alanina na posição 347 da proteína (Figura 36). Variantes nesse gene estão associadas à Síndrome do QT longo (OMIM 192500), que é uma síndrome arritmica hereditária, caracterizada por prolongamento do intervalo QT (prolongamento do potencial de ação) no eletrocardiograma de 12 derivações (FRAGATA *et al.*, 2016). O sintoma mais comum geralmente é a síncope, sendo que a morte súbita pode ocorrer em 1% a 3% dos adultos afetados; 50% dos pacientes sintomáticos apresentam sua primeira manifestação cardíaca por volta dos 12 anos de idade (FRAGATA *et al.*, 2016). Apesar dessa variante não estar relacionada com o fenótipo do paciente, ela tem implicações médicas importantes e deve ser relatada pois está na lista da ACMG (MILLER *et al.*, 2021). Visto que o paciente nasceu em maio de 2014 (tendo 7 anos) ainda não apresentou manifestações cardíacas. Se faz necessário o acompanhamento por cardiologista.

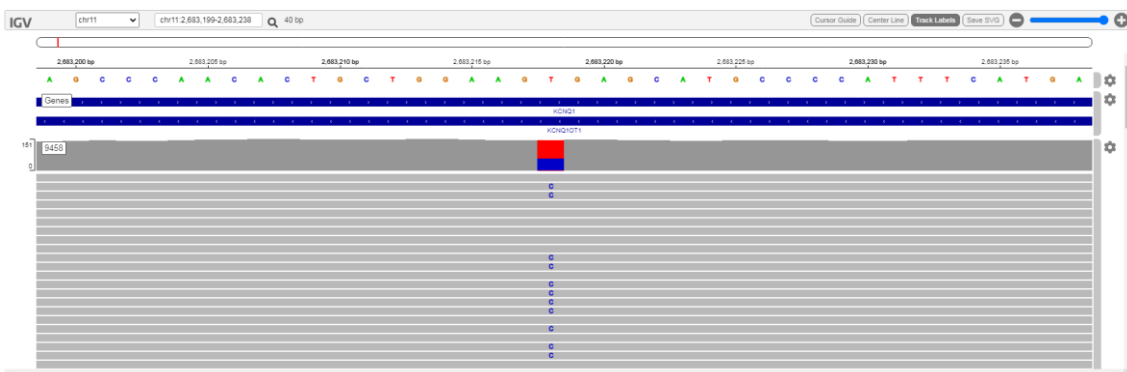


Figura 36. Variante c.1040C>T identificada em heterozigose com o alelo referência no gene *KCNQ1* do paciente 11294. Imagem gerada pelo programa IGV - Integrative Genomes Viewers.

## Paciente 10921

Refere-se a paciente sindrômico, nascido em 09 de fevereiro de 1979 que apresenta deficiência auditiva, atresia de coana (já corrigida) e disgenesia gonadal mista. Não há relato de familiares com deficiência auditiva (Figura 37).

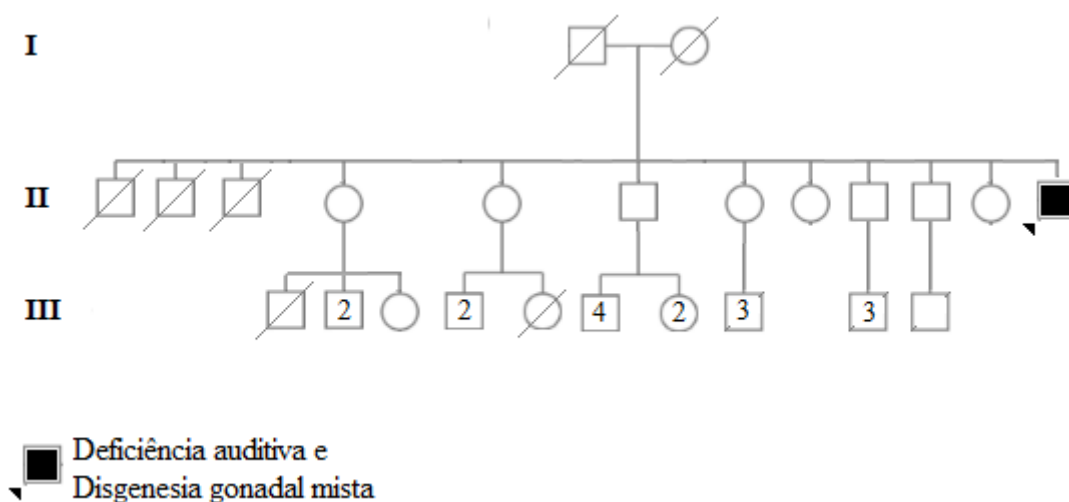


Figura 37. Heredograma da família do paciente 10921.

Ao exame físico o paciente apresentou: sobrancelhas arqueadas, fendas palpebrais retas, raiz nasal média, dorso nasal afilado, filtro nasolabial pouco marcado, hipoplasia de face média, palato alto, prognatismo discreto, orelhas normoimplantadas; ginecomastia bilateral; abdome sem visceromegalias; genitália ambígua, escrotos fundidos, pouco pigmentados; membros sem anormalidades. A hipótese diagnóstica foi de Síndrome de CHARGE.

Devido a disgenesia gonadal mista, o paciente passou por diversas cirurgias entre os anos de 1983 e 1988 (orquidopexia, vaginectomia, ortofaloplastia, cistostomia, correção de transposição peno-escrotal, neouretra, neuretroplastia e orquiectomia bilateral).

Em 1985, foi realizado exame de cariótipo cujo resultado foi 45,X/46,XY. Em 2017 foi realizado exame de cariótipo onde foram analisadas 60 metáfases (coradas para bandamento C e G), obtidas da cultura temporária de linfócitos do sangue periférico. Em 45 (75%), foram encontrados 45 cromossomos, tendo apenas um X. Em 15 (25%), haviam 46 cromossomos, com a presença de um cromossomo X e um Y. O cariótipo

determinado foi 45,X[45]/46,XY[15], característico de Disgenesia Gonadal Mista. Ultrassonografia das mamas identificou ginecomastia bilateral benigna.

Em 2019 foi realizado eletrocardiograma (miocardiopatia segmentar do ventrículo esquerdo com disfunção sistólica de grau discreto. Insuficiência mitral e tricúspide de grau discreto. Aumento moderado do átrio esquerdo. Disfunção diastólica do ventrículo esquerdo grau II) e Holter (ritmo de base sinusal, com extrassístoles ventriculares raras repolarização). Audiometria mostrou perda auditiva severa à direita e moderadamente severa à esquerda.

#### Análise genética:

Na análise do exoma não se observou a presença de variantes patogênicas que explicassem o quadro fenotípico do paciente, apesar de apresentar um quadro sindrômico amplo.

#### **Paciente 11024**

Refere-se a paciente do sexo masculino, nascido em 17 de agosto de 1993, filho de pais não consanguíneos e sem relatos de perda auditiva na família (Figura 38). O paciente é sindrômico, sendo que o fenótipo de deficiência auditiva está associado a deficiência intelectual, atresia de coana e assimetria facial (desvio da rima labial e do nariz para a direita, assimetria de fendas palpebrais, sendo a direita reta e a esquerda oblíqua para cima, com hemiface esquerda menor que a direita, orelhas pequenas e simplificadas, fenda palatina e paralisia facial à direita. A tomografia computadorizada de mastóides revelou ausência da cadeia ossicular bilateralmente, obliteração da janela oval por placa óssea atrésica bilateralmente e esclerose óssea da cápsula ótica bilateral (não há coloboma). Foi levantada a hipótese diagnóstica de Síndrome de CHARGE.

