



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE GENÉTICA E MORFOLOGIA
Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal



**PROPOSTA DE DIAGNÓSTICO MOLECULAR PARA PACIENTES
DE BOCA DA MATA (ALAGOAS) COM DEFICIÊNCIA AUDITIVA**

Marcela de Carvalho Campos
Orientadora: Prof. Dra. Silviene Fabiana de Oliveira
Brasília, 2021



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE GENÉTICA E MORFOLOGIA
Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal



**PROPOSTA DE DIAGNÓSTICO MOLECULAR PARA PACIENTES
DE BOCA DA MATA (ALAGOAS) COM DEFICIÊNCIA AUDITIVA**

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

Brasília, 2021

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora, professora Dra. Silviene Fabiana de Oliveira, que sempre me recebeu com todo o carinho em todas as vezes que pedi estágios e um projeto de pós-graduação e participou ativamente na captação de dados clínicos dos pacientes. À professora Dra. Juliana Forte Mazzeu, que me ajudou imensamente nas análises necessárias e acabou se tornando uma co-orientadora não oficial. Eu não teria conseguido nem começar esse projeto sem vocês!

À UNB e ao IB, que mais uma vez me acolheram como discente. À coordenação do PPG BioAni, que foi imprescindível para que o projeto pudesse continuar mesmo durante a pandemia. Às agências de fomento a pesquisa, em especial à CAPES pela bolsa de mestrado e ao PPSUS/FAPDF pelo financiamento do projeto.

Aos pacientes e seus familiares, que aceitaram participar do projeto. Vocês são o motivo de ele existir!

À UNCISAL e à toda a equipe que trabalhou na coleta de dados clínicos e amostras dos pacientes: à fonoaudióloga Myllena dos Santos Cavalcante, à fonoaudióloga Ma. Luciana Castelo Branco Camurça Fernandes, à psicóloga e psicopedagoga Ma. Maria Genelva Almeida Costa e, em especial, à professora Dra. Pollyana Almeida Costa dos Santos, que fez a ponte entre a população de Boca da Mata, a UNCISAL e a UNB. Nesse contexto, agradeço também às Secretarias de Saúde e Educação da prefeitura de Boca da Mata pelo apoio e disponibilização da Unidade Básica de Saúde como local de atendimento dos pacientes participantes e seus familiares.

Ao Laboratório Sabin, onde foi feito o sequenciamento direcionado das amostras dos pacientes. Em especial ao Dr Gustavo Barcelos Barra que propôs e coordenou essa colaboração. Obrigada pela parceria e disponibilidade em ajudar sempre!

À toda a equipe dos Laboratório de Genética do IB e da FS: professores, técnicos e funcionários. Aos professores que eu tive ao longo dessa fase, que me ajudaram a construir a base intelectual que eu precisava.

Aos meus colegas-amigos de laboratório Lari, Yasmin, Rapha, Carol, Fabíola, Duarth, Matheus, Samyra, Wesley e Lu. Obrigada pela amizade e troca de experiência!

Aos meus amigos que sempre estiveram presentes, independente da distância e que sempre me apoiaram, independente de qual fosse minha escolha: Mari (Mathias), Mari (Berti), Duds, Rafa, Fê, Lari, Camis, Sira, Pri, Zaira, Lorena.

Ao meu pai, João, à minha mãe Liane e ao meu irmão João Pedro. Eu realmente não estaria aqui sem vocês. Obrigada por serem sempre minha fortaleza e estarem comigo em todas as minhas empreitadas.

À minha família “extra”: minha sogra Alessandra, meu sogro Marcelo e minha cunhada Rafa, que sempre estão dispostos a me ajudar de qualquer forma possível.

E ao meu namorado Henrique, que está sempre ao meu lado incondicionalmente, meu parceiro de todos os momentos. Muito obrigada por todo o carinho, amor, cuidado, compaixão, compreensão, dedicação e paciência.

RESUMO

A deficiência auditiva é considerada o distúrbio sensorial mais comum, atingindo, de acordo com a Organização Mundial de Saúde, cerca de 6,1% da população mundial, considerando todos os tipos de perda auditiva e em todos os níveis. Estima-se que 50% a 60% dos casos de surdez apresentem etiologia genética, porém, em decorrência da diversidade de características clínicas e de genes envolvidos, o diagnóstico molecular preciso torna-se um desafio. Assim, tecnologias como o sequenciamento de nova geração (NGS) têm sido utilizadas para facilitar a obtenção do diagnóstico molecular. De acordo com o censo de 2010 do IBGE, 0,18% dos brasileiros declaram não ouvir nenhum som, contudo foi observado que na cidade de Boca da Mata (Alagoas) essa frequência se eleva para cerca de 0,34%. Dessa forma, o objetivo desse trabalho foi investigar o porquê de uma diferença tão significativa na média de deficientes auditivos entre o Brasil e Boca da Mata. A hipótese principal que norteou esse trabalho é que os deficientes auditivos dessa cidade são aparentados e que apresentam uma mesma mutação, seja esta já descrita ou não. A hipótese alternativa é que os indivíduos sejam não aparentados e que diversas mutações estejam presentes na cidade ou até mesmo questões ambientais estejam envolvidas. Foram coletadas amostras de DNA de 15 pacientes de Boca da Mata, sendo que oito apresentam outros casos de surdez na família. As amostras foram submetidas a análise por NGS de um painel com cerca de 200 genes selecionados (exoma direcionado à deficiência auditiva) e sequenciamento de exoma completo. Foram encontradas cinco diferentes mutações nos genes *MYO7A*, *KCNQ4*, *COL4A3* e *MYO15A* com sugestão de causativas de deficiência auditiva em seis dos 15 pacientes, refutando a hipótese principal.

Palavras-chave: deficiência auditiva, diagnóstico molecular, sequenciamento, NGS, Boca da Mata

ABSTRACT

Hearing impairment is the most common sensorial disorder, affecting about 6,1% of the global population, according to WHO (2020), considering all kinds of hearing loss. It's estimated that 50% to 60% of the hearing loss cases are due to genetic causes, however because of the large diversity of clinical characteristics and genes involved, reaching a molecular diagnosis is a challenge. Thereby, NGS technologies are been widely applied to facilitate the achievement of a diagnosis. According to the IBGE 2010 census, the incidence of people who declare not hear any sound in Brazil is 0,18%, however in the city of Boca da Mata (Alagoas) the frequency is higher, reaching 0,34% of the local population. Therefore, this project aimed to find out why there is such a discrepancy between the rate of people affected by hearing impairment in Brazil and Boca da Mata. The main hypothesis is that the individuals are related and share the same mutation responsible for the impairment. Although there is the alternative hypothesis that the individuals are not related and different mutations or even environment issues are the cause of their deafness. Samples of 15 patients from Boca da Mata were collected, eight of them reported other cases of hearing loss within relatives. The samples underwent sequencing of 200 specific genes associated with hearing loss and whole exome sequencing. Five genetic variants in the genes *MYO7A*, *KCNQ4*, *COL4A3* and *MYO5A* possibly responsible for the hearing disorder were found in six of the 15 patients, refuting the main hypothesis.

Palavras-chave: hearing loss, molecular diagnosis, sequencing, NGS, Boca da Mata

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Anatomia da orelha, com suas divisões em OE, OM e OI. Imagem adaptada a partir de imagem de Silverthorn (2017).....2
- Figura 2.** Morfologia da cóclea (A) e do órgão de Corti (B). Imagem adaptada a partir de imagem de Silverthorn (2017).....3
- Figura 3.** Esquema de uma célula ciliada do órgão de Corti durante estímulo mecânico provocado pela onda sonora, gerando potencial de ação nos nervos auditivos. Imagem adaptada a partir de imagem de Silverthorn (2017).....6
- Figura 4.** Esquema da construção da biblioteca de sequenciamento, desde a fragmentação da amostra de DNA, até a adição dos adaptadores às pontas 3' e 5' de cada fragmento. Imagem adaptada a partir de imagem de “*An introduction to next-generation sequencing technology*” (Illumina, 2017).....11
- Figura 5.** Etapas para construção dos clusters. Imagem adaptada a partir de imagem de “*An introduction to next-generation sequencing technology*” (Illumina, 2017).....12
- Figura 6.** Esquema do sequenciamento por síntese, que gera os *reads*. Um *primer* é anelado ao adaptador livre e à medida que nucleotídeos marcados com fluorescência são incorporados à sequência, o sinal fluorescente específico para cada nucleotídeo é emitido. Como *clusters* diferentes possuem várias cópias de fragmentos diferentes, são gerados inúmeros *reads*, o que diminui a chance de ter espaços não mapeados do genoma. Imagem adaptada a partir de imagem de “*An introduction to next-generation sequencing technology*” (Illumina, 2017).....13
- Figura 7.** Na leitura *paired-end*, além de um *primer* se anelar ao adaptador livre do fragmento, outro também se anela àquela sequência que fixa o fragmento à célula de fluxo (P5 ou P7) e então o sequenciamento por síntese ocorre a partir das duas pontas. Em 7A, estão representados os dois *reads* gerados pela leitura *paired-end*, que são dispostos de maneira a formar um par de leitura. Nota-se que existe uma porção entre eles que é desconhecida, que pode ser menor ou maior dependendo do tamanho pré-estabelecido para o *read*. A figura 7B mostra os pares de *reads* de quatro fragmentos diferentes alinhados. Pode-se perceber que a porção desconhecida de um fragmento é mapeada por um dos *reads* de outro fragmento, diminuindo a porcentagem de áreas não mapeadas. Outra vantagem é que são gerados mais *reads* em metade do tempo quando comparado à leitura *single-end*. Imagem adaptada a partir de imagem de “*An introduction to next-generation sequencing technology*” (Illumina, 2017).....13
- Figura 8.** Representação do alinhamento dos *reads* ao genoma de referência, quando é possível identificar se há diferenças com a sequência estudada. Geralmente existem algumas discrepâncias entre os *reads*, como mostrado na imagem na qual um *read* apresenta a mesma base nitrogenada que o genoma de referência, enquanto os demais apresentam outra. Por isso é necessário considerar a cobertura da região analisada, isto é, quantos *reads* foram gerados e em quantos deles a variante aparece para determinar se a

informação é confiável. Imagem adaptada a partir de imagem de “*An introduction to next-generation sequencing technology*” (Illumina, 2017).....14

- Figura 9.** Heredogramas das famílias de Boca da Mata com casos de surdez aparentemente não esporádicos construídos a partir de informações fornecidas pelos pacientes e seus familiares.....33
- Figura 10.** Variante c.5300C>T/p.(Ser1767Leu) identificada no gene *MYO7A* do indivíduo ALS013. A proporção entre *reads* com a variante ancestral e mutante indicam heterozigose. Imagem gerada pelo programa IGV - *Integrative Genomes Viewers*.....35
- Figura 11.** Variante c.1630A>T/p.(Asn544Tyr) identificada no gene *MYO7A* do indivíduo ALS029. A proporção entre *reads* com a variante ancestral e mutante indicam heterozigose. Imagem gerada pelo programa IGV - *Integrative Genomes Viewers*.....36
- Figura 12.** Esquema de estrutura da Miosina VIIa. Porção C-terminal está descrita como domínio motor ou “cabeça”, seguida da região regulatória (pescoço) e a porção C-terminal ou “cauda”, contendo alguns domínios que se ligam a proteínas ou membranas. Imagem adaptada a partir de imagem de Xiao et al. (2016).....37
- Figura 13.** Microscopia eletrônica de varredura mostrando (A) os os feixes ciliares distribuídos na superfície das células ciliadas da cóclea e (B) uma maior ampliação, detalhando sua estrutura em escada. Imagens A e B adaptadas de Schwander et al. (2010) e Hertzano et al. (2008).....38
- Figura 14.** Esquema do filamento de ligação (*tip-link*), mostrando os componentes envolvidos no mecanismo de transdução. Imagem adaptada a partir de imagem de Grati & Kachar (2011).....39
- Figura 15.** Esquema mostrando a diferença de tamanho entre um estereocílio normal e um estereocílio com ausência de miosina VIIa, no qual há crescimento exacerbado, uma vez que essa proteína transporta ao estereocílio a proteína inibidora de polimerização do filamento de actina, *twinfilin-2*. Imagem adaptada a partir de imagem de Prosser et al (2008).....40
- Figura 16.** Esquema apresentando em quais domínios proteicos da miosina VIIa as variantes Asn544Tyr (ALS029) e Ser1767Leu (ALS013) são encontradas. Imagem adaptada a partir de imagem de Yamamoto et al (2020).....41
- Figura 17.** Variante identificada em heterozigose no paciente ALS19. A quantidade de *reads* com a base ancestral e com base derivada sinalizam heterozigose para o locus. Imagem gerada pelo programa IGV - *Integrative Genomes Viewers*.....43
- Figura 18.** Esquema de célula ciliada com canal de K⁺ formado por subunidades Kv7.4 em destaque, mostrando sua localização entre a célula ciliada e a célula de suporte. Imagem adaptada a partir de imagem de Willems (2008).....44

- Figura 19.** Esquema representando como os domínios proteicos de uma subunidade Kv7.4 estão distribuídos na membrana da célula ciliada. Imagem adaptada a partir de imagem de Mehregan et al (2019).....**45**
- Figura 20.** Figura representativa de um canal de K⁺ formado pela interação de quatro subunidades Kv7.4, representadas nas cores azul, amarelo, rosa e verde. Além de mostrar a ligação da calmodulina nos elementos A e B, a formação do dímero através da interação entre as subunidades azul e amarela e o tetrâmero formado pela interação entre as quatro subunidades. Imagem adaptada a partir de imagem de Haitin & Attali (2008).....**46**
- Figura 21.** Variante c.3829G>A/p.(Gly1277Ser) identificada no gene *COL4A3* do indivíduo ALS031. A proporção entre *reads* com a variante ancestral e mutante indicam heterozigose. Imagem gerada pelo programa IGV - *Integrative Genomes Viewers*.....**48**
- Figura 22.** Esquema da construção da supraestrutura em malha do colágeno tipo IV. Três monômeros de cadeia α do colágeno tipo IV se unem pelos seus domínios NC1 e enrolam-se para formar um protômero em tripla-hélice, que se une a outro protômero idêntico também pelo domínio NC1, esse dímero se junta a outros três dímeros pelo domínio 7S, formando um tetrâmero que interage com outros tetrâmeros para construir a supraestrutura do colágeno tipo IV. Imagem adaptada a partir de imagem de Kalluri (2003).....**51**
- Figura 23.** Variante identificada em homozigose no paciente ALS033. Observe que todos os *reads* apresentam a base derivada, sinalizando homozigose para o locus. Imagem gerada pelo programa IGV - *Integrative Genomes Viewers*.....**56**
- Figura 24.** Esquema mostrando a diferença de tamanho entre um estereocílio normal e um estereocílio com ausência de miosina 15A, no qual há crescimento abaixo do esperado, uma vez que essa proteína transporta ao estereocílio a proteína precursora de polimerização do filamento de actina, *whirlin*. Imagem adaptada a partir de imagem de Prosser et al (2008).....**57**

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Classificação da deficiência auditiva de acordo com seu tipo, idade de início e grau de severidade.....	7
Tabela 2. Comparação entre as populações de Boca da Mata, Alagoas e Brasil em relação à frequência de pessoas que declaram não ouvir nenhum som.....	16
Tabela 3. Identificação dos pacientes de Boca da Mata (Alagoas) com deficiência auditiva e seus respectivos parentes que tiveram amostra coletada.....	21
Tabela 4. Critérios estabelecidos pela ACMG para interpretação e classificação de variantes de acordo com patogenicidade. Tabela adaptada a partir de tabela de Richards et al. (2015)	26
Tabela 5. Regras de combinações de critérios para classificação das variantes de acordo com a ACMG. Tabela adaptada de Richards et al (2015).....	28
Tabela 6. Informações obtidas a partir de entrevistas com os probandos ou seus responsáveis quanto a consanguinidade, início dos sintomas, outros parentes afetados e outras doenças na família.....	31
Tabela 7. Variantes genéticas potencialmente causativas de deficiência auditiva em pacientes de Boca da Mata (AL). Os critérios estabelecidos pela ACMG (Tabela 4) que foram atingidos e suas respectivas classificações de acordo com a patogenicidade foram checados no Varsome.....	34
Tabela 8. Frequência do alelo mutante (A) em diversas populações de acordo com o GnomAD.*	56

LISTA DE ABREVIACOES

ACMG	<i>American College of Medical Genomics</i>
ATP	<i>Adenosine Triphosphate</i> (trifosfato de adenosina)
BEN	<i>Benign</i> (benigna)
CCE	Célula Ciliada Externa
CCI	Célula Ciliada Interna
CEP	Comissão de tica em Pesquisa
CNVs	<i>Copy Number Variations</i> (variao de número de cópias)
DA	Deficiência Auditiva
dB	Decibéis
DFNA11	Surdez Autossômica Dominante 11
DFNA2A	Surdez Autossômica Dominante 2A
DFNB3	Surdez Autossômica Recessiva 3
DNA	cido Desoxirribonucleico
EDTA	Ethylenediamine tetracetic acid (cido etilenodiamino tetra-acético)
GATK	<i>Genome Analysis Toolkit</i>
HET	Heterozigoto
HOM	Homozigoto
Hz	Hertz
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
INAGEMP	Instituto Nacional de Genética Médica Populacional
LB	<i>Likely Benign</i> (provavelmente benigna)
LP	<i>Likely Pathologic</i> (provavelmente patogênica)
MPS	<i>Massively Parallel Sequencing</i> (sequenciamento paralelo em massa)
NA	Não se Aplica
NGS	<i>Next Generation Sequencing</i> (sequenciamento de nova gerao)
OE	Orelha Externa
OI	Orelha Interna
OM	Orelha Média
OMS	Organizao Mundial da Saúde
PAT	<i>Pathogenic</i> (patogênica)
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
PGH	Programa Genoma Humano
RTA	<i>Real Time Analysis</i> (análise em tempo real)
SA	Síndrome de Alport
SBS	<i>Sequencing By Synthesis</i> (sequenciamento por síntese)
SI	Sem Informao
SNC	Sistema Nervoso Central
SRC	Síndrome da Rubéola Congnita
TCLE	Termo de Consentimento de Livre e Esclarecimento
UNB	Universidade de Brasília

UNCISAL Universidade Estadual de Ciências da Saúde de Alagoas
VUS *Variant of Uncertain Significance* (variante de significado incerto)
WES *Whole Exome Sequencing* (sequenciamento de exoma completo)
WGS *Whole Genome Sequencing* (sequenciamento de genoma completo)

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
1.1 Anatomia da orelha	1
1.2 Fisiologia da audição	5
1.3 Deficiência auditiva	6
1.4 Sequenciamento genômico e diagnóstico molecular	9
1.5 Deficiência auditiva na cidade de Boca da Mata (Alagoas)	15
2. JUSTIFICATIVA	18
3. OBJETIVOS	19
3.1 Objetivo Geral	19
3.2 Objetivos Específicos	19
4. MATERIAIS E MÉTODOS	20
4.1 Amostragem	20
4.2 Testes Audiológicos	22
4.3 Sequenciamento <i>Inherited Disease Panel</i>	23
4.4 Exoma completo	25
4.5 Anotação e classificação de variantes	25
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	30
5.1 Avaliações clínicas	30
5.2 Busca da etiologia genética - mutações causativas	34
5.2.1 ALS013 e ALS029	35
5.2.2 ALS019	42
5.2.3 ALS031	47
5.2.4 ALS033 e ALS038	55
6. CONCLUSÃO	59
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	60
ANEXO A - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido	67
ANEXO B - Questionário Clínico	70
ANEXO C - Genes sequenciados no <i>Inherited disease panel</i> relacionados com deficiência auditiva	75

1. INTRODUÇÃO

A audição é um sentido de extrema importância social, pelo qual nos conectamos ao ambiente e a outras pessoas. O processo da audição é extremamente complexo e depende do bom funcionamento de diversos genes, proteínas, células e tecidos da orelha e do sistema nervoso central (SNC), onde é interpretado. O mau funcionamento de qualquer parte desses sistemas pode acarretar em perda auditiva, por isso existe uma grande diversidade de causas para a deficiência auditiva (DA) (Silverthorn, 2017). Sendo assim, para uma melhor compreensão da deficiência auditiva e de um diagnóstico molecular de DA, é relevante compreender a morfologia e fisiologia por trás do processo de audição, bem como os aspectos clínicos e histórico familiar do deficiente auditivo.