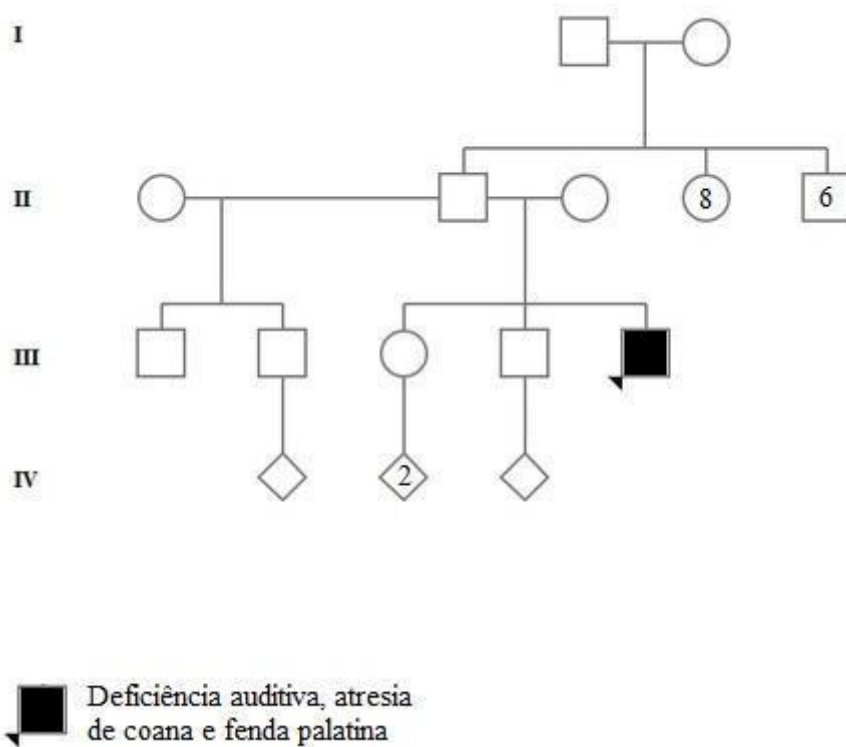


Figura 38. Heredograma da família do paciente 11024.

#### Análise genética:

Na análise do exoma não se observou a presença de variantes patogênicas que explicassem o quadro fenotípico do paciente, apesar de apresentar um quadro sindrômico amplo.

Com os avanços tecnológicos na área da biologia molecular, foi possível identificar variantes em larga escala. O estudo de associação genômica ampla (GWAS) é uma metodologia utilizada para identificar variantes causais, através da associação das variantes encontradas com um determinado fenótipo (BUSH, MOORE, 2012). No entanto, o GWAS tem um grande viés populacional (POPEJOY; FULLERTON, 2016; SIRUGO; WILLIAMS; TISHKOFF, 2019); a proporção de indivíduos é de aproximadamente 81% de europeus e eurodescendentes, 14% de asiáticos, 3% de africanos, 1% de miscigenados e <1% para as populações hispânicas e latino-americanas, indígenas (nativos americanos, aborígenes australianos e ilhéus do Pacífico) e árabes e do Oriente Médio (POPEJOY; FULLERTON, 2016). Essa falta de diversidade amostral faz com que o conhecimento adquirido sobre a relação genótipo-

fenótipo seja limitado e pouco representativo para as populações sub-representadas (POPEJOY; FULLERTON, 2016; SIRUGO; WILLIAMS; TISHKOFF, 2019). Além dessa pouca representatividade populacional para indivíduos latino-americanos e miscigenados, muitas variantes não têm uma classificação/predição - se são benignas, deletérias, patogênicas, ou outras - e acabam sendo classificadas como incertas, VUS (variantes de significado incerto) ou N/A.

A não identificação de variantes patogênicas nos pacientes 11024 e 10921, no presente momento, não exclui a existência das mesmas. É imprescindível que haja uma reavaliação do exoma para a identificação de variantes causais no futuro, à medida que novos conhecimentos sejam acumulados.

### Paciente 10598

Refere-se a paciente do sexo feminino, nascida em 26 de maio de 2011. A paciente apresenta deficiência auditiva sindrômica e pais não consanguíneos (Figura 39). Ao exame físico apresenta testa ampla, raiz nasal média, ponta nasal bulbosa, epicanto discreto, olhos de implantação profunda, fendas palpebrais retas, boca reta, orelhas normais, sobrancelhas curtas. Com relação às mãos e pés, apresenta dedos afilados em ambos, pregas ok.

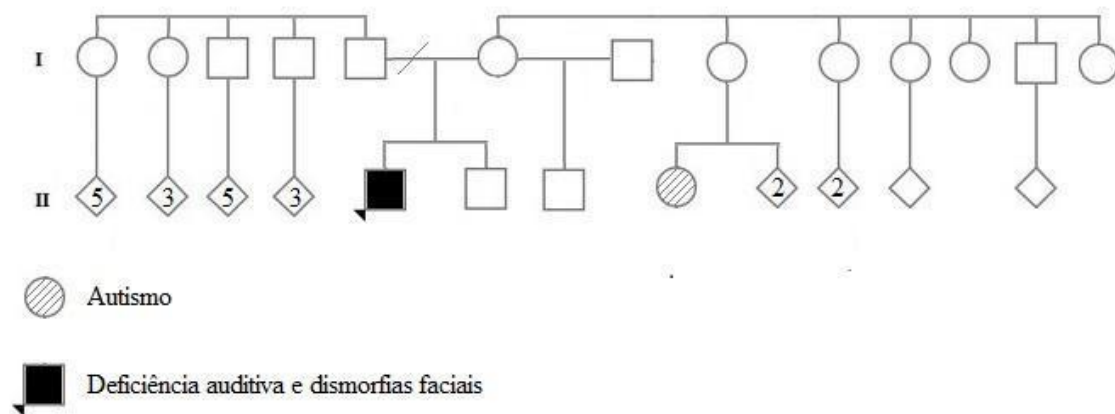


Figura 39. Heredograma da família do paciente 10598.

Em março de 2015 foi realizado exame de Pesquisa de mutação no gene *FMRI* (Síndrome do cromossomo X frágil), que teve resultado negativo para a Síndrome. Em dezembro de 2015 foi realizado exame de cariótipo onde foram analisadas 25 metáfases (coradas para bandamento G), obtidas da cultura temporária de linfócitos do sangue

periférico. Todas as metáfases apresentaram cromossomos normais, em número e em estrutura. O cariótipo determinado foi 46,XX, característico de pessoa do sexo feminino.

#### Análise genética:

A amostra não passou no controle de qualidade interno da MacroGen, portanto não foi possível realizar a análise molecular para este paciente.

### 5.3 Apanhado geral

Foi realizado exoma em 12 pacientes e 10/12 tiveram diagnóstico molecular (Tabela 6). Em 9/12 casos houve o diagnóstico molecular para a deficiência auditiva do paciente, envolvendo os genes *ACTB* (Síndrome de Baraitser-Winter 1), *EYAI* (Síndrome branquio-oto-renal), *GJB2* (deficiência auditiva autossômica recessiva não síndrômica), *GSDME* (deficiência auditiva neurossensorial progressiva), *MITF* (Síndrome de Waardenburg), *MCM2* (deficiência auditiva não síndrômica autossômica dominante 70) e *STRC* (deficiência auditiva autossômica recessiva não síndrômica 16).

Tabela 6. Classificação das variantes observadas e identificação dos tipos de variantes.

Amostra	GENES/VARIANTES		
	Relacionadas a DA	Achados Incidentais	Achados Secundários
10581	-		<i>CPT2</i> (c.338C>T) <i>SERPINA1</i> (c.863A>T)
10598	-	-	-
10727	<i>ACTB</i> (c.127G>T)		
10765	<i>GSDME</i> (c.145C>T) <i>GSDME</i> (c.146C>T)		
10921	-	-	-
10941	<i>MCM2</i> (n.523-1G>A)		<i>CDH23</i> (c.3579+2T>C) <i>CDH23</i> (c.1143_1176delCCTGAAC AGCATGTTTGAGGTGTA CTTGGTGGGG)
10970	Del: <i>STRC</i> , <i>STRC</i> , <i>CKMT1B</i> , <i>SNOU13</i> , <i>RNU6-554P</i> Del: <i>STRC</i> , <i>CKMT1B</i> , <i>RNU6-</i>	<i>TNNT2</i> (c.692T>C)	

11024	-	-	-
11089	<i>EYAI</i> (c.1523C>T)		<i>PTEN</i> (c.737C>T)
11178	<i>MITF</i> (c.1230G>A)		
11284	<i>GJB2</i> (c.550C>T) <i>GJB2</i> (c.35delG)		<i>KMT2D</i> (c.15142C>T) <i>F8</i> (c.396A>C)
11289	Del: <i>STRC</i> , <i>CKMT1B</i> , <i>SNOU13</i> , <i>RNU6-554P</i> Del: <i>STRC</i> , <i>CKMT1B</i> , <i>SNOU13</i> , <i>RNU6-554P</i>		
11294	<i>EYAI</i> (1081C>T)	<i>KCNQ1</i> (c.1040T>C)	

Em **laranja**: variantes de sentido trocado (*missense*); em **azul escuro**: variante em região de receptor de splicing (*splice acceptor*); em **vermelho**: variante em região de doador de splicing (*splice donor*); em **azul claro**: deleção; em **verde**: variantes (*frameshift*); em **roxo**: variante silenciosa (*synonymous*); em **rosa**: variante *stop gain*.

Também foram encontrados achados incidentais nos pacientes 10970 (no gene *TNNT2*, relacionado a Não-compactação ventricular esquerda) e 11294 (no gene *KCNQ1*, relacionado a Síndrome do QT longo) além de achados secundários nos pacientes 10581 (no gene *CPT2*, relacionado a deficiência de carnitina palmitoil transferase II, forma miopática e no gene *SERPINA1*, relacionado a deficiência de alfa-1 antitripsina), 10941 (no gene *CDH23*, relacionado à Síndrome de Usher tipo I), 11089 (no gene *PTEN*, relacionado a Síndrome de Cowden) e 11284 (no gene *KMT2D*, relacionado a Síndrome de Kabuki e no gene *F8*, relacionado a hemofilia A).

Dos três pacientes com hipótese diagnóstica de Síndrome de CHARGE, um teve diagnóstico molecular de Síndrome de Waardenburg (11178) e os outros dois não tiveram diagnóstico molecular (10941 e 11289).

Dos 10 pacientes com diagnóstico molecular, somente no 10581 não foi identificada a causa genética da deficiência auditiva.

Ferramentas de análise atualizadas são essenciais para um correto diagnóstico molecular, exemplificado pelo resultado observado para o paciente 11178, cuja variante causal é uma variante silenciosa.

## 6. CONCLUSÕES

O principal objetivo deste trabalho foi buscar a etiologia genética para os casos de deficiência auditiva síndrômica e não síndrômica em pacientes do Distrito Federal. Através das técnicas genético/moleculares de sequenciamento por Sanger e do exoma, foi possível chegar a uma taxa diagnóstica de 63,63% para os casos de deficiência auditiva síndrômica (7/11 pacientes) e de 18,75% para os casos de deficiência auditiva não síndrômica (3/16 pacientes).

A implementação da triagem da variante 35delG, por meio de sequenciamento por Sanger, foi realizada para os pacientes oriundos dos ambulatórios de genética e otorrinolaringologia do Hospital Universitário de Brasília e teve uma taxa de sucesso de diagnóstico de 4% para os casos de deficiência auditiva. O exoma foi realizado em 12/13 pacientes oriundos do ambulatório de genética e teve uma taxa de sucesso de diagnóstico de 75% para os casos de deficiência auditiva.

A verificação da variante 35delG no gene *GJB2* foi realizada como uma triagem em todos os pacientes, ou seja, tanto nos pacientes não síndrômicos quanto nos pacientes síndrômicos. Essa primeira análise teve o objetivo de determinar se o quadro de deficiência auditiva dos pacientes era devido a variante 35delG em homozigose. Tendo sido realizada em 25 pacientes, a triagem teve uma taxa de diagnóstico de deficiência auditiva de 4% (1/25 pacientes). Também foi possível identificar a heterozigose dessa variante em dois pacientes (DA\_15 e 11284). Tendo isso em vista, a metodologia proposta foi adequada para detectar a presença da variante 35delG e determinar se o quadro de deficiência auditiva dos pacientes é devido a homozigose dessa variante.

O exoma foi realizado para os pacientes oriundos do ambulatório de genética. Essa segunda análise teve o objetivo de identificar variantes causais associadas tanto ao fenótipo de deficiência auditiva dos pacientes quanto aos outros fenótipos que compunham o quadro clínico de cada paciente. Tendo sido realizada em 12 pacientes, o exoma teve uma taxa de diagnóstico de deficiência auditiva de 75% (9/12 pacientes). Também foi possível identificar achados secundários (nos pacientes 10581, 10941, 11089 e 11284) e achados incidentais (nos pacientes 10970 e 11294), aumentando a taxa diagnóstica para 83.33% (10/12 pacientes). Tendo isso em vista, a metodologia proposta foi adequada para elucidar, molecularmente, a causa de deficiência auditiva dos



pacientes, além propiciar um diagnóstico molecular dos outros fenótipos que compõem o quadro clínico sindrômico dos pacientes.