1.1 Anatomia da orelha

A orelha é a estrutura responsável por captar as ondas sonoras do ambiente e transmiti-las aos nervos, que vão levá-las ao cérebro, onde serão interpretadas em forma de som. É dividida em três partes: orelha externa (OE), média (OM) e interna (OI) (Figura 1). A OE é constituída pelo pavilhão auricular (ou aurícula) e pelo canal auditivo (ou meato acústico externo) e é separada da OM pela membrana timpânica. Essa é a estrutura que recebe a onda sonora do ambiente que vai percorrer o canal auditivo até chegar ao tímpano, promovendo sua vibração. A OM, compreende os ossículos auditivos, ligados uns aos outros em uma sequência: martelo, fixado ao tímpano, bigorna e estribo, ligado à janela oval (membrana entre a OM e a OI). Na OM também está localizada a tuba auditiva, conectando a orelha à faringe. Tanto a OE quanto a OM são localizadas em cavidades com ar. Já a OI, acomoda a cóclea, responsável por transduzir o estímulo sonoro para os nervos auditivos.

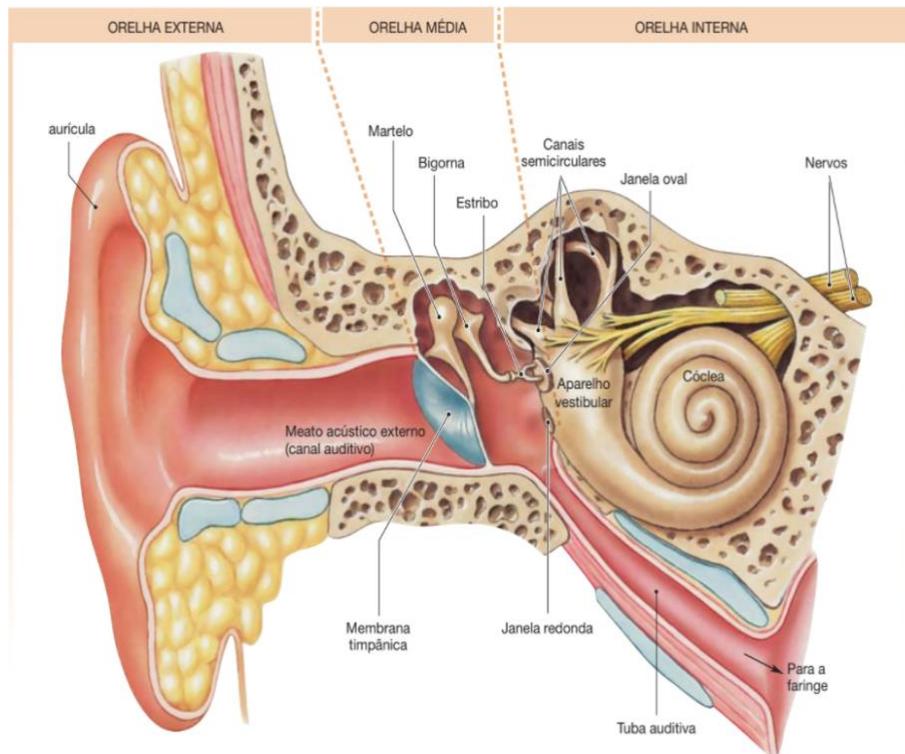


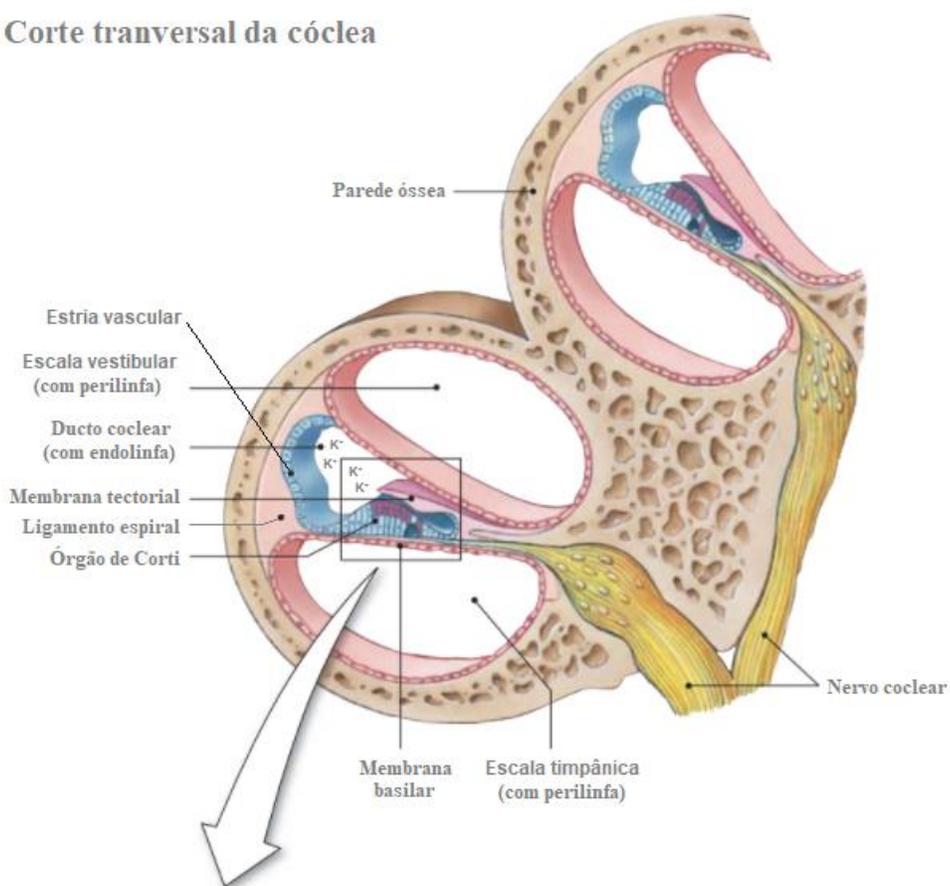
Figura 2. Anatomia da orelha, com suas divisões em OE, OM e OI. Imagem adaptada a partir de imagem de Silverthorn (2017).

A cóclea é uma estrutura membranosa com um revestimento ósseo em formato de caracol que possui três canais: a escala vestibular, o duto coclear e a escala timpânica. As escalas vestibular e timpânica são preenchidas por perilinfa, líquido com alta concentração de íons Na^+ e baixa concentração de íons K^+ , enquanto o duto coclear é preenchido por endolinfa, líquido com alta concentração de íons K^+ e baixa concentração de íons Na^+ (Figura 2A). Essa diferença de concentrações iônicas gera o potencial endococlear, fundamental para o processo de despolarização e repolarização das células ciliadas, que permite a transdução do estímulo sonoro.

Ao longo do duto coclear, se encontra o órgão de Corti (Figura 2B), constituído por diversas estruturas, entre as quais as células ciliadas internas (CCI) e externas (CCE), as membranas basilar e tectória, células de suporte, ligamento espiral, estria vascular e fibras nervosas.

As células ciliadas possuem microvilosidades denominadas estereocílios, que possuem tamanhos diferentes e se organizam em uma sequência crescente, como em uma escada. Devido a conexões, eles se movimentam como uma unidade, chamada feixe ciliar. Nas CCE os estereocílios estão conectados à membrana tectória, enquanto os estereocílios das CCI se encontram livres na endolinfa. O deslocamento do feixe ciliar força a abertura de canais iônicos das células ciliadas, permitindo o influxo de íons K^+ . Nas CCE, esse influxo permitirá a amplificação do estímulo, enquanto nas CCI, acarretará na produção de um potencial de ação que será captado pelas células do nervo coclear e enviado ao córtex cerebral, onde é traduzido em som (Willems, 2000; Silverthorn, 2017).

A) Corte transversal da cóclea



B) Órgão de Corti

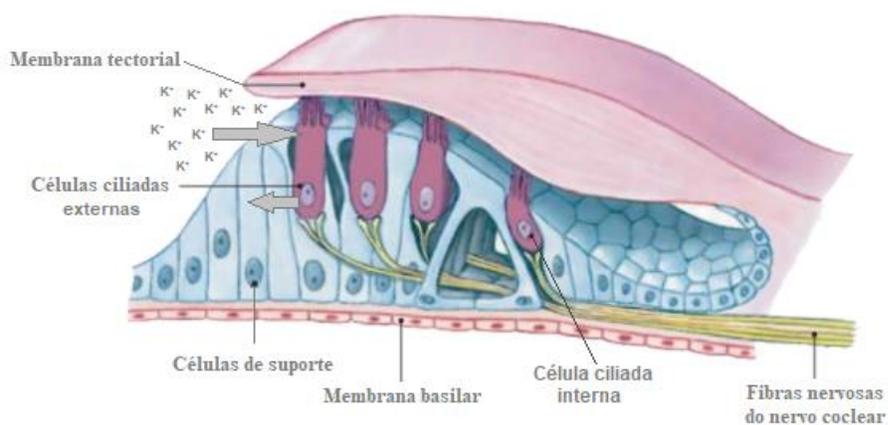


Figura 2. Morfologia da cóclea (A) e do órgão de Corti (B). Imagem adaptada a partir de imagem de Silverthorn (2017).

1.2 Fisiologia da audição

A frequência das ondas sonoras é medida em hertz (Hz), já a intensidade da onda, que corresponde à altura do som, é medida em decibéis (dB). Os humanos são capazes de ouvir sons na faixa de 20 a 20.000 Hz.

As ondas sonoras entram pela OE, percorrendo o canal auditivo até o tímpano, que começa a vibrar devido ao estímulo. Essas vibrações são captadas e amplificadas pelos ossículos da OM e enviadas à OI por intermédio da janela oval.

Na OI as vibrações são propagadas pela perilinfa e pela endolinfa até chegarem à membrana basilar, promovendo movimentação das CCE e da membrana tectória, que são gatilhos para a deflexão do feixe ciliar. O deslocamento dos estereocílios induz a abertura de canais iônicos, permitindo o influxo de íons K^+ na CCE, gerando despolarização. Os potenciais elétricos gerados pela despolarização provocam contrações rápidas dessas células, que amplificam a vibração da membrana basilar, fazendo com que as CCI se movimentem de forma que o seu feixe ciliar entre em contato com a membrana tectória, promovendo a deflexão dos estereocílios e, como nas CCE, consequente abertura de canais iônicos e influxo de íons K^+ na célula ciliada, gerando despolarização. A despolarização das CCI estimula a abertura de canais de íons Ca^{2+} , o influxo desses íons proporciona liberação de neurotransmissores que vão estimular o nervo coclear (Figura 3).

A repolarização das células ocorre quando os estereocílios se movimentam na direção contrária, fechando os canais iônicos, enquanto os íons K^+ se dissipam para as células de suporte, seguindo pelos fibrócitos do ligamento espiral até a estria vascular, que os secreta na endolinfa novamente, fechando o ciclo de reciclagem dos íons K^+ (Willems, 2000; Silverthorn, 2017).

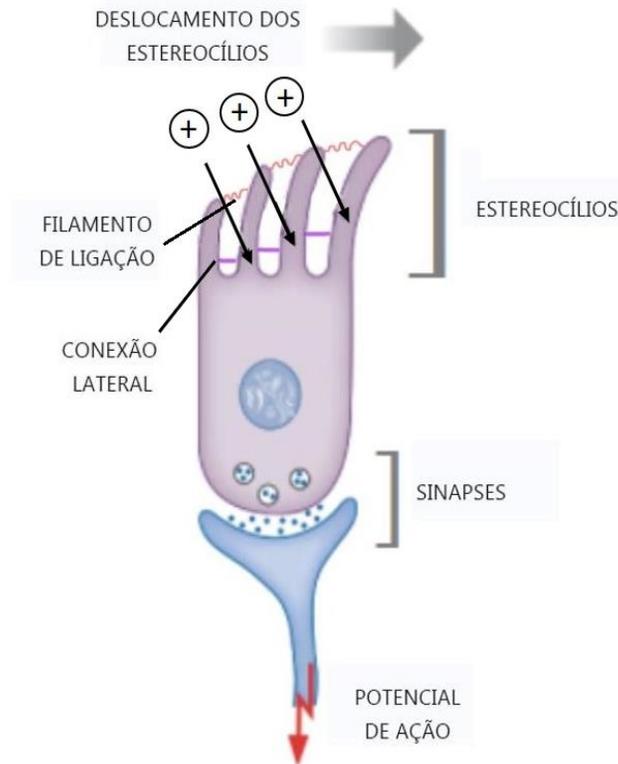


Figura 3. Esquema de uma célula ciliada do órgão de Corti durante estímulo mecânico provocado pela onda sonora, gerando potencial de ação nos nervos auditivos. Imagem adaptada a partir de imagem de Silverthorn (2017).

1.3 Deficiência auditiva

A DA é considerada o distúrbio sensorial mais comum, atingindo cerca de 6,1% da população mundial, segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS, 2020) – quando considerados todos os tipos e níveis de perda auditiva - e, assim como a perda de outras funções sensoriais, tem uma grande diversidade de causas (Dror & Avraham, 2010). Há vários sistemas de classificação para esse tipo de deficiência.

Devido a grande heterogeneidade da DA, estas são classificadas tanto com base em características clínicas, quanto com relação à etiologia. A classificação clínica diz respeito a três distintas categorias: o tipo, a idade de início e o grau de severidade (Tabela 1) (Shearer et al, 1999; Willems, 2000; Alford et al, 2014; Silverthorn, 2017).

Tabela 1. Classificação da deficiência auditiva de acordo com seu tipo, idade de início e grau de severidade.

Classificação da DA de acordo com características clínicas	
Tipo	Condutiva Neurosensorial Mista Central
Idade de início	Pré-lingual Pós-lingual
Grau de severidade	Leve Moderado Moderadamente severo Severo Profundo

Tipo

- *Condutiva*: ocorre devido a disfunções na OE ou nos ossículos da OM, impedindo a condução das ondas sonoras à OI. Exemplos: obstruções no canal auditivo, acúmulo de líquido na OM, traumas nos ossículos, infecções.
- *Neurosensorial*: qualquer defeito nas estruturas da OI que impeça a propagação do potencial de ação para os nervos.
- *Mista*: combinação entre a condutiva e a neurosensorial.
- *Central*: quando há comprometimento das vias neurais auditivas e/ou do córtex.

Idade de início

- *Pré-lingual*: os sintomas começam a surgir antes da fase de desenvolvimento da fala.
- *Pós-lingual*: os sintomas só surgem após o desenvolvimento da fala.

Grau de severidade

Relacionado ao limiar auditivo necessário para se obtenha uma resposta audiológica. Os limiares auditivos são medidos em decibéis (dB), sendo que indivíduos considerados normais apresentam um limiar de até 25dB. A partir desse ponto são consideradas as seguintes classificações de perda auditiva:

- *Leve*: entre 26-40 dB
- *Moderada*: entre 41-55 dB
- *Moderadamente severa*: entre 56-70 dB
- *Severa*: entre 71-90 dB
- *Profunda*: > 90 dB

A surdez pode ter como causa diversos fatores ambientais, genéticos ou ainda decorrer de uma combinação dos dois tipos em um mecanismo multifatorial. Os casos de DA de etiologia genética são divididos em não-sindrômicos, quando não há outras características clínicas, e sindrômicos, quando está acompanhada de outras manifestações clínicas que possuem a mesma etiologia genética da DA (Shearer et al, 1999; Willems, 2000; Alford et al, 2014; Silverthorn, 2017).

Estima-se que 50% a 60% dos casos apresente etiologia genética, sendo que aproximadamente 70% destes são de surdez não-sindrômica (Morton, 1991; Alford et al, 2014). A DA neurossensorial é o tipo em que se observa um maior número de casos com etiologia genética (Alford et al, 2014).

Devido ao grande número de casos relacionados a etiologia genética, o diagnóstico molecular tem sido uma ferramenta muito utilizada. A identificação etiológica permite um prognóstico mais acurado, um tratamento mais condizente à situação e um aconselhamento genético mais aprimorado (Alford et al, 2014).

Porém, a grande diversidade gênica e de características clínicas dificulta a obtenção de um diagnóstico molecular preciso. Atualmente são conhecidos mais de 200 genes associados a DA e mais de 400 síndromes que possuem DA como uma das suas características clínicas. Além disso, DA de etiologia genética é um exemplo de característica com heterogeneidade de tipo de herança, uma vez que já foram descritos casos com formas de herança recessiva, dominante, ligada ao X e até mesmo digênica. Inclusive já foram relatadas mais de uma forma de herança e mais de um tipo de DA associados a mutações em um único gene, bem como mutações em genes distintos relacionados a um mesmo tipo de DA (Angeli et al, 2012; Alford et al, 2014; Van Camp & Smith, 2021).