É de suma importância analisar todas as variantes descritas como patogênicas, mesmo que não expliquem o fenótipo do paciente, pois podem se tratar de achados incidentais ou achados secundários.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALFARES A. *et al.* Whole-genome sequencing offers additional but limited clinical utility compared with reanalysis of whole-exome sequencing *Genetics in Medicine* v.20, n. 11, p. 1328-1333, 2018.
- ALFORD, R. L. *et al.* American college of medical genetics and genomics guideline for the clinical evaluation and etiologic diagnosis of hearing loss. *Genetics in Medicine*, v. 16, n. 4, p. 347–355, 2014.
- ALMAGOR *et al.* High Prevalence of Hearing Impairment in Primary Congenital Hypothyroidism. *European Thyroid Journal*. v. 10, n.3, p.215-221, 2020.
- ALPER, S. L.; SHARMA, A. K. The SLC26 Gene Family of Anion Transporters and Channels. *Mol Aspects Med*, v. 34, n. 2–3, p. 494–515, 2013.
- ALVES, R. M. *et al.* Analysis of mitochondrial alterations in Brazilian patients with sensorineural hearing loss using MALDI-TOF mass spectrometry. *BMC Medical Genetics*, v. 17, n. 1, p. 1–7, 2016.
- ANGELI, S.; LIN, X.; LIU, X. Genetics of Hearing and Deafness. *Anatomical record*, v. 295, n. 11, p. 1812–29, 2012.
- ANICHINI A. *et al.* Genotype–phenotype correlations in a large series of patients with muscle type CPT II deficiency. *Neurological Research* v. 33, n. 1, p. 24-32, 2011.
- 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.
- BENITO *et al.* Recessive variants in *COL25A1* gene as novel cause of arthrogyriposis multiplex congenita with ocular congenital cranial dysinnervation disorder. *Human Mutation*, v. n/a, p.1-12, 2022
- BLAKE, K. D., and PRASAD C. CHARGE syndrome. *Orphanet journal of rare diseases* v. 1 n. 34, 2006
- BLAKE, K. D. *et al.*, CHARGE association: an update and review for the primary pediatrician *Clin Pediatr (Phila)* v. 37, n. 3, p. 159-173, 1998.
- BLUMENTHAL, G. M.; DENNIS, P. A. PTEN hamartoma tumor syndromes. *European Journal of Human Genetics*, v. 16, n. 11, p. 1289–1300, 2008.
- BOKINNI, Y. Kabuki syndrome revisited. *Journal of Human Genetics*, v. 57, n. 4, p. 223–227, 2012.
- BONNEFONT J. P. *et al.* Carnitine palmitoyltransferase deficiencies. *Mol Genet Metab* v. 68, n. 4, p. 424-440, 1999.
- BRANTLY, M *et al.* Detection of alpha-1 antitrypsin deficiency: the past, present and future. *Orphanet journal of rare diseases* v. 15 n. 1, 96, 2020,
- BRENNER, L. *et al.* Novel splice mutation in microphthalmia-associated transcription factor in waardenburg syndrome. *Genetic Testing and Molecular Biomarkers*, v. 15, n. 7–8, p. 525–529, 2011.
- BRUZZONE, R.; WHITE, T. W.; PAUL, D. L. Connections with connexins: The molecular basis of direct intercellular signaling. *European Journal of Biochemistry*, v. 238, n. 1, p. 1–27, 1996.
- BUSH, W. S.; MOORE, J. H. Chapter 11: Genome-Wide Association Studies. *PLoS Comput Biol* , v.8, n. 12, 2012.
- CAMPOS, M. *Proposta de diagnóstico molecular para pacientes de Boca da Mata (Alagoas) com deficiência auditiva.* Dissertação (Mestrado em Biologia Animal) - Universidade de Brasília. Brasília, p. 90. 2021.
- CLARK J. G. Uses and abuses of hearing loss classification. *American Speech-*

*Language-Hearing Association (ASHA)*. v. 23, p. 493–500, 1981.

CORDEIRO-SILVA *et al.* Prevalence of 35delG/GJB2 and del (GJB6-D13S1830) mutations in patients with non-syndromic deafness from a population of espírito santo - Brazil. *Brazilian Journal of Otorhinolaryngology*, v. 76, n. 4, p. 428–432, 2010.

CUNNINGHAM, L. L.; TUCCI, D. L. Hearing Loss in Adults. *New England Journal of Medicine*, v. 377, n. 25, p. 2465–2473, 21 dez. 2017.

CURI, Rui; PROCOPIO, Joaquim. *Fisiologia Básica*, 2ª edição. Rio de Janeiro: EDITORA GUANABARA KOOGAN LTDA. 2017

DE CASTRO, L. S. S. *et al.* A study of GJB2 and delGJB6-D13S1830 mutations in Brazilian non-syndromic deaf children from the Amazon Region. *Brazilian Journal of Otorhinolaryngology*, v. 79, n. 1, p. 95–99, 2013.

DROR, A. A.; AVRAHAM, K. B. Hearing impairment: A panoply of genes and functions. *Neuron*, v. 68, n. 2, p. 293–308, 2010.

FILHO, D. C. S. *et al.* Left Ventricular Noncompaction: New Insights into a Poorly Understood Disease. *Current Cardiology Reviews*. v. 17, n. 2, p. 209–216, 2021

FITZGERALD T. *et al.* The frequency of GJB2 and GJB6 mutations in the New York State newborn population: feasibility of genetic screening for hearing defects. *Clin Genet* v. 65, p.338-342, 2004.

FRAGATA, C. DA S. *et al.* Síndrome do QT longo congênito: o que sabemos até o momento? TT - Congenital long QT syndrome: what do we know so far? *RELAMPA, Rev. Lat.-Am. Marcapasso Arritm*, v. 29, n. 1, p. 16–23, 2016.

FREI, K. *et al.* Connexin 26 mutations in cases of sensorineural deafness in eastern Austria. *European Journal of Human Genetics*, v. 10, n. 7, p. 427–432, 2002.

FRIEDMAN, T. B. *et al.* Recent advances in the understanding of syndromic forms of hearing loss. *Ear and Hearing*, v. 24, n. 4, p. 289–302, 2003.

FULLER, Donald R.; PIMENTEL, Jane T.; PEREGORY, Barbara M. *Anatomia e fisiologia aplicada a fonoaudiologia*. 1. ed. São Paulo: Editora Manole Ltda. 2014.

GREEN, R. C. *et al.* ACMG recommendations for reporting of incidental findings in clinical exome and genome sequencing. *Genetics in Medicine*, v. 15, n. 7, p. 565–574, 2013.

HANNIBAL, M. C. *et al.* Spectrum of MLL2 (ALR) mutations in 110 cases of Kabuki syndrome. *American Journal of Medical Genetics, Part A*, v. 155, n. 7, p. 1511–1516, 2011.

HIATT, James L; GARTNER, Leslie P. *Anatomia Cabeça & Pescoço*. 4. ed. Rio de Janeiro: EDITORA GUANABARA KOOGAN LTDA. 2011.

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

ITO, T. *et al.* Hereditary hearing loss and deafness genes in Japan. *Journal of Medical and Dental Sciences*, v. 57, n. 1, p. 1–10, 2010.

JOSHI, P R *et al.* Clinically symptomatic heterozygous carnitine palmitoyltransferase II (CPT II) deficiency. *Wiener klinische Wochenschrift* v. 124, n. 23-24 p.851-4, 2012

KAHEEL, H. *et al.* Frequency of mitochondrial m.1555A > G mutation in Syrian patients with non-syndromic hearing impairment. *BMC Ear, Nose and Throat Disorders*, v. 18, n. 1, p. 2–5, 2018.

KIMBERLING W. J. *et al.* Frequency of Usher syndrome in two pediatric populations: implications for genetic screening of deaf and hard of hearing children. *Genet Med*. v. 12, n. 8, p. 512-516, 2010.

KIMURA, R. S. The Ultrastructure of the Organ of Corti. *International Review of Cytology*. [S.l: s.n.], 1975. v. 71. p. 173–222.

KOCHHAR, A. *et al.* SIX1 mutation screening in 247 branchio-oto-renal syndrome

families: A recurrent missense mutation associated with BOR. *Human Mutation*, v. 29, n. 4, p. 565, 2008.

KOFFLER, T.; USHAKOV, K.; AVRAHAM, K. B. Genetics of Hearing Loss - Syndromic. *Otolaryngologic Clinics of North America*, v. 48, n. 6, p. 1041–1061, dez. 2015.

KOOHIYAN, M.; KOOHIAN, F.; AZADEGAN-DEHKORDI, F. GJB2-related hearing loss in central Iran: Review of the spectrum and frequency of gene mutations. *Annals of Human Genetics*, v. 84, n. 2, p. 107–113, 2020.

KORVER A. M. H. *et al.* Congenital hearing loss. *Nat Rev Dis Primers*. V. 3:16094, 2018.