1.4 Sequenciamento genômico e diagnóstico molecular

Em 1990 iniciou-se o desenvolvimento do Projeto Genoma Humano (PGH) que visava sequenciar completamente o genoma humano, dentre outros objetivos. A partir desse marco, as tecnologias para sequenciamento passaram a ser desenvolvidas mais rapidamente, atualmente

existe uma multitude de ferramentas para tal. Dessa forma, em meados dos anos 2000, foi desenvolvida a tecnologia NGS (*New Generation Sequencing*, também denominada MPS - *Massively Parallel Sequencing*), capaz de sequenciar vários fragmentos de DNA simultaneamente, diminuindo os custos e o tempo gasto no processo.

Essa tecnologia, que deu origem a diversas derivações, tem ocupado um lugar de destaque em pesquisas que envolvem sequenciamento genômico (Voelkerding et al., 2009). Tem se mostrado muito efetiva para o diagnóstico molecular, sendo que dentre as estratégias para execução de NGS estão o WGS (*whole genome sequencing*), que sequencia todo o genoma, o WES (*whole exome sequencing*), que sequencia todo o exoma (conjunto de exons de todo o genoma) e a criação de painéis de genes selecionados. A estratégia utilizada deve ser aquela que melhor se adeque à situação. Por exemplo, em casos em que já se tem um fenótipo bem descrito e uma sugestão de diagnóstico, é possível utilizar um painel com genes associados à condição suspeita. No caso de DA, a *American College of Medical Genetics (ACMG)* recomenda o teste molecular por NGS para avaliação da perda auditiva, adequando-se a estratégia a cada caso (Alford et al, 2014).

Ademais, é essencial a avaliação da necessidade de ferramentas alternativas que complementem os resultados do NGS, uma vez que essa tecnologia ainda apresenta vulnerabilidades, como taxa de erro maior em regiões de CNVs (variantes de número de cópias) (Alford et al, 2014). Apesar disso, tem-se mostrado uma importante ferramenta para o diagnóstico molecular (Su et al., 2011), com taxas médias de diagnóstico de 41% em casos de sequenciamento de genoma completo e de 36% para em casos de sequenciamento de exoma completo (Clark et al, 2018).

A tecnologia NGS mais usada atualmente é a de sequenciamento por síntese (SBS) desenvolvida pela empresa Illumina® (Goodwin et al., 2016), que foi utilizada nesse trabalho. Em 2017, a própria Illumina® divulgou o documento “*An introduction to next-generation sequencing technology*” detalhando as etapas desse tipo de NGS. Esse método é dividido em quatro etapas principais: (1) preparação de biblioteca de sequenciamento, (2) geração de *cluster*, (3) sequenciamento e (4) análise dos dados. A seguir, esses passos são apresentados brevemente.

(1) Preparação de biblioteca de sequenciamento: Essa é a fase em que a amostra de DNA ou cDNA de interesse é fragmentada aleatoriamente. As porções 3’ e 5’ de cada fragmento recebem adaptadores, pequenas sequências de oligonucleotídeos complementares às sequências de oligonucleotídeos que estão fixadas na célula de fluxo (lâmina de vidro usada como base de fixação dos fragmentos na segunda etapa) (Figura 4). O produto fragmento+adaptadores é então amplificado por PCR (*polymerase chain reaction*) e purificado por gel.

Preparação de Biblioteca

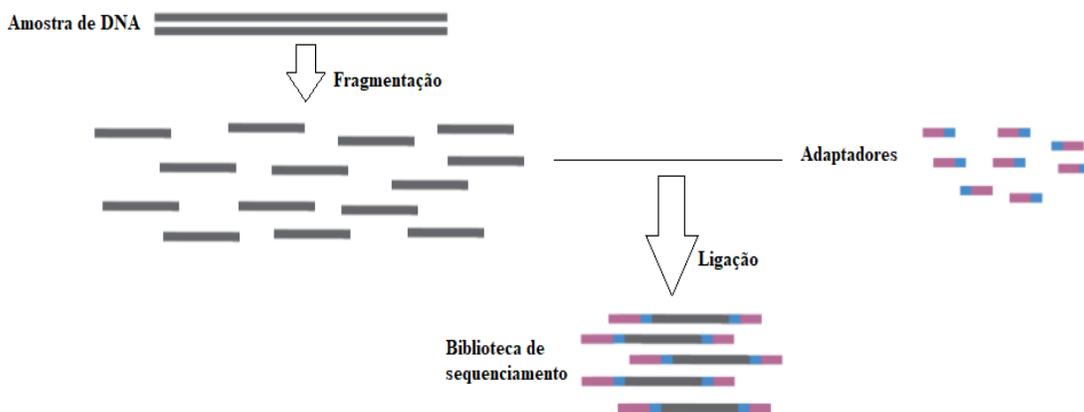


Figura 4. Esquema da construção da biblioteca de sequenciamento, desde a fragmentação da amostra de DNA, até a adição dos adaptadores às pontas 3’ e 5’ de cada fragmento. Imagem adaptada a partir de imagem de “*An introduction to next-generation sequencing technology*” (Illumina, 2017).

(2) Geração de *cluster*: A biblioteca de sequenciamento é distribuída na superfície da célula de fluxo, que contém dois tipos de pequenas sequências complementares aos adaptadores, denominadas geralmente de P5 e P7. Os fragmentos se ligam a essas sequências complementares e passam por ampliações em ponte, formando um grupo (*cluster*) de sequências clones à molde (Figura 5). Ao final dessa etapa, a superfície está repleta de *clusters*, cada um com várias cópias de um dos fragmentos da biblioteca.

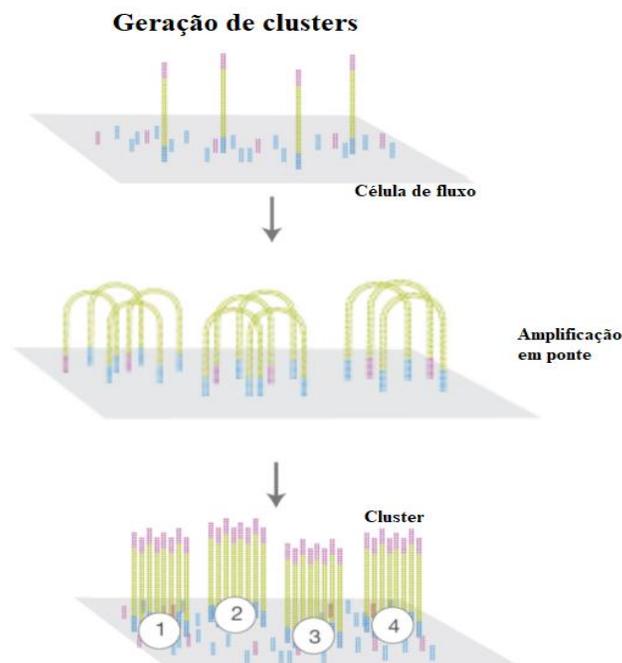


Figura 5. Etapas para construção dos clusters. Imagem adaptada a partir de imagem de “*An introduction to next-generation sequencing technology*” (Illumina, 2017).

(3) Sequenciamento: após a criação dos *clusters*, cada sequência passa pelo SBS, que permite a identificação da base nitrogenada à medida que ela é incorporada à sequência (Figura 6). Nesse momento também pode ser utilizada uma ferramenta denominada sequenciamento *paired-end*, que envolve o sequenciamento simultâneo das duas pontas de cada fragmento e

alinhamento das sequências geradas (*reads*) como um par e visa diminuir os erros em casos como grandes regiões de duplicações. (Figura 7).

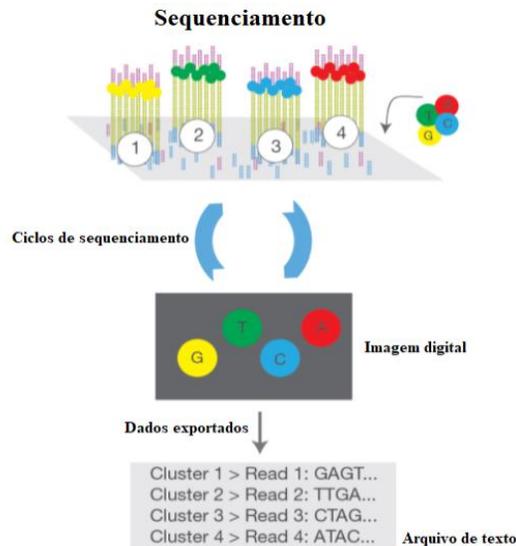


Figura 6. Esquema do sequenciamento por síntese, que gera os *reads*. Um *primer* é anelado ao adaptador livre e à medida que nucleotídeos marcados com fluorescência são incorporados à sequência, o sinal fluorescente específico para cada nucleotídeo é emitido. Como *clusters* diferentes possuem várias cópias de fragmentos diferentes, são gerados inúmeros *reads*, o que diminui a chance de ter espaços não mapeados do genoma. Imagem adaptada a partir de imagem de “*An introduction to next-generation sequencing technology*” (Illumina, 2017).

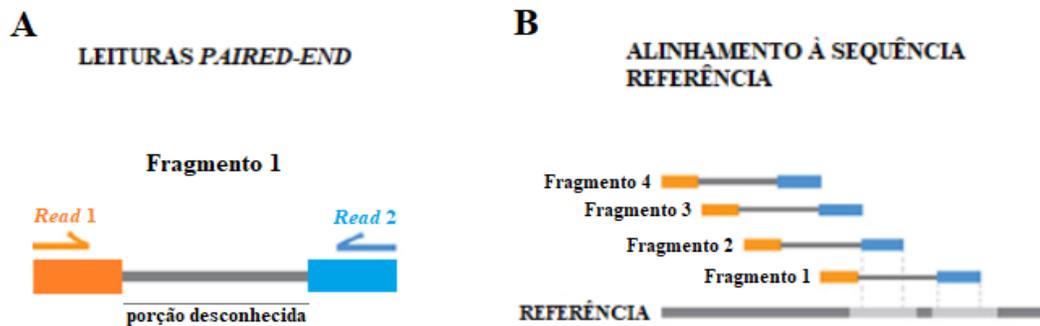


Figura 7. Na leitura *paired-end*, além de um *primer* se anelar ao adaptador livre do fragmento, outro também se anela àquela sequência que fixa o fragmento à célula de fluxo (P5 ou P7) e então o sequenciamento por síntese ocorre a partir das duas pontas. Em 7A, estão representados os dois *reads* gerados pela leitura *paired-end*, que são dispostos de maneira a formar um par de leitura. Nota-se que existe uma porção entre eles que é desconhecida, que pode ser menor ou maior dependendo do tamanho pré-estabelecido para o *read*. A figura 7B mostra os pares de *reads* de quatro fragmentos diferentes alinhados. Pode-se perceber que a porção desconhecida de um fragmento é mapeada por um dos *reads* de outro fragmento, diminuindo a porcentagem de áreas não mapeadas. Outra vantagem é que são gerados mais *reads* em metade do tempo quando comparado à leitura *single-end*. Imagem adaptada a partir de imagem de “*An introduction to next-generation sequencing technology*” (Illumina, 2017).

(4) Análise dos dados: Os *reads* gerados são alinhados à sequência de referência para identificação de variantes (Figura 8).

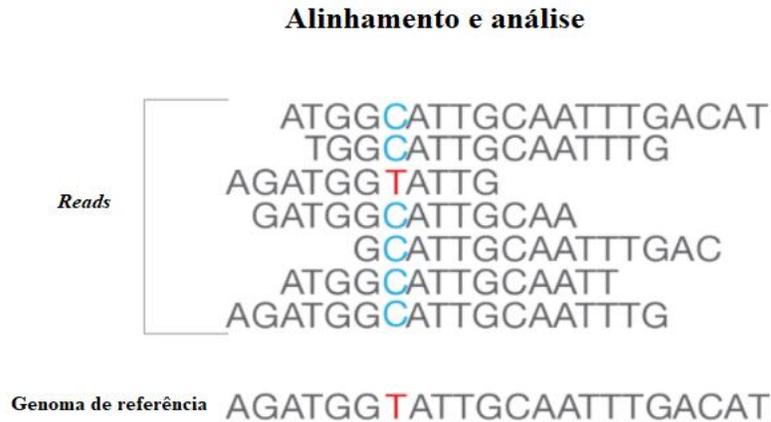


Figura 8. Representação do alinhamento dos *reads* ao genoma de referência, quando é possível identificar se há diferenças com a sequência estudada. Geralmente existem algumas discrepâncias entre os *reads*, como mostrado na imagem na qual um *read* apresenta a mesma base nitrogenada que o genoma de referência, enquanto os demais apresentam outra. Por isso é necessário considerar a cobertura da região analisada, isto é, quantos *reads* foram gerados e em quantos deles a variante aparece para determinar se a informação é confiável. Imagem adaptada a partir de imagem de “*An introduction to next-generation sequencing technology*” (Illumina, 2017).

Os dados gerados no sequenciamento são analisados usando ferramentas de bioinformática para determinar a patogenicidade da variante. Nesse momento, os dados clínicos do paciente são importantes para direcionar a pesquisa de variante, uma vez que ela deve ser compatível com o quadro clínico para ser considerada causativa e gerar um diagnóstico confiável.

1.5 Deficiência auditiva na cidade de Boca da Mata (Alagoas)

Boca da Mata é uma cidade localizada no interior do Estado de Alagoas, a 90 km da capital, Maceió, com uma população estimada em 25.776 indivíduos, de acordo com o censo do IBGE de 2010 (IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, 2021). Ainda de acordo com o censo, 63% da população se autodeclara parda, 33%, branca, 3%, preta e 1%, amarela. O município se desenvolveu a partir de residências construídas na entrada de uma mata, que se estendia em direção a Atalaia, uma das cidades mais populosas de Alagoas (Prefeitura de Boca da Mata, 2021).

A economia de Boca da Mata girava em torno de lavouras e criação de gado, uma vez que as terras propiciavam a construção de sítios e fazendas. Assim, o povoado teve um rápido desenvolvimento, quando começaram a surgir movimentos de emancipação, que ocorreu em 1958, elevando a então vila à condição de município autônomo (Prefeitura de Boca da Mata, 2020).

De acordo com relatos locais, foi observado que a cidade de Boca da Mata possui um grande número de pessoas com perda auditiva. A averiguação de rumores desse gênero consta como uma das metodologias utilizadas pelo INAGEMP (Instituto Nacional de Genética Médica Populacional) para avaliação de casos de alta frequência de doenças genéticas ou anomalias congênitas em populações brasileiras. Dessa forma, esses relatos foram comparados com os dados do censo de 2010 do IBGE, confirmando um alto índice de pessoas que declaram não conseguir ouvir nenhum som dentro da população de Boca da Mata, em comparação com a população de Alagoas e do Brasil (Tabela 2) (IBGE, 2021).

Tabela 2. Comparação entre as populações de Boca da Mata, Alagoas e Brasil em relação à frequência de pessoas que declaram não ouvir nenhum som.

	Pessoas que declaram não ouvir nenhum som*	População total *	Frequência de pessoas que declaram não ouvir nenhum som*
Boca da Mata	87	25776	0,34%
Alagoas	5123	3120494	0,16%
Brasil	344206	190755799	0,18%

*Dados obtidos de acordo com o Censo do IBGE de 2010.

Diante desses dados, surgiu o questionamento do motivo dessa grande diferença de frequência de casos de DA entre a população de Boca da Mata e do Brasil em geral. Devido ao histórico de crescimento populacional rápido e isolamento da região, além de relatos de grande número de casamentos consanguíneos, a hipótese principal levantada é a de que os indivíduos afetados com DA em Boca da Mata, poderiam ter um alto grau de parentesco e uma mutação causativa comum.

As características dessa população indicam um possível efeito do fundador, fenômeno evolutivo observado em populações que foram fundadas por poucas pessoas, ou até mesmo por apenas uma grande família e se mantiveram isoladas (seja esse isolamento geográfico, cultural, religioso ou até mesmo linguístico) por um tempo, promovendo endogamia e a perpetuação de mutações raras, o que possibilita altas taxas de condições genéticas que possuem baixa frequência em outras populações em geral. Esse fenômeno pode levar ao surgimento de um *cluster* de doença genética, ou seja, uma área e/ou período de tempo em que a prevalência de uma doença genética excede a média geral (Cardoso et al, 2019), como observado no caso de Boca da Mata, porém não é possível afirmar que se trata de um *cluster* sem conhecer a etiologia genética da DA dos indivíduos de Boca da Mata.

O número de *clusters* de doenças genéticas identificados no Brasil vem aumentando à medida que mais estudos de genética médica populacional são realizados, permitindo um planejamento de prioridades de gestão em saúde nessas populações, além de uma melhor compreensão sobre a própria doença em questão (Cardoso et al, 2019).

2. JUSTIFICATIVA

Segundo o censo de 2010 do IBGE, 0,18% da população brasileira declara não ouvir nenhum som. Porém, foi observado que em Boca da Mata (Alagoas) há uma incidência dessa condição acima do constatado na população brasileira como um todo. A população de Boca da Mata (Alagoas), de acordo com o IBGE 2010, era de 25.776 pessoas, sendo que 0,34% da população declarou não ouvir nenhum som, ou seja, quase o dobro da média nacional. Em comparação com o estado de Alagoas, essa diferença mostrou-se ainda maior, 0,16% dos 3.120.494 de habitantes deste Estado afirmaram não ouvir som algum (IBGE, 2020) (Tabela 2).

Dessa forma, nos perguntamos o porquê de essa cidade ter uma incidência aumentada de surdez. Considerando as características e histórico da população, a hipótese principal que norteou esse trabalho foi a de que os deficientes auditivos dessa cidade são aparentados e que apresentam uma mesma mutação, já descrita ou não. A hipótese alternativa foi a de que os indivíduos sejam não aparentados, que diversas mutações estejam presentes na cidade ou que causas ambientais estejam relacionadas, assim essa taxa aumentada não poderia ser explicada por parentesco.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Buscar a causa molecular dos casos de DA observados em Boca da Mata (Alagoas) com vistas a melhor compreensão da incidência aumentada de pacientes com DA nessa cidade em comparação com outras regiões do Brasil.

3.2 Objetivos Específicos

- Buscar a etiologia genética da DA em pacientes de Boca da Mata (Alagoas) usando análise de exoma direcionado e completo.
- Avaliar a hipótese de origem da maior incidência de DA nessa cidade.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

Esse trabalho foi conduzido com base em técnicas para diagnóstico molecular, utilizando ferramentas de sequenciamento e análise bioinformática em conjunto com informações clínicas dos pacientes.

4.1 Amostragem

Moradores de Boca da Mata que apresentavam surdez foram convidados a comparecer na Unidade Básica de Saúde da cidade para serem avaliados com vistas à inclusão no projeto . A equipe responsável por essas avaliações foi composta por biólogas geneticistas da Universidade Estadual de Ciências da Saúde de Alagoas (UNCISAL) e da Universidade de Brasília (UNB). Para ser incluído na pesquisa, o indivíduo deveria apresentar, a princípio, perda auditiva congênita ou manifestada na infância não-sindrômica sem diagnóstico molecular. Foram excluídos os indivíduos que apresentaram surdez relacionada à idade ou que não eram naturais de Boca da Mata ou que não possuísem, ao menos, antecedentes familiares no local. Os participantes da pesquisa foram informados acerca do projeto, assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) aprovado pelo CEP (Processo número 58055816.3.0000.0030) (Anexo A) e responderam a um questionário clínico, conduzido por biólogas geneticistas (Anexo B).

Dentre os indivíduos que acessaram o ambiente de coleta, foram incluídos 16 pacientes, pertencentes a 16 famílias, com idades variando de 4 a 61 anos à época da coleta. Além dos probandos, foi coletado material biológico de 18 familiares.

Um dos pacientes que teve seu material coletado foi excluído após o atendimento por ter sido diagnosticado com Síndrome da Rubéola Congênita (SRC). O quadro clínico do paciente difere dos demais pois, segundo o questionário clínico respondido pelo pai e a avaliação clínica, o paciente é agressivo, apresenta deficiência intelectual grave, microcefalia e surdez bilateral. O vírus da rubéola é capaz de ultrapassar a barreira placentária, infectando o feto, ocasionando malformações neurológicas e anatômicas, podendo levar a óbito. Os órgãos mais afetados são coração, olhos e aparelho auditivo, sendo a surdez a forma de manifestação mais comumente relacionada à SRC (Costa et al., 2013).

Portanto, no total, foi coletado material biológico de 32 pessoas, sendo 15 probandos e 17 familiares. Desses 17, quatro também apresentam DA: ALS010, irmão de ALS008, ALS026, irmã de ALS025, e ALS035 e ALS037, irmãos de ALS038 (Tabela 3).

Tabela 3. Identificação dos pacientes de Boca da Mata (Alagoas) com deficiência auditiva e seus respectivos parentes que tiveram amostra coletada.

Família	Probando	Sexo	Ano de nascimento	Parentes com amostra coletada
1	ALS002	masculino	2007	ALS007 -Mãe
2	ALS003	masculino	1988	ALS004 –Mãe, ALS005 – Pai
3	ALS008	masculino	2000	ALS009 –Mãe, ALS010 - Meio-irmão afetado
4	ALS011	feminino	2002	ALS012 -Mãe
5	ALS013	masculino	2012	ALS014 -Mãe
6	ALS017	feminino	1986	Adotada
7	ALS019	masculino	2004	ALS020 -Mãe
8	ALS021	masculino	2013	ALS022 -Mãe
9	ALS023	masculino	1975	ALS024 -Mãe
10	ALS025	masculino	1960	ALS026 -Irmã afetada

Tabela 3: continuação

11	ALS027	feminino	2000	Adotada
12	ALS029	feminino	1999	ALS030 -Mãe
13	ALS031	masculino	2000	ALS032 -Mãe
14	ALS033	masculino	1956	ALS034 -Irmão
15	ALS038	feminino	1972	ALS035 e ALS037 -Irmãos afetados, ALS036 - Mãe

De cada paciente e seus familiares presentes, foram coletados cerca de 8 mL de sangue periférico em tubos contendo EDTA. A coleta foi feita por profissional da área da saúde, com material estéril e descartável. As amostras passaram por processo de extração de DNA, seguindo o protocolo adaptado do Kit *Genra Puregene Blood Kit* (QIAGEN®). O DNA foi avaliado qualitativamente e quantitativamente utilizando o equipamento Nanodrop e gel de agarose.

4.2 Testes Audiológicos

Para determinar o tipo de DA e seu nível, os probandos foram submetidos a exames psicológicos e audiológicos: audiometria tonal, audiometria vocal e imitanciometria. Tais exames foram realizados no Centro de Reabilitação III da UNCISAL por uma psicóloga e psicopedagoga de clínica particular e por fonoaudióloga vinculada à UNCISAL. Todos os parâmetros utilizados para classificação da perda auditiva foram os recomendados pelo Conselho Federal de Fonoaudiologia no Manual de Audiologia - Guia de Orientações na Avaliação Audiológica Básica (2017).

A audiometria tonal determina o limiar audiológico por meio de avaliação da percepção de diferentes frequências de estímulos sonoros (tom puro) emitidos ao paciente, sendo que as frequências podem ser emitidas por via aérea, por meio de transdutores (fones de ouvido) ou por via óssea, por meio de vibrador ósseo. A audiometria vocal complementa a tonal, avaliando a capacidade de compreensão da fala humana (CFF, 2017). Os resultados foram usados para classificar o tipo de DA de cada paciente, de acordo com os parâmetros de Silman e Silverman (1997) e da Organização Mundial da Saúde (OMS, 2020). Todos os indivíduos apresentaram resultados compatíveis com perda auditiva bilateral neurosensorial profunda.

A imitanciometria (ou impedanciometria) é utilizada para determinar a resistência da membrana timpânica durante a vibração responsável por transmitir os estímulos sonoras à cóclea. Para tal, esse teste é dividido em três partes: timpanometria, teste de reflexo acústico e teste do decaimento do reflexo acústico. A timpanometria mede a resistência do tímpano e a pressão infligida nos ossículos auditivos (martelo, estribo e bigorna) durante a vibração sonora, enquanto o teste de reflexo acústico e o do decaimento do reflexo acústico avaliam a resposta muscular da orelha média e a complacência da membrana timpânica. A imitanciometria é realizada através da inserção de uma sonda na orelha do paciente, que detecta a capacidade de movimentação do tímpano e a intensidade mínima necessária para acontecer o reflexo acústico (CFF, 2017).

4.3 Sequenciamento *Inherited Disease Panel*

O material biológico de cada probando foi analisado por sequenciamento de exoma direcionado, utilizando o painel *SeqCap EZ Inherited Disease Panel*, que compreende cerca de 4.100 genes relacionados a doenças genéticas humanas. Desse montante, aproximadamente 200

genes (Anexo C) são relacionados à DA e foram selecionados e analisados. Os dados laboratoriais foram gerados pelo Laboratório Sabin.

As bibliotecas de sequenciamento foram preparadas com o kit *Seq Cap EZ Hyper prep* (Roche Diagnostics), seguindo as recomendações do fabricante. O tamanho e a qualidade da biblioteca genômica foram verificados no equipamento *TapeStation* (Agilent Technologies) e sua quantificação foi medida no *Qubit 2.0 Fluorometer system* (Life Technologies®). O sequenciamento do tipo *paired-end* foi realizado usando o *NextSeq sequencer* (Illumina®) com kit *Nextseq 500/550 V2 midi output* de 2 x 75 ciclos (Illumina®).

As sequências geradas pelo sequenciamento foram alinhadas ao genoma referência UCSC hg19 utilizando o software *Burrows –Wheeler Aligner 61* (Sourceforge) e as variantes genéticas foram chamadas utilizando o *Genome Analysis Toolkit variant caller* (GATK, Broad Institute).

Inicialmente, o probando da família 15 era o ALS035, porém, a amostra teve que ser descartada após apresentar falhas de qualidade durante o sequenciamento de exoma direcionado. Assim, o indivíduo ALS038 passou a ser o probando da família 15, como sua amostra ainda não estava disponível à época desse sequenciamento, ela foi submetida apenas ao sequenciamento de exoma completo, realizado posteriormente.

4.4 Exoma completo

Foi possível realizar o sequenciamento de exoma completo de cinco dos probandos, dessa forma, foram selecionadas as amostras de: ALS038, pois ainda não havia sido submetida a nenhuma análise; ALS008 e ALS025, pois possuem familiares afetados com material coletado, o que facilitaria a análise dos familiares se necessário; ALS011 e ALS023, pois possuíam amostras com melhor qualidade, diminuindo a chance de erros em decorrência de baixa qualidade de material.

O sequenciamento de exoma completo sequenciou aproximadamente 200.000 exons que constituem o genoma do indivíduo por meio de NGS realizado pela empresa MacroGen®. A plataforma utilizada para o sequenciamento *paired-end* foi a Illumina® NovaSeq6000 e para construção da biblioteca de sequenciamento, foi usado o *kit Agilent Sure-select V6* (Agilent Technologies). O controle de sequenciamento e a chamada de base foram feitos por meio de um software RTA (*Real Time Analysis*) integrado à plataforma NovaSeq6000. Para converter os dados da chamada de bases em arquivo FASTQ, foi utilizado o pacote *bc12fastq* da Illumina®.

4.5 Anotação e classificação de variantes

A classificação de variantes seguiu os padrões e as diretrizes estabelecidas pela ACMG. Visando a padronização dessa classificação, a ACMG estabeleceu as terminologias: patogênica (PAT), provavelmente patogênica (LP), de significado incerto (VUS), benigna (BEN) e provavelmente benigna (LB). A classificação foi feita pela avaliação e combinação de critérios divididos em dois grupos: indícios de variantes benignas (ou provavelmente benignas) e indícios

de variantes patogênicas (ou provavelmente patogênicas). Cada critério benigno deve ser identificado entre as categorias: suficiente (BA1), forte (BS1-BS4) ou indicativo (BP1-BP7). Enquanto os critérios patogênicos devem ser divididos em: muito forte (PVS1), forte (PS1-PS4), moderado (PM1-PM6) e indicativo (PP1-PP5) (Tabela 4) (Richards et al., 2015).

Tabela 4. Critérios estabelecidos pela ACMG para interpretação e classificação de variantes de acordo com patogenicidade. Tabela adaptada a partir de tabela de Richards et al. (2015)

Indícios de Variante Benigna	
Suficiente (<i>stand-alone</i>)	
BA1	Frequência do alelo mutante >5% no <i>Exome Sequencing Project</i> , no <i>1000 Genome Project</i> ou no <i>Exome Aggregation Consortium</i>
Forte (<i>strong</i>)	
BS1	Frequência do alelo mutante é maior do que a esperada para aquela condição
BS2	Variante em gene associado a doenças com padrão de herança recessivo, dominante ou ligado ao X, com penetrância completa em idade precoce, observada em indivíduo adulto saudável
BS3	Estudos funcionais bem estabelecidos <i>in vivo</i> e <i>in vitro</i> mostram que a variante não causa efeitos deletérios
BS4	Sem segregação em membros afetados da família
Indicativo (<i>supporting</i>)	
BP1	Variante <i>missense</i> em gene que a causa principal conhecida para doença é variante que gere produto truncado
BP2	Observada em <i>trans</i> com uma variante patogênica para doença autossômica dominante com penetrância completa ou observada em <i>cis</i> com uma variante patogênica de qualquer padrão de herança
BP3	Deleção ou inserção <i>in-frame</i> em região repetitiva sem função conhecida
BP4	Múltiplos algoritmos computacionais de predição <i>in silico</i> indicam que não existe impacto no gene ou no seu produto
BP5	Encontrada em caso com base molecular alternativa para a doença
BP6	Fontes confiáveis reportaram a variante como benigna recentemente
BP7	Variante sinônima (silenciosa) para a qual algoritmos de predição indicam que não há impacto em sítio de <i>splicing</i> e o nucleotídeo não é altamente conservado

Tabela 4: continuação

Indícios de Variante Patogênica	
Muito Forte (<i>very strong</i>)	
PVS1	Variante nula em gene no qual perda de função é um mecanismo conhecido da doença
Forte (<i>strong</i>)	
PS1	Resulta em mesma troca de aminoácido que variante previamente estabelecida como patogênica, independente da troca de nucleotídeos
PS2	Variante <i>de novo</i> em paciente afetado e sem histórico familiar da doença (confirmadas a paternidade e maternidade)
PS3	Estudos funcionais bem estabelecidos <i>in vivo</i> e <i>in vitro</i> mostram que a variante causa efeitos deletérios
PS4	A prevalência da variante é significativamente maior em indivíduos afetados quando comparada com a prevalência em controles
Moderado (<i>moderate</i>)	
PM1	Localizada em <i>hot spot</i> mutacional e/ou em domínio funcional crítico bem estabelecido sem variação benigna
PM2	Ausente em controle (ou com frequência extremamente baixa em recessivo) no <i>Exome Sequencing Project</i> , no <i>1000 Genome Project</i> ou no <i>Exome Aggregation Consortium</i>
PM3	Identificada em <i>trans</i> com variante patogênica, para doenças recessivas
PM4	Causa mudança no tamanho da proteína devido a perda de códon de parada ou a deleção/inserção <i>in-frame</i> em região não repetitiva
PM5	Variante <i>missense</i> em resíduo de aminoácido em que outra variante <i>missense</i> já foi determinada como patogênica
PM6	Presumida como <i>de novo</i> , mas sem confirmação de paternidade e maternidade
Indicativo (<i>supporting</i>)	
PP1	Co-segregada com doença em múltiplos membros da família afetados em gene definitivamente conhecido como associado à doença
PP2	Variante <i>missense</i> em gene que tem uma baixa taxa de mutação <i>missense</i> benigna e no qual variantes <i>missense</i> são um conhecido mecanismo da doença
PP3	Múltiplos algoritmos computacionais de predição <i>in silico</i> indicam efeito deletério no gene ou no seu produto
PP4	Fenótipo do paciente ou histórico familiar é altamente específico para uma doença com etiologia genética única
PP5	Fontes confiáveis reportaram a variante como patogênica recentemente

As evidências foram interpretadas de forma conjunta para que a variante fosse classificada de forma mais assertiva. Para a combinação de critérios, foram respeitadas as regras apresentadas na tabela 5 (Richards et al., 2015).

Tabela 5. Regras de combinações de critérios para classificação das variantes de acordo com a ACMG. Tabela adaptada de Richards et al (2015).

Patogênica
i) 1 Muito forte (PVS1) E (a) ≥ 1 Forte (PS1-PS4) OU (b) ≥ 1 Moderado (PM1-PM6) OU (c) 1 Moderado (PM1-PM6) E 1 Indicativo (PP1-PP5) OU (d) 2 Indicativos (PP1-PP5) OU ii) ≥ 2 Fortes (PS1-PS4) OU iii) 1 Forte (PS1-PS4) E (a) ≥ 3 Moderados (PM1-PM6) OU (b) 2 Moderados (PM1-PM6) E ≥ 2 Indicativos (PP1-PP5) OU (c) 1 Moderado (PM1-PM6) E ≥ 4 Indicativos (PP1-PP5)
Provavelmente Patogênica
i) 1 Muito forte (PVS1) E 1 Moderado (PM1-PM6) OU ii) 1 Forte (PS1-PS4) E 1-2 Moderados (PM1-PM6) OU iii) 1 Forte (PS1-PS4) E ≥ 2 Indicativos (PP1-PP5) OU iv) ≥ 3 Indicativos (PP1-PP5) OU v) 2 Moderados (PM1-PM6) E ≥ 2 Indicativos (PP1-PP5) OU vi) 1 Moderado (PM1-PM6) E ≥ 4 Indicativos (PP1-PP5)
Benigna
i) 1 Suficiente (BA1) OU ii) ≥ 2 Fortes (BS1-BS4)
Provavelmente Benigna
i) 1 Forte E 1 Indicativo (BP1-BP7) OU ii) ≥ 2 Indicativos (BP1-BP7) OU
De Significado Incerto
i) Não se encontram no critérios descritos OU ii) Os critérios são contraditórios

As variantes encontradas pelo sequenciamento *Inherited Disease Panel* foram anotadas por meio da plataforma *BaseSpace Variant Interpreter* (Illumina®), enquanto a anotação das variantes encontradas através do exoma completo foi realizada utilizando a plataforma *Varstation*. Ambas as plataformas permitem a filtragem de variantes de acordo com suas características, como tipo de mutação, zigosidade, padrão de herança, frequência populacional e associação fenotípica. Para tal, acessam diversas bases de dados de polimorfismos e mutações, além de ferramentas de bioinformática para correlações genótipos-fenótipos, associações baseadas em evidências e predições *in silico* de patogenicidade.

As variantes de interesse foram submetidas a uma avaliação no programa Varsome - ferramenta de bioinformática e anotação de dados para NGS. Essa ferramenta compila dados de bancos de dados sobre variantes, identifica os critérios de classificação, avalia-os de forma combinada e, assim, computa um veredito de patogenicidade, seguindo os padrões e as diretrizes de interpretação de variantes da ACMG.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Avaliações clínicas

De acordo com os parâmetros de Jerger (1970), para os resultados da timpanometria, todos os probandos possuem o timpanograma tipo A, ou seja, mobilidade normal do sistema tímpano-ossicular. Porém, os demais testes da imitanciometria acusaram reflexo acústico ausente, assim classificado de acordo com os padrões de Gelfand (1984) e Jerger e Jerger (1989) para quando não há reflexo desencadeado até a saída máxima de estímulo sonoro do equipamento, o que sugere perda auditiva bilateral neurosensorial profunda, resultado também apresentado pela audiometria.

Em conjunto com as demais avaliações clínicas, todos os 15 pacientes foram considerados portadores de DA bilateral neurosensorial profunda não-sindrômica. Porém, como existem diversos tipos de síndromes que apresentam a surdez como uma de suas características, não se pode descartar a possibilidade de algum indivíduo possuir DA sindrômica e que outras manifestações da doença ainda não tinham ocorrido ou sido identificadas à época da coleta. Outro fator que pode ter influenciado esse resultado é a falta de conhecimento sobre o histórico familiar, uma vez que muitos dos indivíduos que foram entrevistados não souberam fornecer informações mais concretas ou confiáveis.

A tabela 6 compila os dados os quais a equipe entrevistadora teve acesso com relação a deficiência auditiva e/ou outras doenças genéticas na família, consanguinidade e idade de início dos sintomas. Observa-se que há ausência de dados decorrente da falta de conhecimento dos entrevistados. Os parentes citados quanto a presença de DA ou outras doenças e que não tiveram material coletado não foram avaliados pela equipe.

Tabela 6. Informações obtidas a partir de entrevistas com os probandos ou seus responsáveis quanto a consanguinidade, início dos sintomas, outros parentes afetados e outras doenças na família.