KUHLENBAÜMER G. *et al* Novel genomic techniques open new avenues in the analysis of monogenic disorders. *Hum Mutat* v. 32, n. 1, p.144-151, 2011.

LEBEKO, K. *et al.* Genetics of hearing loss in Africans: Use of next generation sequencing is the best way forward. *Pan African Medical Journal*, v. 20, p. 1–14, 2015.

LEFEBVRE, P. P. *et al.* Potassium-induced release of an endogenous toxic activity for outer hair cells and auditory neurons in the cochlea: A new pathophysiological mechanism in Meniere's disease? *Hearing Research*, v. 47, n. 1–2, p. 83–93, 1990.

LEFEBVRE, P. P.; VANDEWATER, T. R. Connexins, hearing and deafness: Clinical aspects of mutations in the connexin 26 gene. *Brain Research Reviews*, v. 32, n. 1, p. 159–162, 2000.

LIMA, Y. S. *et al.* Syndromic hearing loss molecular diagnosis: Application of massive parallel sequencing *Hearing Research*, v. 370, p. 181-188, 2018.

LINDAU, T. A. *et al.* Anatomical changes and audiological profile in Branchio-otorenal syndrome: A literature review. *International Archives of Otorhinolaryngology*, v. 18, n. 1, p. 68–76, 2014.

LÖPPÖNEN, T. *et al.* Homozygous M34T mutation of the GJB2 gene associates with an autosomal recessive nonsyndromic sensorineural hearing impairment in Finnish families. *Acta Oto-Laryngologica*, v. 132, n. 8, p. 862–873, 2012.

MAJEWSKI J. *et al.* What can exome sequencing do for you? *J Med Genet* v. 48, n. 9, p. 580-589, 2011.

MARTÍN, M A *et al.* Molecular analysis in Spanish patients with muscle carnitine palmitoyltransferase deficiency. *Muscle & nerve* vol. 22, n.7 p. 941-3, 1999

MATHUR P.; YUNG J.; Usher syndrome: Hearing loss, retinal degeneration and associated abnormalities *Biochim. Biophys. Acta*, v. 1852, n. 3, p.406-420, 2014.

MEENA, R.; AYUB, M. Genetics Of Human Hereditary Hearing Impairment. *Journal of Ayub Medical College, Abbottabad : JAMC*, v. 29, n. 4, p. 671–676, 2017.

MILLER, D.T., LEE, K., CHUNG, W.K. *et al.* ACMG SF v3.0 list for reporting of secondary findings in clinical exome and genome sequencing: a policy statement of the American College of Medical Genetics and Genomics (ACMG). *Genet Med* v.23, n.1, p.1381-1390, 2021.

MOTTA, L. H. C. DA *et al.* Prevalence of the 35delG mutation in deaf South Brazilian infants submitted to cochlear implantation. *International Journal of Pediatric Otorhinolaryngology*, v. 76, n. 2, p. 287–290, 2012.

MOURÃO Jr., Carlos Alberto; ABRAMOV, Dimitri Marques. *Biofísica Essencial*. 1 ed. Rio de Janeiro: EDITORA GUANABARA KOOGAN LTDA. 2012.

NG, S. B. *et al.* Exome sequencing identifies MLL2 mutations as a cause of Kabuki syndrome. *Nature Genetics*, v. 42, n. 9, p. 790–793, 2010.

OLIVEIRA, C. A. *et al.* Allelic frequencies of the 35delG mutation of the GJB2 gene in different Brazilian regions. *Genetic Testing*, v. 11, n. 1, p. 1–3, 2007.

PETERSEN B. S. *et al.* Opportunities and challenges of whole-genome and -exome

sequencing. *BMC Genetics* v. 18,1 n. 14, 2017.

PETIT, C.; LEVILLIERS, J.; HARDELIN, J. P. Molecular genetics of hearing loss. *Annual Review of Genetics*, v. 35, p. 589–646, 2001.

PFEILSTICKER, L. N. *et al.* Resumo / Summary. v. 70, n. 2, p. 182–186, 2004.

PIATTO *et al.* Prevalence of the GJB2 mutations and the del(GJB6-D13S1830) mutation in Brazilian patients with deafness. *Hearing Research*, v. 196, n. 1–2, p. 87–93, 2004.

PIATTO *et al.* Prospects for genetic hearing loss screening: 35delG mutation tracking in a newborn population. *Jornal de Pediatria*, v. 81, n. 2, p. 139–142, 2005a.

PIATTO, V. B. *et al.* Perspectivas para triagem da deficiência auditiva genética: rastreamento da mutação 35delG em neonatos. *Jornal de Pediatria*, v. 81, n. 2, p. 139–142, 2005b.

POPEJOY A. B.; FULLERTON S. M. Genomics is failing on diversity. *Nature* v. 538, p. 161-164, 2016.

RABIONET R. *et al.* Molecular basis of childhood deafness resulting from mutations in the GJB2 (connexin 26) gene. *Hum Genet* v. 106, n. 1, p. 40-44, 1999.

READ, A. P.; NEWTON, V. E. Waardenburg syndrome. *Journal of Medical Genetics*, v. 34, n. 8, p. 656–665, 1 ago. 1997.

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

RIPPOL-VERA, T *et al.* “Clinical and Prognostic Profiles of Cardiomyopathies Caused by Mutations in the Troponin T Gene.” *Revista española de cardiología (English ed.)* v. 69, n.2, p.149-158, 2016

ROSA JÚNIOR, M. *et al.* Teaching NeuroImages: Waardenburg syndrome type 2. *Neurology*, v. 92, n. 16, p. E1935–E1936, 2019.

RUDMAN, J. R. *et al.* The genetic basis of deafness in populations of African descent. *Journal of Genetics and Genomics*, v. 44, n. 6, p. 285–294, 2017.

SAKATA H. A. *Proposta de genes relacionados à deficiência auditiva sindrômica baseada em variações do número de cópias (CNVs) e perda de heterozigose (LOH)*. Dissertação (Mestrado em Biologia Animal) - Universidade de Brasília. Brasília, p. 72. 2016.

SARTORATO, E. *et al.* Determination of the frequency of the 35delG allele in Brazilian neonates [4]. *Clinical Genetics*, v. 58, n. 4, p. 339–340, 2000.

SCHÜFFNER, R. DE O. A. *et al.* Molecular study of hearing loss in Minas Gerais, Brazil. *Brazilian Journal of Otorhinolaryngology*, v. 86, n. 3, p. 327–331, 2018.

SHANGGUAN, H. *et al.* Kabuki syndrome: Novel pathogenic variants, new phenotypes and review of literature. *Orphanet Journal of Rare Diseases*, v. 14, n. 1, p. 1–7, 2019.

SIMSEK M. *et al.*, Absence of Deafness-associated Connexin-26 (GJB2) Gene Mutations in the Omani Population. *Hum Mutat* v. 18, n. 6, p. 545-546, 2001.

SIRUGO G.; WILLIAMS S. M.; TISHKOFF S. A. The Missing Diversity in Human Genetic Studies. *Cell* v. 177, p. 26-31, 2019.

SMITH, R. J. H. Branchiootorenal Spectrum Disorder. 1999 Mar 19 [Updated 2018 Sep 6]. In: Adam MP, Ardinger HH, Pagon RA, et al., editors. GeneReviews® [Internet]. Seattle (WA): University of Washington, Seattle; 1993-2022. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1380/>

SMITH, R. J. H.; SCHWARTZ, C. BRANCHIO-OTO-RENAL SYNDROME. v. 31, p. 411–421, 1998.

SONG, J. *et al.* Hearing loss in Waardenburg syndrome: A systematic review. *Clinical*

*Genetics*, v. 89, n. 4, p. 416–425, 2016.

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

SONI, C. R.; KUMAR, G. Child Neurology: A patient with dissimilar eye color and deafness. *Neurology*, v. 74, n. 8, p. 25–27, 2010.

SWANSON, M. S. Silence Is Not Always Golden. *Genetic Testing and Molecular Biomarkers*, v. 15, n. 7–8, p. 467–467, jul. 2011.

TOMS, M.; PAGARKAR, W.; MOOSAJEE, M. Usher syndrome: clinical features, molecular genetics and advancing therapeutics. *Therapeutic Advances in Ophthalmology*, v. 12, p. 1–19, 2020.

USMAN N, SUR M. CHARGE Syndrome. [Updated 2021 Mar 6]. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2021 Jan-. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK559199/>

UZUNHAM, T. A.; AYAZ A. Homozygous exonic and intragenic NRXN1 deletion presenting as either West syndrome or autism spectrum disorder in two siblings. *Clinical Neurology and Neurosurgery*, v. 214, p. n/a

VAN CAMP, G.; WILLEMS, P. J.; SMITH, R. J. H. Nonsyndromic hearing impairment: Unparalleled heterogeneity. *American Journal of Human Genetics*, v. 60, n. 4, p. 758–764, 1997.

VETTORATO, G. *et al.* Doença de Cowden ou síndrome dos hamartomas múltiplos. *Anais Brasileiros de Dermatologia*, v. 78, n. 2, p. 209–213, 2003.

WANG, Y. R. *et al.* Kabuki syndrome: review of the clinical features, diagnosis and epigenetic mechanisms. *World Journal of Pediatrics*, v. 15, n. 6, p. 528–535, 2019.

WATSON, M. S. ACMG policy statement: Updated recommendations regarding analysis and reporting of secondary findings in clinical genome-scale sequencing. *Genetics in Medicine*, v. 17, n. 1, p. 68–69, 2015.

WEIL, D. *et al.* Defective myosin VIIA gene responsible for Usher syndrome type 1B. *Nature*, v. 374, n. 6517, p. 60–1, 1995.

WHITE SM, THOMPSON EM, KIDD A, *et al.* Growth, behavior, and clinical findings in 27 patients with Kabuki (Niikawa-Kuroki) syndrome. *Am J Med Genet A*. v.127 p.118–27, 2004

WHATLEY, M. *et al.* Usher Syndrome: Genetics and Molecular Links of Hearing Loss and Directions for Therapy. *Frontiers in genetics* v. 11, n. 565216, 2020

WILCOX, S. A. *et al.* High frequency hearing loss correlated with mutations in the GJB2 gene. *Human Genetics*, v. 106, n. 4, p. 399–405, 2000.

WORBY C. A.; DIXON J. E. PTEN *Annu Rev Biochem* v. 83, p. 641-649, 2014.

YATES, T M *et al.* “Baraitser-Winter cerebrofrontofacial syndrome.” *Clinical genetics* v. 92, n. 1 p 3-9, 2017

YEHIA L, ENG C. PTEN Hamartoma Tumor Syndrome. 2001 Nov 29 [Updated 2021 Feb 11]. In: Adam MP, Ardinger HH, Pagon RA, *et al.*, editors. GeneReviews® [Internet]. Seattle (WA): University of Washington, Seattle; 1993-2022. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1488/>

YOKOTA, Y. *et al.* Frequency and clinical features of hearing loss caused by STRC deletions. *Scientific Reports*, v. 9, n. 1, p. 1–9, 2019.

YORGASON, J. G. *et al.* Understanding drug ototoxicity: molecular insights for prevention and clinical management. *Expert Opin. Drug Saf.* v. 5, p. 383–399, 2006

## ANEXO 1 - PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP



UNB - FACULDADE DE  
CIÊNCIAS DA SAÚDE



### PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

#### DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

**Título da Pesquisa:** Desenvolvimento de diagnóstico molecular e fluxograma laboratorial para surdez não  
sindrômica de etiologia genética

**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:** 2

**CAAE:** 58055816.3.0000.0030

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

**Patrocinador Principal:** Financiamento Próprio

#### DADOS DO PARECER

**Número do Parecer:** 1.874.081

**Situação do Parecer:**

Aprovado

**Necessita Apreciação da CONEP:**

Não

**Endereço:** Faculdade de Ciências da Saúde - Campus Darcy Ribeiro

**Bairro:** Asa Norte

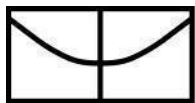
**CEP:** 70.910-900

**UF:** DF

**Município:** BRASILIA

**Telefone:** (61)3107-1947

**E-mail:** cepfsunb@gmail.com



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

O (A) Senhor(a) está sendo convidado a participar do projeto: “Desenvolvimento de diagnóstico molecular e fluxograma para deficiência auditiva não síndrômica de etiologia genética”

O objetivo desta pesquisa é desenvolver um fluxograma de testes moleculares para o paciente com deficiência auditiva e painel diagnóstico por meio do exoma direcionado para investigação de deficiência auditiva não 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 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/a 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 condição dele, permitindo precisão no seu acompanhamento e de seus familiares, desde que consentido pelo(a) senhor(a).

Informamos que o(a) 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 você e nenhum comprometimento em seu acompanhamento médico. A participação nessa pesquisa é voluntária, isto é, não há qualquer tipo de pagamento por sua colaboração. Caso solicite, o(a) senhor(a) poderá ser ressarcido(a) pelos gastos tais como transporte e alimentação no dias em que for necessária sua presença para consultas ou exames, não estando limitadas a um valor fixo nem à apresentação de comprovante. Além disso, será garantida assistência integral, gratuita, pelo tempo que for necessário e /ou indenização diante de eventuais danos 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 da amostra biológica de sangue coletada para possíveis estudos futuros. **A cada novo estudo, o Senhor(a) será contatado sobre o consentimento e participação em novo estudo mediante a assinatura de novo TCLE**. Essa amostra ficará em biorrepositório no Laboratório de Genética da Universidade de Brasília, e 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, ou Yasmin Soares de Lima, telefone: (61) 98122-0531, havendo possibilidade de ligação a cobrar.

Este projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade de Brasília. Este comitê é uma instância colegiada, constituída pela instituição em respeito às normas da Resolução nº 466/12 do Conselho Nacional de Saúde e tem como objetivo gerir a ética em pesquisa realizada na instituição Universidade de Brasília, assumindo a responsabilidade pelas decisões sobre

a ética da pesquisa a ser desenvolvida, fomentando a reflexão em torno da ética na ciência. O Comitê tem caráter inter e transdisciplinar, contando com a participação de profissionais da área biomédica, das ciências sociais e humanas e usuários do sistema de saúde.

As dúvidas com relação à assinatura do TCLE ou os direitos do sujeito da pesquisa podem ser obtidos através do telefone: (61) 3107-1947 ou pelo e-mail cepfsunb@gmail.com ou ainda no seguinte endereço: Faculdade de Ciências da Saúde, Campus Darcy Ribeiro, Universidade de Brasília, Brasília/DF, CEP: 70.904-970 durante os horários 10:00hs às 12:00hs e 13:30hs às 15:30hs de segunda a sexta.