Indivíduo	Consanguinidade (pais)	Início de sintoma	Outros parentes afetados	Outras informações
ALS002	Não	SI	SI	NA
ALS003	Não	SI	Primo 2 ^o grau	Epiléptico
ALS008	Não	SI	Meio-irmão com DA e deficiência intelectual (ALS010)	NA
ALS011	Não	SI	Avô e tio maternos	Leve malformação do pavilhão da orelha
ALS013	Não	SI	Caso esporádico	NA
ALS017	SI	SI	SI	Adotada
ALS019	Não	SI	Primo perdendo a audição desde 17 anos	NA
ALS021	Não	SI	Caso esporádico	NA
ALS023	Não	SI	Tio paterno e outro parente por parte do avô (não soube informar o grau de parentesco)	NA
ALS025	SI	Pós-lingual	Irmã começou a perder a audição quando criança, ficando completamente surda na fase adulta (ALS026)	Malformação nas pernas e paralisia
ALS027	SI	Pré-lingual	SI	Adotada
ALS029	Não	SI	SI	NA
ALS031	Não	Pré-lingual	Caso esporádico	NA
ALS033	Sim	Pré-lingual	1 irmã e 1 irmão	Possível parentesco com ALS038
ALS038	Sim	Pré-lingual	2 irmãos, avó materna, 2 tios-avôs, 1 primo de 3 ^o grau e 1 prima de 3 ^o grau	Possível parentesco com ALS033

SI - sem informação

NA - não se aplica

A partir dos dados fornecidos durante as entrevistas, foram construídos os heredogramas das famílias dos probandos ALS003, ALS008, ALS011, ALS019, ALS023, ALS029, ALS033 e ALS038, uma vez que esses casos mostram um padrão sugestivo de etiologia genética familiar (Figura 9).

Observa-se que ALS010 (Figura 9.B), meio-irmão por parte de mãe de ALS008, apresenta DA, mas o quadro clínico aparentemente é sindrômico, pois também apresenta deficiência auditiva. Um tio-avô paterno de ALS010 também é deficiente auditivo, mas como não há mais informações sobre seu quadro clínico, não é possível fazer uma correlação entre o seu caso e o de ALS010. Esse tio-avô não possui parentesco biológico com ALS008.

O ALS025 (Figura 9.F) apresenta malformação nas pernas e paralisia, além da surdez, o que é um indício de uma condição sindrômica. Porém, sua irmã (ALS026) apresenta DA não sindrômica com as mesmas características de início de manifestação, o que indica uma mesma etiologia. Não há relatos de outros irmãos ou os pais sendo acometidos com DA. Dessa forma, apenas com esses dados não é possível inferir se eles possuem a mesma causa para a DA e considerando que seja, também não é possível discriminar se seria uma condição em homozigose ou heterozigose com penetrância incompleta.

Observa-se um padrão de herança similar entre os casos de DA nas famílias de ALS033 (Figura 9.G) e ALS038 (Figura 9.H), o qual sugere uma herança recessiva: mesma proporção de afetados em ambos os sexos e todos os casamentos dos pais de afetados que se têm informação apresentam consanguinidade. Ainda, existe relato de parentesco entre esses dois indivíduos, apesar de não se saber em que grau. Diante dessas informações propõe-se que essas duas famílias sejam uma só e que a etiologia genética da DA dos afetados seja a mesma.

Não há informações complementares para os demais casos.

5.2 Busca da etiologia genética - mutações causativas

Foram encontradas cinco mutações em quatro genes com sugestão de causativas de DA em seis dos 15 pacientes (Tabela 7).

Tabela 7. Variantes genéticas potencialmente causativas de deficiência auditiva em pacientes de Boca da Mata (AL). Os critérios estabelecidos pela ACMG (Tabela 4) que foram atingidos e suas respectivas classificações de acordo com a patogenicidade foram checados no Varsome.

Indivíduo	Gene	Coordenada cromossômica	Variante DNA	Variante proteína	Padrão	Critérios atingidos	Classificação
ALS013	<i>MYO7A</i>	chr11:76914236	c.5300C>T	p.(Ser1767Leu)	HET	PM1 PM2 PP2 PP3	LP
ALS019	<i>KCNQ4</i>	chr1:41300685	c.1660C>T	p.(Arg554Ter)	HET	PVS1 PM2 PP3	PAT
ALS029	<i>MYO7A</i>	chr11:76873974	c.1630A>T	p.(Asn544Tyr)	HET	PM1 PM2 PP2 PP3	LP
ALS031	<i>COL4A3</i>	chr2:228163475	c.3829G>A	p.(Gly1277Ser)	HET	PS1 PM1 PM2 PP2 PP3 PP5	PAT
ALS033 ALS038	<i>MYO15A</i>	chr17:18034837	c.4198G>A	p.(Val1400Met)	HOM	PS1 PM1 PM2 PP2 PP3 PP5	PAT

HET - heterozigoto e HOM - homozigoto

LP - provavelmente patogênica (*likely pathogenic*) e PAT - patogênica

As mutações relatadas na tabela 7 foram encontradas por meio do sequenciamento de exoma direcionado (*SeqCap EZ Inherited Disease Panel*), com exceção apenas do caso de ALS038, pois sua amostra ainda não estava disponível no momento em que foi realizado esse

exame nas demais amostras, porém a mesma variante apresentada por esse indivíduo foi encontrada em ALS033, sugerindo que também seria detectada caso tivesse sido submetida ao sequenciamento por painel. Esse resultado é indicativo de que o *SeqCap EZ Inherited Disease Panel* é um método válido de diagnóstico molecular de DA.

5.2.1 ALS013 e ALS029

Foi observado que os indivíduos ALS013 e ALS029 apresentam variantes classificadas como provavelmente patogênicas em heterozigose no gene *MYO7A*. As figuras 10 e 11 apresentam o resultado observado no IGV, que demonstra a confiança na observação.

- ALS013: c.5300C>T/p.(Ser1767Leu) (Figura 10)

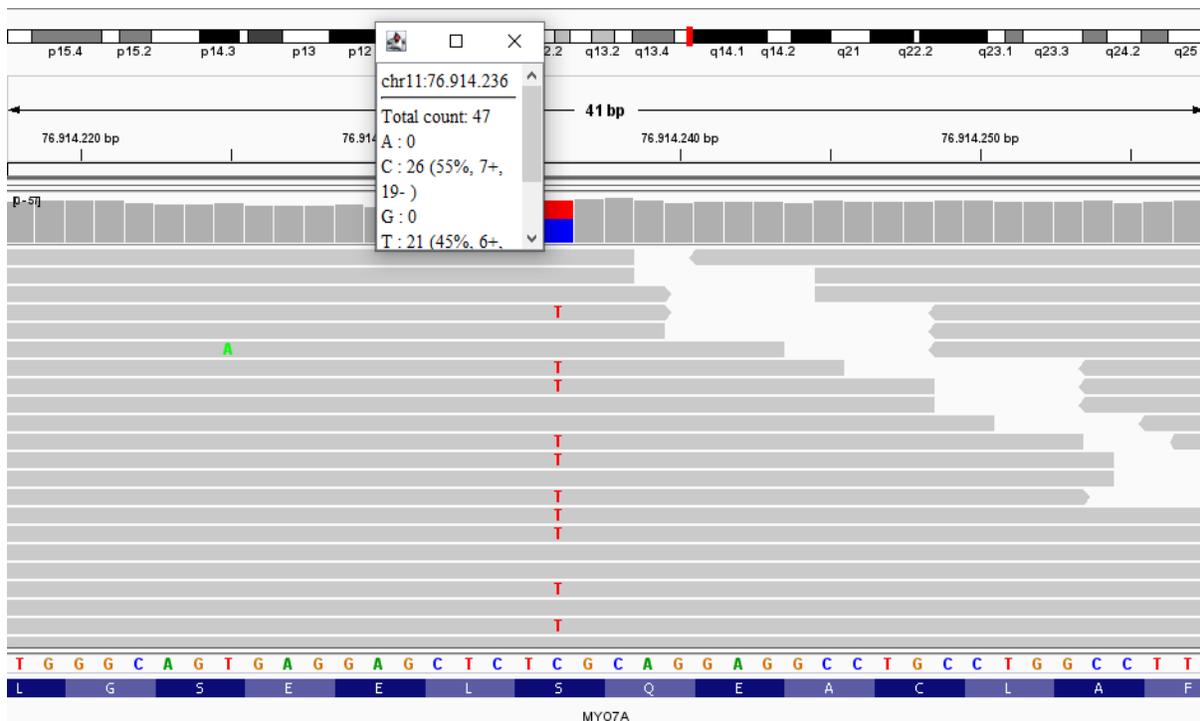


Figura 10. Variante c.5300C>T/p.(Ser1767Leu) identificada no gene *MYO7A* do indivíduo ALS013. A proporção entre *reads* com a variante ancestral e mutante indicam heterozigose. Imagem gerada pelo programa IGV - *Integrative Genomes Viewers*.

- ALS029: c.1630A>T/p.(Asn544Tyr) (Figura 11)

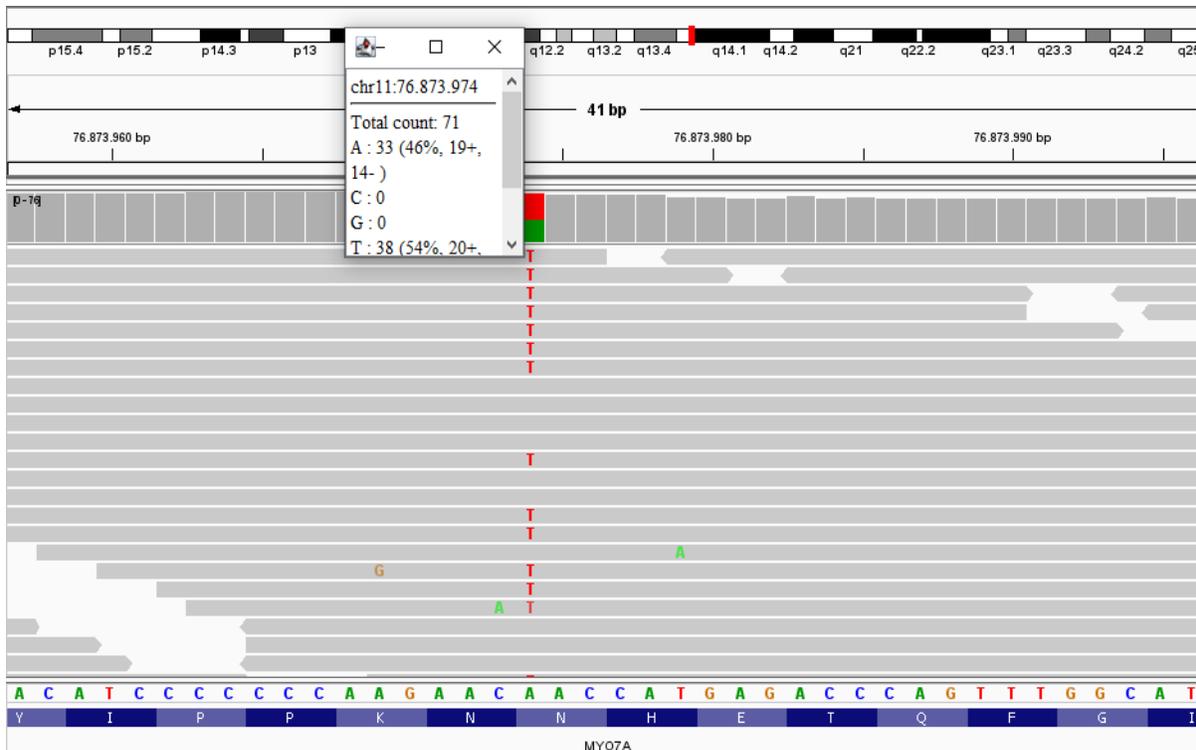


Figura 11. Variante c.1630A>T/p.(Asn544Tyr) identificada no gene *MYO7A* do indivíduo ALS029. A proporção entre *reads* com a variante ancestral e mutante indicam heterozigose. Imagem gerada pelo programa IGV - *Integrative Genomes Viewers*.

Mutações patogênicas em *MYO7A* já foram associadas à síndrome de Usher, caracterizada por perda auditiva e visual com padrão de herança recessivo e à DA não-sindrômica, tanto com padrão de herança recessivo (surdez autossômica recessiva 2 - DFNB2), quanto dominante (surdez autossômica dominante 11 - DFNA11) (Sun et al., 2011). Atualmente oito mutações em *MYO7A* foram identificadas como causas de DFNA11 e diversas outras foram reportadas como possivelmente patogênicas. DFNA11 se apresenta como perda auditiva progressiva com severidade e idade de início de sintomas variáveis, mas geralmente na fase pós-lingual (Yamamoto et al, 2020).

O gene *MYO7A* é responsável pela produção de miosina VIIA. As miosinas são proteínas que se ligam à actina e possuem atividade de ATPase, promovendo a movimentação da actina ou dela mesma ao longo de um filamento de actina. Dessa forma, são responsáveis por diversos eventos motores intracelulares. No geral, as miosinas são compostas por uma porção N-terminal, descrita como “cabeça” ou motor, que se liga ao filamento de actina e é a porção mais conservada entre as diferentes classes de miosina. Já o “pescoço”, é uma região que regula a atividade da cabeça, enquanto que a porção C-terminal, a “cauda”, é o local onde ocorre a ligação com outros elementos, como proteínas ou, até mesmo membranas, dependendo da sua constituição e, por isso, também serve para identificar a classe da miosina (Mooseker & Cheney, 1995) (Figura 12).

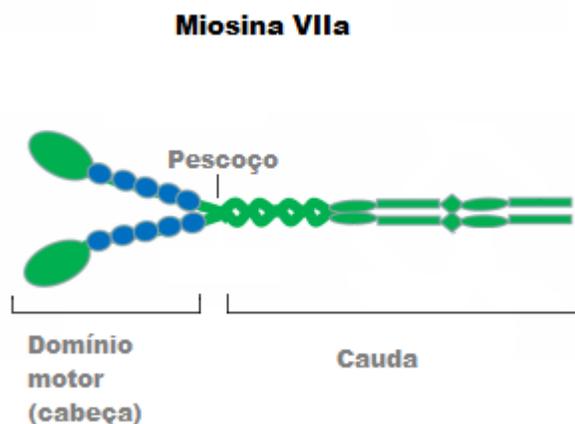


Figura 12. Esquema de estrutura da Miosina VIIa. Porção C-terminal está descrita como domínio motor ou “cabeça”, seguida da região regulatória (pescoço) e a porção C-terminal ou “cauda”, contendo alguns domínios que se ligam a proteínas ou membranas. Imagem adaptada a partir de imagem de Xiao et al. (2016).

As miosinas são classificadas em dois grupos: convencionais e não convencionais. O primeiro grupo compreende as miosinas classe II, envolvidas nas contrações musculares. Todas as outras classes de miosinas pertencem ao grupo de não convencionais, inclusive a VIIA (Mooseker & Cheney, 1995).

A miosina VIIA é expressa nas células ciliadas da orelha interna (Hasson et al., 1997). Essas células possuem estereocílios, projeções constituídas por citoesqueleto de actina. Os estereocílios se organizam em agrupamentos denominados feixes ciliares, que se movem como uma unidade, cada feixe possui fileiras de estereocílios com tamanhos diferentes, formando um padrão em escada, essencial para a integridade da audição (Tilney et al., 1992; DeRosier & Tilney, 2000) (Figura 13).

Quando estímulos sonoros mecânicos chegam à superfície das células ciliadas, o feixe ciliar se movimenta para a direção da fileira que possui os maiores estereocílios. Essa movimentação promove a abertura e o fechamento de canais iônicos de mecanotransdução (canais MET), permitindo o fluxo de K^+ e Ca^{2+} , o que acarreta a despolarização das células e assim, a transdução desse estímulo sonoro mecânico em sinal elétrico (Hudspeth, 1989; Beurg et al., 2006).

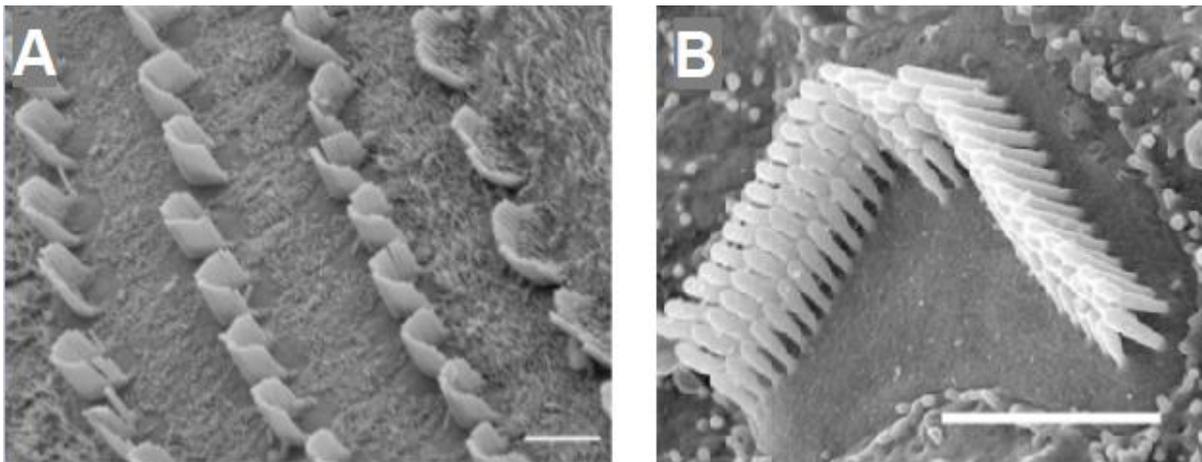


Figura 13. Microscopia eletrônica de varredura mostrando (A) os os feixes ciliares distribuídos na superfície das células ciliadas da cóclea e (B) uma maior ampliação, detalhando sua estrutura em escada. Imagens A e B adaptadas de Schwander et al. (2010) e Hertzano et al. (2008).

Cada célula ciliada possui centenas de estereocílios, sendo que, para que eles se mantenham organizados na estrutura de feixe, existem ligações constituídas de proteínas entre eles. Uma dessas ligações é o filamento de ligação (*tip-link*), que ocorre entre a lateral de um estereocílio e a ponta do estereocílio adjacente menor e é constituído por duas proteínas transmembranares, a caderina 23 e a protocaderina 15 (Kazmierczak et al, 2007). O canal MET se encontra no ponto de inserção do filamento de ligação (*tip-link*) no estereocílio menor (Beurg et al., 2006). Enquanto no ponto de inserção do filamento de ligação (*tip-link*) no estereocílio maior, existe um complexo composto por miosina VIIA e outras duas proteínas, a *sans* e a *harmonin-b*. Essas três proteínas possuem uma gama de domínios de ligação entre si, formando uma estrutura estável, compacta e eletro-densa, que ancora o filamento de ligação (*tip-link*) ao estereocílio e o conecta ao citoesqueleto de actina (Grati & Kachar, 2011) (Figura 14). A miosina VIIA também é responsável por gerar tensão ao filamento de ligação (*tip-link*) quando toda a estrutura está em repouso, garantindo que o canal de mecanotransdução se mantenha fechado quando não há estímulo (Grati & Kachar, 2011).

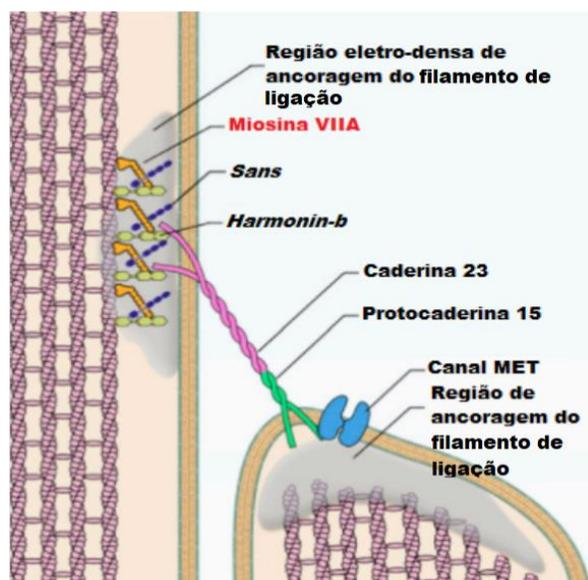


Figura 14. Esquema do filamento de ligação (*tip-link*), mostrando os componentes envolvidos no mecanismo de transdução. Imagem adaptada a partir de imagem de Grati & Kachar (2011).

Outros estudos mostram que casos de surdez foram associados a defeitos morfológicos no feixe ciliar e à elongação excessiva dos estereocílios em pacientes com mutações em *MYO7A* (Schwander et al., 2010). Prosser et al. (2008) sugerem que a miosina VIIa está ligada à regulação da polimerização do citoesqueleto de actina, uma vez que na ausência de *MYO7A*, ocorre um aumento no filamento de actina. Corroborando essa ideia, Rzadzinska et al. (2009) demonstrou que a miosina VIIa é responsável por transportar *twinfilin-2*, uma proteína que inibe a polimerização de actina, visto que em ratos com mutações patogênicas em *MYO7A* essa proteína não é encontrada nas pontas dos estereocílios e há crescimento exacerbado do filamento de actina (Figura 15).

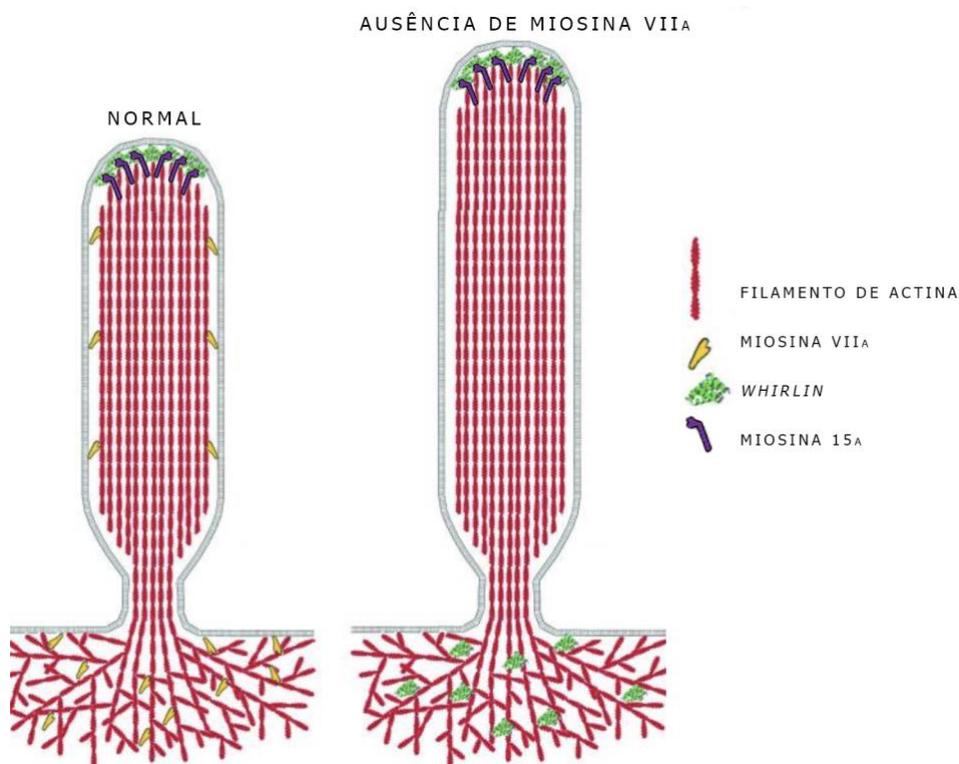


Figura 15. Esquema mostrando a diferença de tamanho entre um estereocílio normal e um estereocílio com ausência de miosina VIIa, no qual há crescimento exacerbado, uma vez que essa proteína transporta ao estereocílio a proteína inibidora de polimerização do filamento de actina, *twinfilin-2*. Imagem adaptada a partir de imagem de Prosser et al (2008).

Como o estereocílio não possui vesículas de transporte, a miosina VIIA ainda pode estar relacionada ao transporte de outras proteínas essenciais para a sua correta estruturação e seu bom funcionamento. Nos estudos de Senften et al. (2006) e de Boeda et al. (2002), ratos com mutações em *MYO7A* não apresentaram protocaderina 15 nem *harmonin-b* na constituição de seus estereocílios.

A variante c.1630A>T/p.(Asn544Tyr), encontrada em ALS029 ainda não foi descrita e não possui registro de frequência populacional. Ela se encontra no exon 14 de 49, que faz parte do domínio motor (cabeça) da miosina (Figura 16), região extremamente conservada entre as classes de miosina, onde ocorrem as ligações à actina e ao ATP e a hidrólise do ATP, podendo comprometer a função motora da proteína (Sokac & Bement, 2000), das oito mutações patogênicas descritas que causam DFNA11, seis se encontram nesse domínio (Yamamoto et al, 2020).

A variante c.5300C>T/p.(Ser1767Leu), encontrada em ALS013, também não é descrita e aparece em frequência muito baixa. Ela ocorre no exon 38, região responsável por codificar um domínio chamado MyTH4 (Figura 16), que é um dos domínios de ligação à proteína *sans*. Defeitos nessa ligação podem comprometer a estabilidade do ponto de inserção do filamento de ligação (*tip-link*) no estereocílio maior, prejudicando o processo de transdução do estímulo sonoro (Wu et al, 2011; Pelaseyed & Bretscher, 2018).

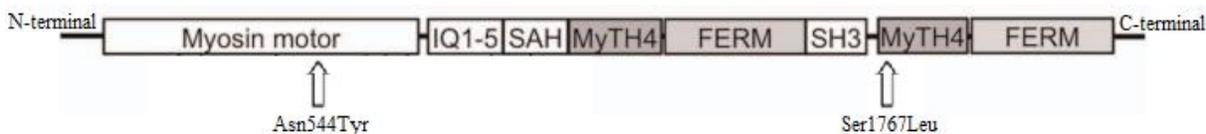


Figura 16. Esquema apresentando em quais domínios proteicos da miosina VIIa as variantes Asn544Tyr (ALS029) e Ser1767Leu (ALS013) são encontradas. Imagem adaptada a partir de imagem de Yamamoto et al (2020).

Por esses motivos, sugere-se que essas variantes são possíveis causas da DA dos pacientes ALS013 e ALS029, porém para validação do resultado, é necessário que se faça uma nova entrevista mais detalhada acerca das características da perda auditiva, uma vez que não há informações sobre fase de início de sintomas, além de testes de sequenciamento para o gene *MYO7A* dos pais e de outros familiares próximos do probando. Como são distintas mutações nas duas famílias, se descarta para esses casos a proposta de compartilhamento de mutação na população de Boca da Mata.

5.2.2 ALS019

Em ALS019 foi identificada uma mutação nonsense c.1660C>T/p.(Arg554Ter) em heterozigose no exon 12 do gene *KCNQ4*. Tal mutação ocasiona a troca de um aminoácido arginina por um códon de parada, resultando em uma proteína truncada, e foi classificada como patogênica. Para 55 leituras realizadas para esse locus, o alelo mutante (T) apareceu em 29 (53%) (Figura 17). Essa mutação ainda não foi descrita na literatura e não consta em bancos de dados de variantes.

Variantes patogênicas neste gene estão associadas à surdez não-sindrômica autossômica dominante 2A (DFNA2A), com padrão de início de sintomas com idades variadas, mas geralmente pós-lingual e progressiva (Jentch, 2000).

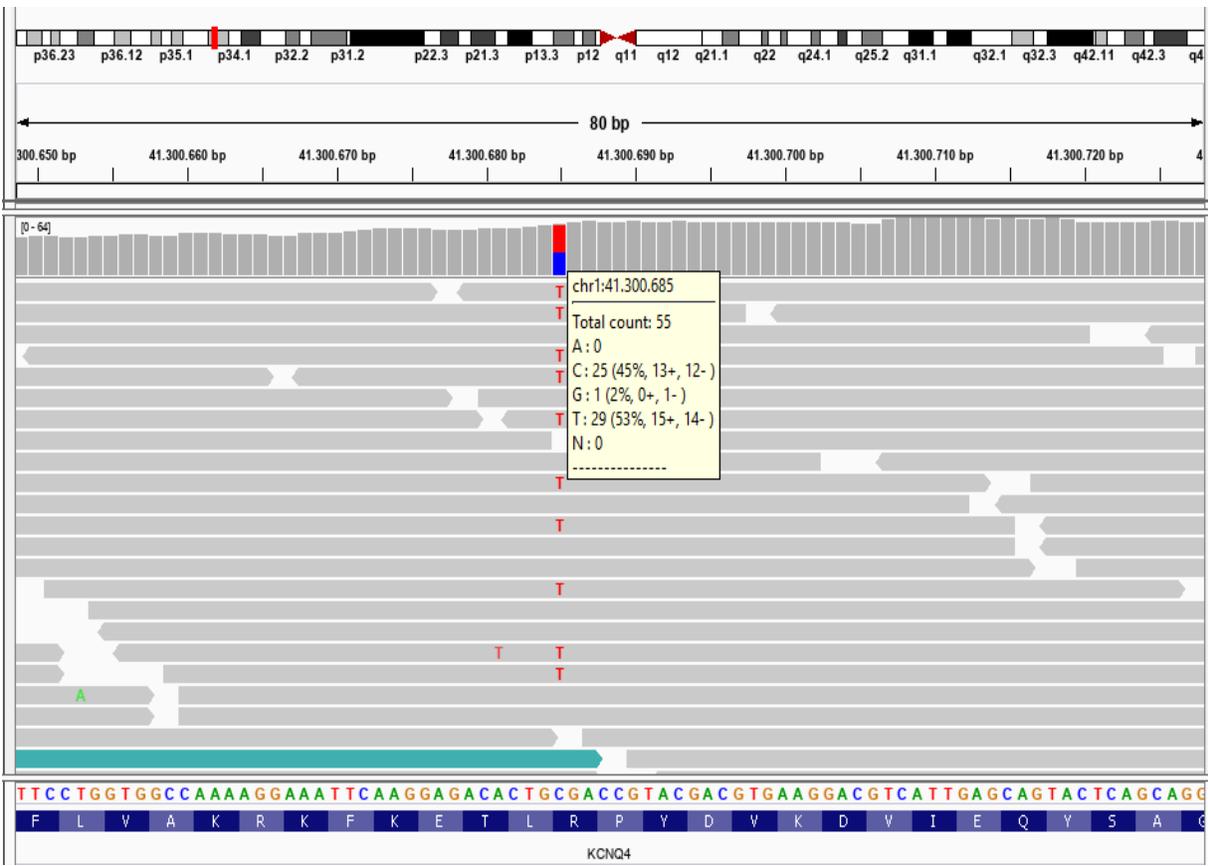


Figura 17. Variante identificada em heterozigose no paciente ALS19. A quantidade de *reads* com a base ancestral e com base derivada sinalizam heterozigose para o locus. Imagem gerada pelo programa IGV - *Integrative Genomes Viewers*.

O gene *KCNQ4* codifica a proteína Kv7.4, que é uma subunidade de canal de íons de potássio. Juntamente com os genes *KCNQ1*, *KCNQ2* e *KCNQ3*, forma um ramo da superfamília de canais de K^+ . A similaridade de sequência de aminoácidos gerada a partir do gene *KCNQ4* em relação ao produto dos demais genes dessa família é de 38%, 44% e 37%, respectivamente (Kubisch et al., 1999). O gene *KCNQ4* apresenta 14 exons, sendo que o exon 12 pertence à porção C-terminal da proteína, região altamente conservada que também está presente em *KCNQ1*, *KCNQ2* e *KCNQ3* (Kubisch et al., 1999).

A expressão de *KCNQ4* é muito significativa nas células ciliadas do órgão de Corti (Kubisch et al., 1999), onde participa na homeostase do potássio. Os canais de subunidades Kv7.4 se localizam entre as células ciliadas e as células de suporte, por onde os íons K^+ se dispersam, garantindo a repolarização da célula ciliada após a transdução do estímulo sonoro (Willems, 2000) (Figura 18).

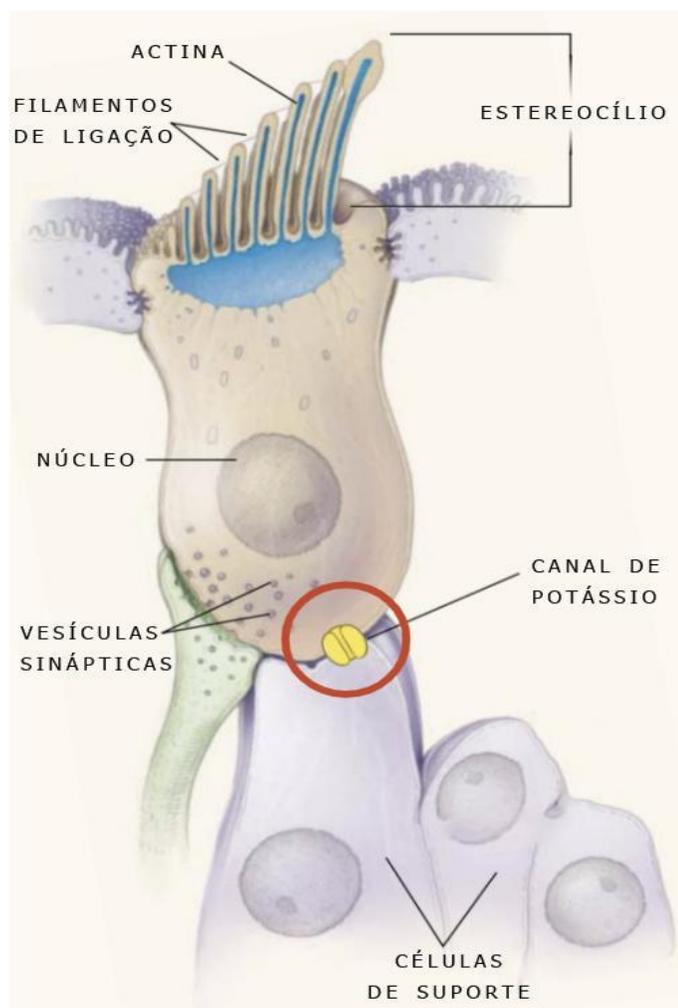


Figura 18. Esquema de célula ciliada com canal de K^+ formado por subunidades Kv7.4 em destaque, mostrando sua localização entre a célula ciliada e a célula de suporte. Imagem adaptada a partir de imagem de Willems (2008).

A interação de quatro subunidades Kv7.4 forma um canal de potássio. Cada subunidade possui uma porção N-terminal intracelular pequena, uma porção transmembrana e uma porção C-terminal intracelular grande. A porção transmembrana é constituída por sete hélices (S1-S6 e hélice do poro), as hélices S1-S4 correspondem ao domínio sensor de voltagem e as hélices do poro, S5 e S6, ao domínio do poro. Já a porção C-terminal possui quatro elementos (A-D) divididos em dois domínios: domínio de ligação à calmodulina, que regula a função do canal e compreende os elementos A e B e o domínio de montagem, que corresponde aos elementos C e D (Haitin & Attali, 2008; Wasano et al, 2015; Mehregan et al, 2019) (Figura 19).

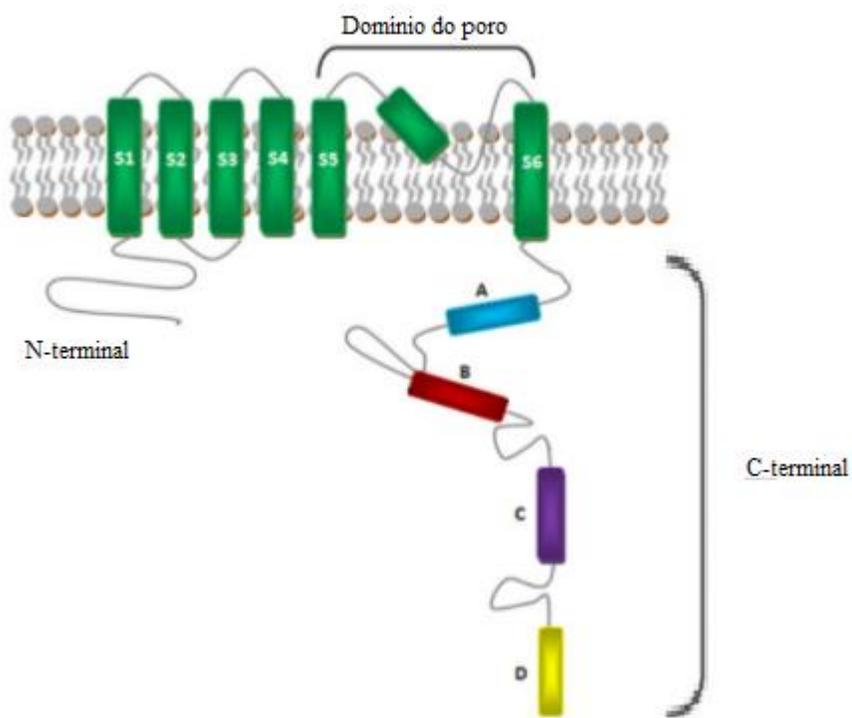


Figura 19. Esquema representando como os domínios proteicos de uma subunidade Kv7.4 estão distribuídos na membrana da célula ciliada. Imagem adaptada a partir de imagem de Mehregan et al (2019).

No domínio de montagem ocorre a ligação entre as quatro subunidades Kv7.4, garantindo a conformação e funcionamento do canal. O elemento C se liga a um elemento C de outra subunidade Kv7.4, produzindo um dímero, além de já ter sido associado ao tráfego da proteína à membrana. Enquanto o elemento D se liga aos elementos D das outras três subunidades, produzindo um tetrâmero (Figura 20). Também já foi sugerido que esse domínio funciona como uma plataforma de interação com proteínas de sinalização para abertura e fechamento do canal (Haitin & Attali, 2008; Wasano et al, 2015; Mehregan et al, 2019).