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

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

---

Nome / responsável legal

---

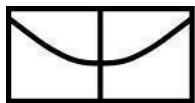
Silviene Fabiana de Oliveira

\_\_\_\_\_, \_\_\_\_ 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



---

*Desenvolvimento de diagnóstico molecular e fluxograma para deficiência auditiva não síndrômica de etiologia genética*

---

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

O (A) seu filho(a) ou dependente está sendo convidado a participar do projeto: “Desenvolvimento de diagnóstico molecular e fluxograma para deficiência auditiva não síndrômica de etiologia genética”

O objetivo desta pesquisa é desenvolver um fluxograma de testes moleculares para o paciente com deficiência auditiva e painel diagnóstico por meio do exoma direcionado para investigação de deficiência auditiva não síndrômica .

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

A 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 seu dependente venha a se beneficiar dos resultados deste projeto, a partir dos resultados dos exames laboratoriais de forma a identificar os genes relacionados a condição dele, permitindo precisão no seu acompanhamento e de seus familiares, desde que consentido pelo senhor(a) e assentido por ele(a).

Informamos que o seu dependente 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 ele(a) e nenhum comprometimento em seu acompanhamento médico. A participação nessa pesquisa é voluntária, isto é, não há qualquer tipo de pagamento por sua colaboração. Caso solicite, o senhor(a) poderá ser ressarcido(a) pelos gastos tais como transporte e alimentação no dias em que for necessária sua presença para consultas ou exames, não estando limitadas a um valor fixo nem à apresentação de comprovante. Além disso, será garantida assistência integral, gratuita, pelo tempo que for necessário e /ou indenização diante de eventuais danos 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 da amostra biológica de sangue coletada para possíveis estudos futuros. **A cada novo estudo, o Senhor(a) será contatado sobre o consentimento e participação em novo estudo mediante a assinatura de novo TCLE** . Essa amostra ficará em biorrepositório no Laboratório de Genética da Universidade de Brasília, e apresentará uma codificação alfanumérica e só poderá ser manuseada pelos indivíduos diretamente relacionados com o projeto.

Se o (a) Senhor (a) ou seu dependente tiverem qualquer dúvida em relação à pesquisa, por favor, telefone para: Dra. Silviene Fabiana de Oliveira, na Universidade de Brasília, telefone: (61) 3107-3079, ou Yasmin Soares de Lima, telefone: (61) 98122-0531, havendo possibilidade de ligação a cobrar.

Este projeto foi Aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade de Brasília. Este comitê é uma instância colegiada, constituída pela instituição em respeito às normas da Resolução nº 466/12 do Conselho

Nacional de Saúde e tem como objetivo gerir a ética em pesquisa realizada na instituição Universidade de Brasília, assumindo a responsabilidade pelas decisões sobre a ética da pesquisa a ser desenvolvida, fomentando a reflexão em torno da ética na ciência. O Comitê tem caráter inter e transdisciplinar, contando com a participação de profissionais da área biomédica, das ciências sociais e humanas e usuários do sistema de saúde.

As dúvidas com relação à assinatura do TCLE ou os direitos do sujeito da pesquisa podem ser obtidos através do telefone: (61) 3107-1947 ou pelo e-mail cepfsunb@gmail.com ou ainda no seguinte endereço: Faculdade de Ciências da Saúde, Campus Darcy Ribeiro, Universidade de Brasília, Brasília/DF, CEP: 70.904-970 durante os horários 10:00hs às 12:00hs e 13:30hs às 15:30hs de segunda a sexta.

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

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

---

Nome / responsável legal

---

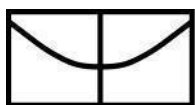
Silviene Fabiana de Oliveira

\_\_\_\_\_, \_\_\_\_ 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



## **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 5 – PROTOCOLO DE EXTRAÇÃO DE DNA**

### **Extração de DNA pelo método Puregene ([www.puregene.com](http://www.puregene.com))**

---

#### **Solução de Lise RBC**

5 mM MgCl<sub>2</sub>

1 mM EDTA pH 8,0

#### **Solução de Lise Celular**

10 mM Tris pH 7,5

1 mM EDTA pH 8,0

1% SDS

#### **Solução de Precipitação de Proteína**

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

57,81g de acetato de amônia

Completar para 100mL de H<sub>2</sub>O destilada

#### **RBC**

0,5 ml MgCl<sub>2</sub> 1 M

0,2 ml EDTA 0,5 M

Completar para 100mL de H<sub>2</sub>O destilada

#### **CLS**

1 ml Tris 1 M

0,2 ml EDTA 0,5 M

10 ml SDS 10%

Completar para 100mL de H<sub>2</sub>O destilada

### **Outros Agentes Utilizados**

Isopropanol 100%

Etanol 70%

Tampão TE 1X

### **Etapa 1 – Lise Celular**

---

1. Adicionar 3 ml de sangue total a um tubo *falcon* de 15 ml contendo 9 ml da solução de lise RBC. Inverter o tubo e incubar a temperatura ambiente por 10 minutos. Inverter pelo menos uma vez mais durante a incubação;
2. Centrifugar por 10 minutos a 3400 rpm (2000g). Remover o sobrenadante deixando um pellet visível de células brancas e 100-200 µl de líquido residual;
3. Vortexar o tubo vigorosamente para ressuspender as células brancas no supernadante residual, o que facilita em muito a lise na etapa seguinte;
4. Adicionar 3 ml da solução de lise celular ao tubo contendo as células ressuspensas e misturar com pipeta de transferência diversas vezes até a solução ficar homogênea. Após misturar, nenhum resíduo celular (ou aglomerado de células) deve ser visível. Se houverem resíduos, incubar a 37°C até a solução ficar homogênea. A amostra é estável se armazenada nessa solução a temperatura ambiente por 18 meses.

### **Etapa 2 – Precipitação da Proteína**

---

1. Resfriar a amostra até a temperatura ambiente;
2. Adicionar 1 ml da solução de precipitação de proteína ao lisado celular;
3. Vortexar vigorosamente por 20 segundos para misturar a solução uniformemente com o lisado celular;
4. Centrifugar a 3400 rpm por 10 minutos. As proteínas precipitadas formarão um pellet marrom escuro e compacto;

### **Etapa 3 – Precipitação do DNA**

---

1. Transferir o sobrenadante contendo o DNA para um tubo *falcon* de 15 ml contendo 3 ml de isopropanol 100%;
2. Inverter o tubo lentamente cerca de 50 vezes até que apareçam os “novelos” de DNA;
3. Centrifugar a 3400 rpm por 3 minutos, o DNA será visível como um pellet branco pequeno;
4. Retirar o sobrenadante e drenar o tubo em papel absorvente. Adicionar 3 ml de etanol 70%. Inverter o tubo várias vezes para lavar o pellet de DNA;
5. Centrifugar a 3400 rpm por 1 minuto. Retirar o sobrenadante cuidadosamente. O pellet poderá estar solto, por isso é preciso inverter o tubo lenta e cuidadosamente para não perdê-lo;
6. Drenar o tubo em papel absorvente e deixar a amostra “secar” a temperatura ambiente por 15 minutos;

#### **Etapa 4 – Hidratação do DNA**

---

1. Adicionar 200-250µl de tampão TE 1X (ou água) que resulta em uma concentração aproximada de 400 µg/µl. Deixar o DNA hidratar neste tampão a temperatura ambiente por 12-24 horas ou alternativamente, incubar o DNA a 65° C por 1 hora;
2. Armazenar o DNA a 2-8° C;

**ANEXO 6 – AVALIAÇÃO QUANTITATIVA E QUALITATIVA DAS AMOSTRAS DE DNA (utilizando o sistema *NanoDrop*<sup>TM</sup> 2000 - *Thermo Scientific*)**