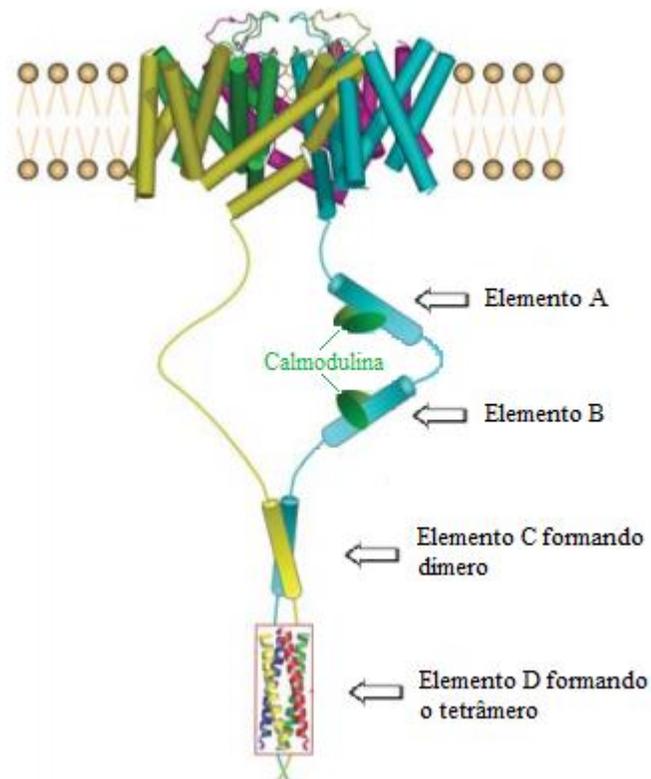


Figura 20. Figura representativa de um canal de K⁺ formado pela interação de quatro subunidades Kv7.4, representadas nas cores azul, amarelo, rosa e verde. Além de mostrar a ligação da calmodulina nos elementos A e B, a formação do dímero através da interação entre as subunidades azul e amarela e o tetrâmero formado pela interação entre as quatro subunidades. Imagem adaptada a partir de imagem de Haitin & Attali (2008)

A mutação nonsense c.1660C>T/p.(Arg554Ter) se localiza logo após o elemento B, assim, a proteína formada não possui o domínio de montagem, impedindo a formação do canal. Como a variante se encontra em heterozigose, é possível a formação de alguns canais, porém a quantidade não seria suficiente para dispersar todas as moléculas de K⁺ que entraram na célula ciliada durante o processo de despolarização, com o tempo, essa circunstância acarreta no acúmulo de íons K⁺ na célula ciliada, causando sua degeneração e perda auditiva progressiva (Jentsch, 2000).

Nesse contexto, levando em consideração os dados aferidos e a literatura exposta sobre o assunto, sugere-se que a mutação nonsense p.(Arg554Ter) seja a causa mais provável da DA relatada no paciente ALS019. Porém, como não há informações sobre o início da manifestação da DA desse paciente e o fato de essa mutação estar em heterozigose sugerir perda auditiva progressiva, é necessário que se faça uma anamnese mais detalhada da condição do paciente, além de teste de sequenciamento do gene *KCNQ4* dos pais desse indivíduo para validação dos resultados. Recomenda-se que o primo com DA de ALS019 também seja submetido a análises clínicas e a exame com sequenciamento específico do gene *KCNQ4* para determinar se possui a mesma variante.

5.2.3 ALS031

O indivíduo ALS031 possui uma mutação missense c.3829G>A/p.(Gly1277Ser) em heterozigose no gene *COL4A3* (Figura 21), que foi classificada como patogênica. Esse gene codifica a cadeia polipeptídica $\alpha 3$ do colágeno tipo IV, que compõe as membranas basilar e tectória e ligamento espiral da cóclea (Kalluri et al, 1998; Harvey et al, 2001; Zehnder et al, 2005).

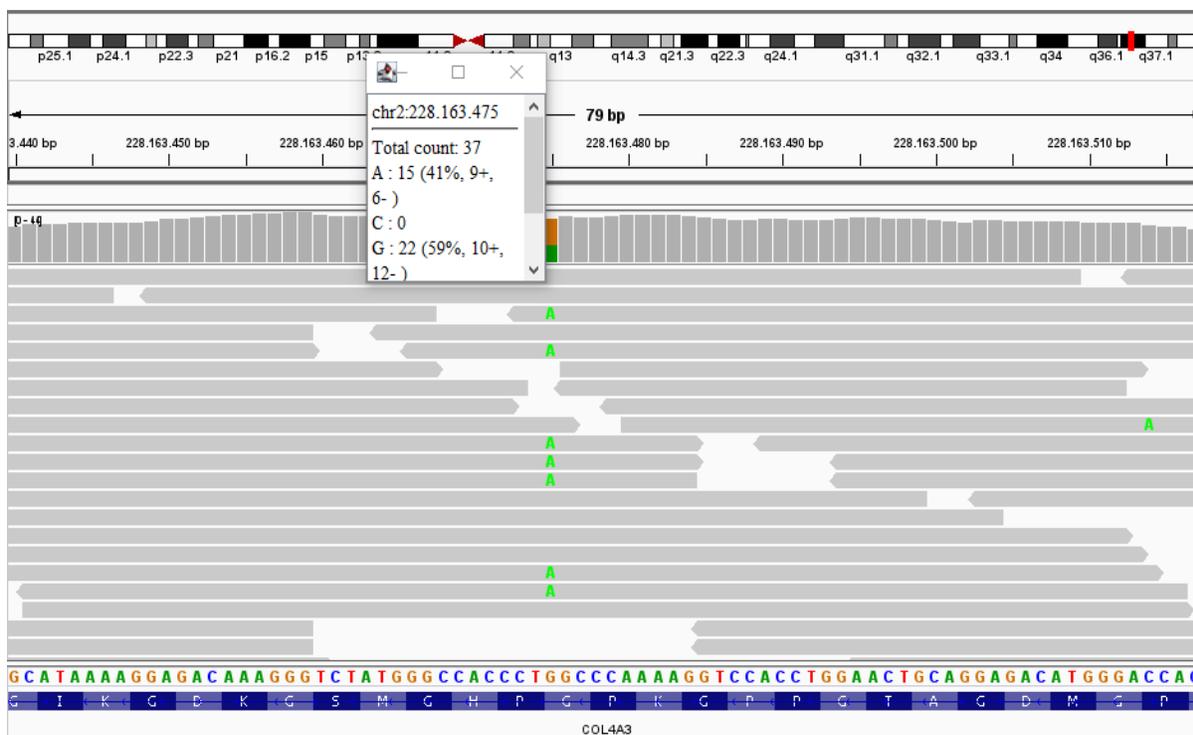


Figura 21. Variante c.3829G>A/p.(Gly1277Ser) identificada no gene *COL4A3* do indivíduo ALS031. A proporção entre *reads* com a variante ancestral e mutante indicam heterozigose. Imagem gerada pelo programa IGV - *Integrative Genomes Viewers*.

O colágeno é uma proteína constituinte da matriz extracelular e possui função de suporte estrutural, compartimentalização dos tecidos e regulação celular através de interação via receptores (Richard-Blum, 2011). Existem vários tipos de colágenos, mas todos têm em comum uma porção triple-hélice em sua estrutura constituída por três cadeias α enroladas entre si, que podem ser da mesma classe de cadeia α ou de diferentes classes (Prockop & Kivirikko, 1995; Kalluri, 2003; Richard-Blum, 2011). O restante da estrutura do colágeno pode variar dependendo do seu tipo, o que vai determinar suas funções específicas, restringindo a distribuição pelos tecidos (Richard-Blum, 2011).

O domínio triplo helicoidal das cadeias α é composto por uma sequência de repetições dos aminoácidos Gly-X-Y, sendo Gly uma glicina, enquanto X e Y podem ser qualquer resíduo

de aminoácido, mas geralmente são prolina e 4-hidroxiprolina, respectivamente (Prockop & Kivirikko, 1995). Essa configuração confere uma certa rigidez, por isso existem cadeias α que possuem interrupções nessas repetições para promover mais flexibilidade a moléculas de colágeno que integram regiões que dependem dessa propriedade, como é o caso do colágeno tipo IV (Prockop & Kivirikko, 1995; Khun, 1995; Khoshnoodi et al, 2008; Richard-Blum, 2011).

Cada tipo de colágeno possui mais de um tipo de cadeia α , de isoforma e de estrutura supramolecular, dessa forma um mesmo tipo de colágeno pode ter uma grande diversidade de conformações, as quais diferem em estrutura, distribuição pelo organismo e função (Richard-Blum, 2011).

No caso do colágeno IV, existem seis cadeias α ($\alpha 1$ a $\alpha 6$) que podem se organizar de forma a construir uma das seguintes isoformas: a) duas cadeias $\alpha 1$ e uma $\alpha 2$ - $[\alpha 1(\text{IV})]_2\alpha 2(\text{IV})$; b) uma cadeia $\alpha 3$, uma cadeia $\alpha 4$ e uma cadeia $\alpha 5$ - $\alpha 3(\text{IV})\alpha 4(\text{IV})\alpha 5(\text{IV})$; c) duas cadeias $\alpha 5$ e uma $\alpha 6$ - $[\alpha 5(\text{IV})]_2\alpha 6(\text{IV})$ (Hudson et al, 1993; Kuhn, 1995; Kalluri et al, 1998; Zehnder et al, 2005; Richard-Blum, 2011). O trímero $[\alpha 1(\text{IV})]_2\alpha 2(\text{IV})$ é encontrado em membranas basais de todos os órgãos, enquanto os outros dois trímeros estão presentes em apenas alguns órgãos, como o rim (membrana basal dos glomérulos), a orelha interna (membranas basilar e tectória e ligamento espiral da cóclea) e os olhos (Kalluri et al, 1998; Harvey et al, 2001; Zehnder et al, 2005).

Todas as seis cadeias α do colágeno IV possuem uma mesma estrutura básica com três domínios distintos: um domínio 7S na porção N-terminal, um domínio triplo helicoidal, onde estão as repetições Gly-X-Y, características do colágeno (esse tipo de colágeno possui interrupções na sequência de repetições Gly-X-Y para que a molécula tenha uma certa

flexibilidade) e um domínio globular não colagenoso, denominado NC1, na porção C-terminal (Figura 22) (Kalluri, 2003; Hudson et al, 1993). As cadeias possuem de 50 a 70% de homologia entre si a nível de aminoácido, o que as difere são a variação do tamanho dos domínios e da quantidade de interrupções das repetições Gly-X-Y (Hudson et al, 1993).

O colágeno tipo IV se configura em superestruturas como uma malha e para tal existem várias estruturas formadas a partir da cadeia α até que se atinja a conformação final (Figura 22). Primeiro, três cadeias α do colágeno tipo IV se ligam lado a lado pelo domínio NC1, enquanto essa porção forma um trímero, todo o resto da estrutura se torce entre si, dando origem a estrutura de tripla-hélice. Esse protômero se liga a outro protômero idêntico também pelo domínio NC1, formando um dímero, que se associa a mais três dímeros a partir do domínio 7S para a estruturação de um tetrâmero, que ao interagir com outros tetrâmeros, produz a superestrutura em formato de malha (Kalluri, 2003).

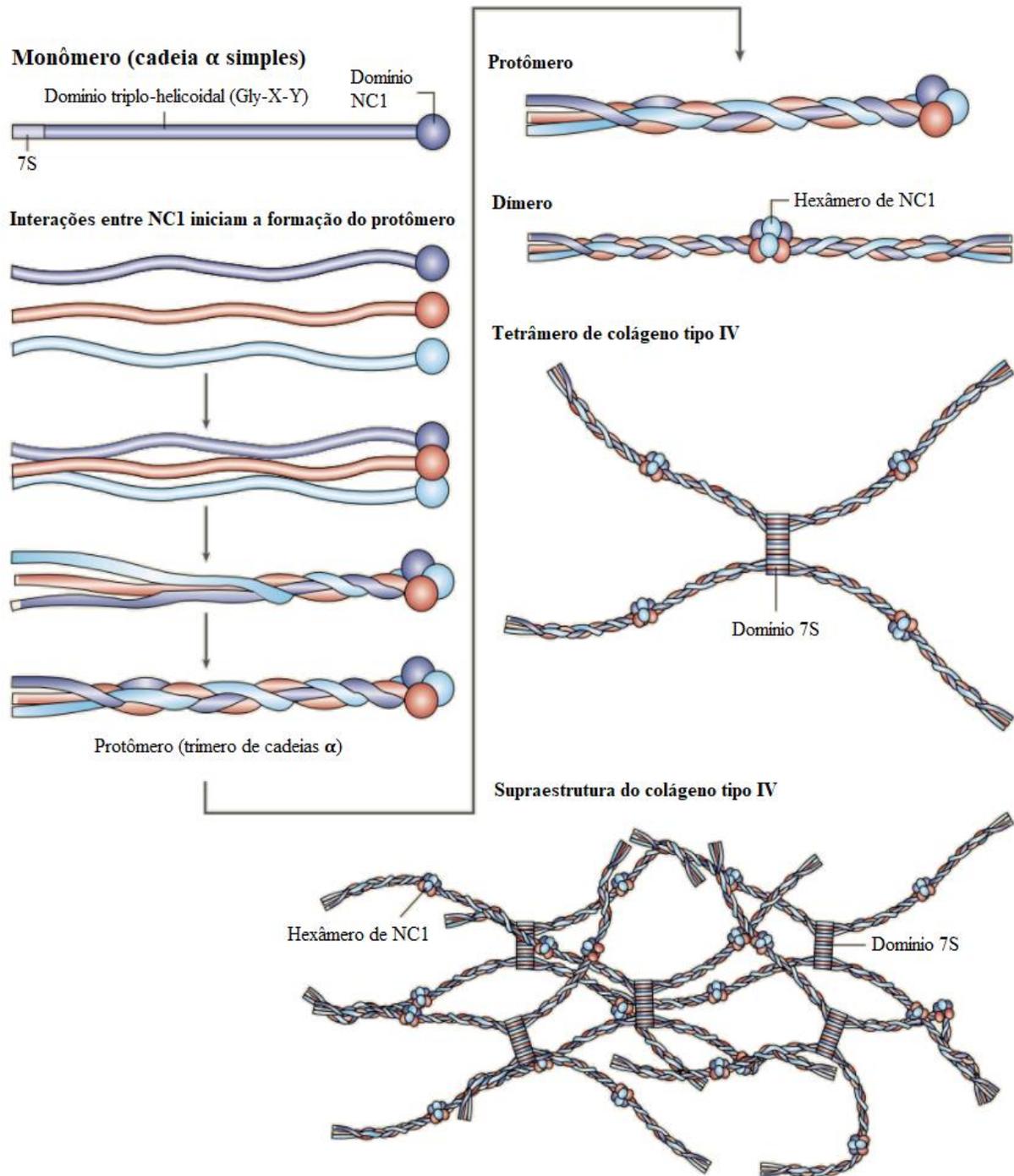


Figura 22. Esquema da construção da supraestrutura em malha do colágeno tipo IV. Três monômeros de cadeia α do colágeno tipo IV se unem pelos seus domínios NC1 e enrolam-se para formar um protômero em tripla-hélice, que se une a outro protômero idêntico também pelo domínio NC1, esse dímero se junta a outros três dímeros pelo domínio 7S, formando um tetrâmero que interage com outros tetrâmeros para construir a supraestrutura do colágeno tipo IV. Imagem adaptada a partir de imagem de Kalluri (2003).

Mutações nos genes que produzem as cadeias $\alpha 3$ (*COL4A3*), $\alpha 4$ (*COL4A4*) e $\alpha 5$ (*COL4A5*) do colágeno IV podem prejudicar a formação de uma tripla-hélice estável e estão associadas a doenças que apresentam comprometimento renal, auditivo e ocular, em especial à Síndrome de Alport (SA) (Reeders, 1992; Kashtan & Michael, 1996; Pirson, 1999).

A principal característica fenotípica da SA é o comprometimento renal, desde hematúria e proteinúria até perda progressiva da função do órgão e eventual insuficiência renal, que pode levar o paciente ao óbito. O sistema auditivo também costuma ser afetado, com desenvolvimento de surdez neurossensorial bilateral na fase infanto-juvenil. Ainda podem ocorrer alterações oculares, sendo a lenticone anterior (deformação no cristalino que pode levar à catarata) o achado mais comum (Kashtan & Michael, 1996; Hudson et al, 2003; Savige, 2018; Nozu et al, 2019).

Na cóclea, o trímero $\alpha 3(\text{IV})\alpha 4(\text{IV})\alpha 5(\text{IV})$ faz parte da estrutura das membranas tectória e basilar (Kalluri et al, 1998) e do ligamento espiral (Zehnder et al, 2005). O ligamento espiral funciona como um revestimento fibroso do canal coclear e está envolvido na regulação metabólica e iônica desse ambiente (Barozzi et al, 2020), além de atuar como uma ponte entre a parede óssea da cóclea e a membrana basilar, garantindo que essa mantenha-se tensionada (Harvey et al, 2001).

A mecânica que ocasiona a DA em indivíduos com SA ainda não está completamente clara (Barozzi et al, 2020), mas defeitos nas membranas tectória e basilar podem alterar o modo com o qual o estímulo sonoro é enviado aos feixes ciliares das células ciliadas (Kalluri et al, 1998). Merchant et al (2004) propõe que em indivíduos com SA a membrana basilar não está corretamente aderida às células ciliadas externas, prejudicando a distribuição do estímulo sonoro

da membrana para as células, sendo que essa hipótese é apoiada por Barozzi et al (2020). Merchant et al (2004) ainda mostra que em afetados com SA existem infiltrações de células no órgão de Corti similares às que ocorrem ainda na fase fetal, sugerindo que essa estrutura não conseguiu se desenvolver para a fase adulta de maneira adequada. Ademais, Harvey et al (2001) também levantaram a hipótese de que defeitos no ligamento espiral promovidos por deformações na molécula de colágeno reduzem a tensão da membrana basilar, prejudicando seu funcionamento.