Amostra	[ ] ng	260/280	260/230
DA_01	1017	1,87	2,06
DA_03	696	1,80	1,58
DA_04	435	1,82	1,34
DA_05	114	1,80	1,64
DA_06	559	1,84	1,54
DA_07	860	1,86	1,95
DA_08	351	1,87	1,53
DA_09	348	1,80	1,26
DA_10	336	1,83	1,39
DA_11	507	1,87	1,69
DA_12	286	1,78	1,09
DA_13	506	1,84	1,48
DA_15	338	1,89	1,88
DA_16	182	1,88	1,65
10581	959	1,81	1,69
10598	1067	1,86	1,89
10727	1002	1,84	1,83
10765	-	-	-
10921	521	1,85	1,75
10941	607	1,82	1,70
10970	835	1,84	2,01
11024	403	1,96	1,78
11089	278	1,86	1,55
11178	690	1,88	1,73
11284	1090	1,84	1,89

11289	769	1,84	1,99
11294	618	1,82	1,55

---

## ANEXO 7 – PAINEL: GENES D.A.

Em verde destacam-se os genes associados a deficiência auditiva não síndrômica; em laranja os associados a deficiência auditiva síndrômica; em **negrito** destacam-se os genes associados a deficiência auditiva síndrômica e não síndrômica; em sublinhado destacam-se os genes associados a deficiência auditiva ligada ao X.

<u>AIFM1</u>	<b>COL11A2</b>	<i>GAB1</i>
<u>PRPS1</u>	<i>COMT2</i>	<i>GIPC3</i>
<b>ACTG1</b>	<i>CRYM</i>	<b>GJA1</b>
<i>ADCY1</i>	<i>DCDC2</i>	<i>GJB2</i>
<i>BDNF</i>	<i>DFNA5</i>	<i>GJB3</i>
<i>BDP1</i>	<b>DFNB31</b>	<i>GJB6</i>
<b>BSND</b>	<i>DFNB59</i>	<i>GPSM2</i>
<i>CABP2</i>	<i>DIABLO</i>	<i>GRAP</i>
<i>CCDC50</i>	<i>DIAPH1</i>	<i>GRHL2</i>
<i>CD164</i>	<i>DIAPH3</i>	<i>GRXCR1</i>
<i>CDC14A</i>	<i>DSPP</i>	<i>GRXCR2</i>
<b>CDH23</b>	<i>DMXL2</i>	<i>GSDME</i>
<i>CEACAM16</i>	<i>ELMOD3</i>	<i>HGF</i>
<b>CIB2</b>	<i>EPS8</i>	<i>HOMER2</i>
<i>CLDN9</i>	<i>EPS8L2</i>	<i>IFNLR1</i>
<i>CLDN14</i>	<i>ESPN</i>	<i>ILDRI</i>
<i>CLIC5</i>	<i>ESRP1</i>	<i>KARS</i>
<i>COCH</i>	<i>ESRRB</i>	<i>KCNQ4</i>
<u><b>COL4A6</b></u>	<i>EYA4</i>	<i>KITLG</i>
<b>COL11A1</b>	<i>FAM65B</i>	<i>LHFPL5</i>

<i>LMX1A</i>	<i>OTOGL</i>	<i>SLC26A5</i>
<i>LOXHD1</i>	<i>P2RX2</i>	<b><i>SLITRK6</i></b>
<i>LRTOMT</i>	<b><i>PCDH15</i></b>	<i>SMAC</i>
<i>MARVELD2</i>	<i>PDE1C</i>	<u><i>SMPX</i></u>
<i>MCM2</i>	<b><i>PDZD7</i></b>	<i>SPNS2</i>
<i>MET</i>	<i>PJKK</i>	<i>STRC</i>
<i>MIR96</i>	<i>PLS1</i>	<i>SYNE4</i>
<i>MT-CO1</i>	<i>PNPT1</i>	<i>TBC1D24</i>
<i>MT-RNR1</i>	<u><i>POU3F4</i></u>	<i>TECTA</i>
<i>MT-TS1</i>	<i>POU4F3</i>	<i>TJP2</i>
<i>MPZL2</i>	<i>PPIP5K2</i>	<i>TMC1</i>
<i>MSRB3</i>	<u><i>PRPS1</i></u>	<i>TMEM132E</i>
<b><i>MYH9</i></b>	<i>PTPRQ</i>	<i>TMIE</i>
<i>MYH14</i>	<i>RDX</i>	<i>TMPRSS3</i>
<i>MYO1A</i>	<i>RIPOR2</i>	<i>TNC</i>
<i>MYO3A</i>	<i>REST</i>	<i>TPRN</i>
<i>MYO6</i>	<i>ROR1</i>	<i>TRIOBP</i>
<b><i>MYO7A</i></b>	<i>S1PR2</i>	<i>TRRAP</i>
<i>MYO15A</i>	<i>SCD5</i>	<i>TSPEAR</i>
<i>NARS2</i>	<i>SERPINB6</i>	<b><i>USH1C</i></b>
<b><i>NLRP3</i></b>	<b><i>SIX1</i></b>	<i>WBP2</i>
<i>OSBPL2</i>	<i>SLC12A2</i>	<b><i>WFS1</i></b>
<i>OTOA</i>	<i>SLC17A8</i>	<b><i>WHRN</i></b>
<i>OTOF</i>	<i>SLC22A4</i>	<b><i>ABHD12</i></b>
<i>OTOG</i>	<b><i>SLC26A4</i></b>	<b><i>ADGRV1</i></b>

<i>ALMS1</i>	<i>ERAL1</i>	<i>POLR1C</i>
<i>ANKH</i>	<i>EYA1</i>	<i>POLR1D</i>
<i>ATP6V1B1</i>	<i>FGF3</i>	<i>SALL1</i>
<i>BCS1L</i>	<i>FOXI1</i>	<i>SANS</i>
<i>BTD</i>	<i>GATA3</i>	<i>SEMA3E</i>
<i>C10orf2</i>	<i>GPR98</i>	<i>SIX5</i>
<i>CACNA1D</i>	<i>HARS</i>	<i>SLC19A2</i>
<i>CD151</i>	<i>HARS2</i>	<i>SLC52A2</i>
<i>CDKN1C</i>	<i>HOXB1</i>	<i>SLC52A3</i>
<i>CHD7</i>	<i>HSD17B4</i>	<i>SMAD4</i>
<i>CHSY1</i>	<i>KCNE1</i>	<i>SNAI2</i>
<i>CLPP</i>	<i>KCNJ10</i>	<i>SOX10</i>
<i>CLRN1</i>	<i>KCNQ1</i>	<i>TCOF1</i>
<i>COL2A1</i>	<i>KIT</i>	<i>TFAP2A</i>
<i>COL4A3</i>	<i>LARS2</i>	<i>TIMM8A</i>
<i>COL4A4</i>	<i>LRP2</i>	<i>TWNK</i>
<i>COL4A5</i>	<i>MAN2B1</i>	<i>TYR</i>
<i>COL9A1</i>	<i>MANBA</i>	<i>USH1G</i>
<i>COL9A2</i>	<i>MGP</i>	<i>USH2A</i>
<i>COL9A3</i>	<i>MITF</i>	<i>VCAN</i>
<i>DCAF17</i>	<i>NDP</i>	<i>VLGR1</i>
<i>DLX5</i>	<i>PAX3</i>	
<i>DNMT1</i>	<i>PEX1</i>	
<i>EDN3</i>	<i>PEX6</i>	
<i>EDNRB</i>	<i>PEX26</i>	