Já foram reportados diversos padrões de herança associados à SA. Mutações nos genes *COL4A3* e *COL4A4* (ambos localizados no cromossomo 2) podem apresentar padrões de herança autossômico recessivo, autossômico dominante ou digênico. Por outro lado, mutações que ocorrem no gene *COL4A5*, localizado no cromossomo X, apresentam o padrão de herança ligado ao X (Barozzi, 2020). Ainda não existe um consenso sobre a porcentagem de casos que deve ser atribuída a cada tipo de herança. Muitos autores sugerem que 80% dos casos são de herança ligada ao X, 15% são de mutações em homozigose ou heterozigose composta e apenas 5% são de mutações em heterozigose (abarcando os casos de herança digênica também). Mas pesquisas mais recentes com NGS mostram que esses valores podem estar sofrendo um viés por causa de falta de diagnóstico em casos com padrão dominante, uma vez que podem variar muito em relação à manifestação dos sintomas, evidenciando a importância desse método para um diagnóstico mais assertivo (Fallerini et al, 2013; Kamiyoshi et al, 2016; Imafuko et al, 2018; Nozu et al, 2019; Barozzi, 2020). Por exemplo, um estudo realizado por Fallerini et al (2013) com 217 indivíduos aponta 65% dos casos como sendo ligados ao X, 4% recessivos e 31% dominantes.

A diversidade de genes e formas de herança envolvidos na SA resulta em uma heterogeneidade muito grande de fenótipos e idade de manifestação dos sintomas, especialmente em casos autossômicos dominantes, que apresentam a maior abrangência de fenótipos, inclusive a ausência de sintomas detectáveis ou ainda a presença de apenas ocorrências audiológicas ou oculares, mesmo que essas sejam situações mais raras. Esse fator dificulta o diagnóstico, pois não apresenta o quadro clínico clássico da doença (Longo et al, 2002; Kashtan et al, 2018; Kashtan, 2020).

A mutação c.3829G>A/p.(Gly1277Ser) encontrada em heterozigose no exon 43 de 52 do gene *COL4A3* do paciente ALS031, acarreta em uma troca de glicina por serina, na região de domínio triplo-helicoidal, ou seja essa variante gera uma interrupção não programada na sequência de repetições Gly-X-Y. A glicina é um aminoácido pequeno e o seu tamanho é fundamental para o encaixe correto das cadeias α que formam o trímero. Uma substituição desse aminoácido pode afetar a formação e estabilidade da tripla-hélice, gerando defeitos estruturais na molécula de colágeno (Rana et al, 2007). Na literatura, essa variante já foi relatada como patogênica em dois estudos diferentes, em Heidet et al (2001), que relataram a ocorrência da mesma em heterozigose em paciente com SA, e em Fallerini et al (2017), em forma digênica (associada a mutações em *COL4A4* e *COL4A5*) em três famílias não relacionadas de um total de cinco famílias italianas afetadas com SA.

Até o momento o único sintoma relatado para o paciente ALS031 é de surdez neurossensorial profunda bilateral. Avaliando apenas esse quadro, não seria prudente propor um diagnóstico de SA, porém no sequenciamento foi encontrada a mutação c.3829G>A/p.(Gly1277Ser) em heterozigose no gene *COL4A3*, dessa forma, levando em conta

o que já foi exposto sobre essa síndrome e essa mutação, esse diagnóstico deve ser considerado como uma explicação plausível para sua DA. Também é possível que ele possua algum comprometimento renal que não tenha sido identificado. Ainda que não seja constatado nenhum prejuízo do rim nesse momento, é possível que no futuro ele venha a apresentar algum sintoma além da surdez, uma vez que a idade de manifestação dos sintomas é muito variável e ele apresentava 17 anos na época da coleta de material e dados. Ademais, foi relatado que seu pai precisou fazer diálise por motivo de hipertensão, o que pode ser um indicativo de doença renal crônica não diagnosticada corretamente, uma vez que disfunção renal pode resultar na elevação da pressão sanguínea (Sarafidis et al, 2007; Franco, 2002), por isso, é recomendado que o pai de ALS 31 também seja submetido a teste de sequenciamento no gene COL4A3 a fim de averiguar se possui a mesma variante, mesmo que não haja relato de DA manifestada por esse indivíduo. Dessa forma, é de extrema importância que esse paciente seja encaminhado para acompanhamento com médicos especializados e que sejam feitos mais exames específicos para avaliação do funcionamento renal.

5.2.4 ALS033 e ALS038

Os pacientes apresentaram a mutação missense c.4198G>A/p.(Val1400Met) em homozigose no gene *MYO15A*, que produz a miosina 15A. Essa variante se encontra no domínio motor da proteína, região extremamente conservada (Belyantseva et al., 2005). O alelo mutante (A) foi observado em 100% das 30 e das 45 leituras geradas nesse locus para os indivíduos ALS033 e ALS038, respectivamente. (Figura 23). Mutações patogênicas nesse gene estão associadas à surdez autossômica recessiva 3 (DFNB3), caracterizada por perda auditiva neurossensorial profunda não síndrômica congênita, mesmas condições apresentadas por esses dois probandos.

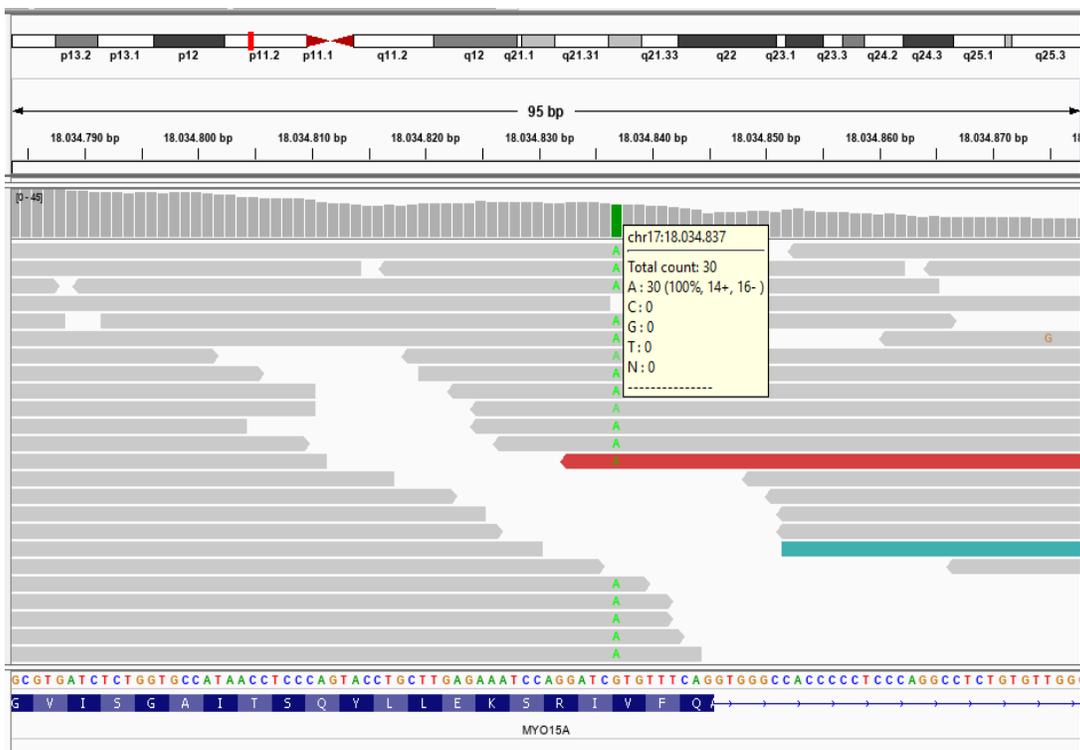


Figura 23. Variante identificada em homozigose no paciente ALS033. Observe que todos os *reads* apresentam a base derivada, sinalizando homozigose para o locus. Imagem gerada pelo programa IGV - *Integrative Genomes Viewers*.

O alelo mutante já foi descrito como tendo baixa frequência, sendo mais encontrado em populações latinas (Fonte: GnomAD - *The Genome Aggregation Database*, 2019) (Tabela 8).

Tabela 8. Frequência do alelo mutante (A) em diversas populações de acordo com o GnomAD.*

População	Alelo Variante	N Alelos	Homozigotos	Frequência alélica
Latina	7	35356	0	0,0001980
Leste asiática	1	19534	0	0,00005119
Africana	1	24174	0	0,00004137
Européia (não finlandesa)	2	128604	0	0,00001555
Judeus asquenazes	0	10360	0	0
Européia (finlandesa)	0	25028	0	0
Outros	0	7140	0	0
Sul asiático	0	30596	0	0
Mulheres	7	128002	0	0,00005469
Homens	4	152790	0	0,00002618
Total	11	280792	0	0,00003917

*Dados retirados de <<https://gnomad.broadinstitute.org/variant/17-18034837-G-A>>

A miosina 15A se liga a proteína *whirlin*, codificada pelo gene *WHRN* (localizado no cromossomo 9), e a transporta aos estereocílios (Belyantseva et al., 2005). Durante o desenvolvimento da célula ciliada, os estereocílios possuem o mesmo tamanho e são indistinguíveis das demais microvilosidades. Quando a proteína *whirlin* se liga ao estereocílio, inicia-se uma cascata de reações que vai resultar no alongamento dessa microvilosidade. Assim, a arquitetura em escada do feixe ciliar é garantida por meio de diferentes quantidades de *whirlin* distribuídas ao longo da célula ciliada - estereocílios que recebem quantidades menores dessa proteína apresentam tamanho diminuído (Tilney et al., 1988). Logo, a interação das proteínas miosina 15A e *whirlin* é imprescindível para a morfogênese das células ciliadas (Belyantseva et al., 2005). Dessa forma, mutações que alteram a funcionalidade das proteínas miosina 15A e *whirlin* podem promover defeitos morfológicos dos estereocílios ao impedir a correta elongação dessas estruturas, por isso são possíveis etiologias para surdez não-sindrômica neurosensorial (Figura 24).

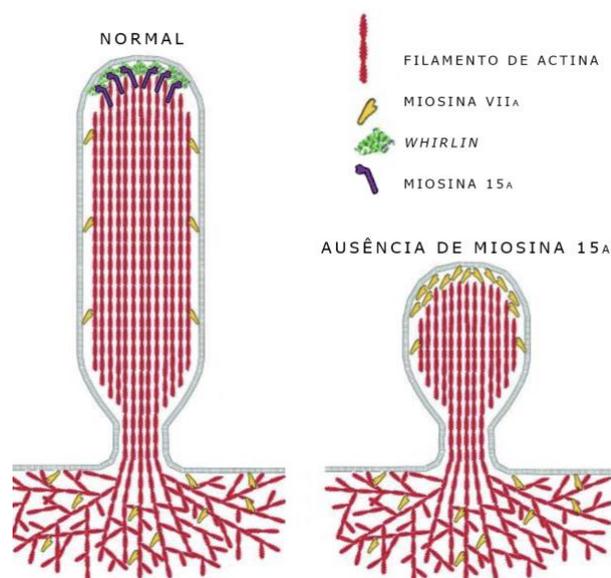


Figura 24. Esquema mostrando a diferença de tamanho entre um estereocílio normal e um estereocílio com ausência de miosina 15A, no qual há crescimento abaixo do esperado, uma vez que essa proteína transporta ao estereocílio a proteína precursora de polimerização do filamento de actina, *whirlin*. Imagem adaptada a partir de imagem de Prosser et al (2008).

Manzoli et al. (2016) conduziram um estudo em que o gene *MYO15A* de oito pessoas nascidas em Monte Santo (BA), foi sequenciado, sendo que seis dessas pessoas apresentaram a mesma mutação c.4198G>A/p.(Val1400Met) em homozigose e perda de audição neurossensorial profunda, congênita, bilateral e não progressiva, assim como os probandos. Essa mesma variante também foi identificada na Turquia. Entre as 104 famílias turcas não aparentadas estudadas, cinco apresentaram mutações no gene *MYO15A*, dentre as quais uma delas era a c.4198G>A/p.(Val1400Met) (Cengiz et al, 2010). Os autores também compararam seus achados com os de Cengiz et al. (2010), sugerindo que essa variante deve ser muito antiga ou que ela apareceu duas vezes durante a história. A segunda conclusão é a mais provável para explicar como ela apareceu em duas populações tão diferentes e afastadas geograficamente.

Dessa forma, a mutação em questão foi proposta como etiologia da surdez dos probandos ALS033 e AL S038 e seus parentes afetados (Figuras 9.G e 9.H), corroborado pelos estudos citados. Ademais, esse achado também ajuda a confirmar o parentesco entre as duas famílias.

6. CONCLUSÃO

Foram apresentadas sugestões de diagnóstico molecular para seis dos 15 probandos estudados neste trabalho. Como todas as variantes foram encontradas através do sequenciamento *SeqCap EZ Inherited Disease Panel*, constata-se que esse é um método válido para o diagnóstico molecular de DA.

Dentre as mutações encontradas, destaca-se a c.4198G>A/p.(Val1400Met) no gene *MYO15A*, compartilhada pelos indivíduos ALS033 e ALS038, que corrobora a suspeita de parentesco entre eles.

Recomenda-se exames de sequenciamento de genes específicos nos parentes de ALS013, ALS029 e ALS019. Também é indicado que o pai de ALS031 seja submetido a análises clínicas audiológicas e ao sequenciamento do gene *COL4A3*, além do encaminhamento de ambos a profissional de saúde especializado para avaliação do funcionamento renal.

Os resultados encontrados refutam a hipótese de que todos os pacientes sejam aparentados e possuam a mesma mutação causativa. Contudo não se deve descartar a possibilidade de que os indivíduos ainda não diagnosticados possam ser aparentados e compartilhem uma variante causativa ainda não identificada.

Por fim, para que se possa continuar a investigação da etiologia genética da DA dos demais pacientes, é necessário que se faça uma entrevista mais detalhada acerca das características clínicas e do histórico familiar. Também é indicado um estudo mais aprofundado de parentesco entre os pacientes.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alford, R. L., Arnos, K. S., Fox, M., Lin, J. W., Palmer, C. G., Pandya, A., ... & Professional Practice and Guidelines Committee. (2014). American College of Medical Genetics and Genomics guideline for the clinical evaluation and etiologic diagnosis of hearing loss. *Genetics in Medicine*, 16(4), 347.
- Angeli, S., Lin, X., & Liu, X. Z. (2012). Genetics of hearing and deafness. *The Anatomical Record: Advances in Integrative Anatomy and Evolutionary Biology*, 295(11), 1812-1829.
- Barozzi, S., Soi, D., Intieri, E., Giani, M., Aldè, M., Tonon, E., ... & Ambrosetti, U. (2020). Vestibular and audiological findings in the Alport syndrome. *American Journal of Medical Genetics Part A*, 182(10), 2345-2358.
- Belyantseva, I. A., Boger, E. T., Naz, S., Frolenkov, G. I., Sellers, J. R., Ahmed, Z. M., ... & Friedman, T. B. (2005). Myosin-XVa is required for tip localization of whirlin and differential elongation of hair-cell stereocilia. *Nature cell biology*, 7(2), 148.
- Beurg, M., Evans, M. G., Hackney, C. M., & Fettiplace, R. (2006). A large-conductance calcium-selective mechanotransducer channel in mammalian cochlear hair cells. *Journal of Neuroscience*, 26(43), 10992-11000.
- Boëda, B., El-Amraoui, A., Bahloul, A., Goodyear, R., Daviet, L., Blanchard, S., ... & Houdusse, A. (2002). Myosin VIIa, harmonin and cadherin 23, three Usher I gene products that cooperate to shape the sensory hair cell bundle. *The EMBO journal*, 21(24), 6689-6699.
- Cardoso, G. C., de Oliveira, M. Z., Paixão-Côrtes, V. R., Castilla, E. E., & Schuler-Faccini, L. (2019). Clusters of genetic diseases in Brazil. *Journal of community genetics*, 10(1), 121-128.
- Cengiz, F. B., Duman, D., Sirmacı, A., Tokgöz-Yılmaz, S., Erbek, S., Öztürkmen-Akay, H., ... & Tekin, M. (2010). Recurrent and private MYO15A mutations are associated with deafness in the Turkish population. *Genetic testing and molecular biomarkers*, 14(4), 543-550.
- Clark, M. M., Stark, Z., Farnaes, L., Tan, T. Y., White, S. M., Dimmock, D., & Kingsmore, S. F. (2018). Meta-analysis of the diagnostic and clinical utility of genome and exome sequencing and chromosomal microarray in children with suspected genetic diseases. *NPJ genomic medicine*, 3(1), 1-10.
- Conselho Federal de Fonoaudiologia. (2017). Guia de orientações na avaliação audiológica básica.
- Costa, F. A. S., Quadrado, A. V. M., Brandão, A. P., Leme, B. A. P., Carneiro, B. V., Castanho, D. L. M., ... & Rocha, C. H. R. (2013). Síndrome da Rubéola Congênita: revisão de literatura.

Revista de Medicina e Saúde de Brasília, 2(1).

- De Keulenaer, S., Hellemans, J., Lefever, S., Renard, J. P., De Schrijver, J., Van de Voorde, H., ... & Scharlaken, B. (2012). Molecular diagnostics for congenital hearing loss including 15 deafness genes using a next generation sequencing platform. *BMC medical genomics*, 5(1), 17.
- DeRosier, D. J., & Tilney, L. G. (2000). F-actin bundles are derivatives of microvilli: What does this tell us about how bundles might form?. *The Journal of cell biology*, 148(1), 1.
- Dror, A. A., & Avraham, K. B. (2010). Hearing impairment: a panoply of genes and functions. *Neuron*, 68(2), 293-308.
- Fallerini, C., Dosa, L., Tita, R., Del Prete, D., Feriozzi, S., Gai, G., ... & Ariani, F. (2014). Unbiased next generation sequencing analysis confirms the existence of autosomal dominant Alport syndrome in a relevant fraction of cases. *Clinical genetics*, 86(3), 252-257.
- Fallerini, C., Baldassarri, M., Trevisson, E., Morbidoni, V., La Manna, A., Lazzarin, R., ... & Ariani, F. (2017). Alport syndrome: impact of digenic inheritance in patients management. *Clinical genetics*, 92(1), 34-44.
- Feher, J. J. (2017). *Quantitative human physiology: an introduction*. Academic press., p 442-446.
- Franco, R. J. D. S. (2002). Hipertensão secundária à nefropatia: diagnóstico e tratamento. *Rev. bras. hipertens*, 141-147.
- Gelfand SA. The contralateral acoustic reflex threshold. In: Silman S. The acoustic reflex: basic principles and clinical applications. Academic Press: Orlando, Florida; 1984. P. 137-86.
- GnomAD - The Genome Aggregation Database. Disponível em: <<https://gnomad.broadinstitute.org/variant/17-18034837-G-A>>. Acesso em: 29 de janeiro de 2021.
- Goodwin, S., McPherson, J. D., & McCombie, W. R. (2016). Coming of age: ten years of next-generation sequencing technologies. *Nature Reviews Genetics*, 17(6), 333.
- Grati, M. H., & Kachar, B. (2011). Myosin VIIa and sans localization at stereocilia upper tip-link density implicates these Usher syndrome proteins in mechanotransduction. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108(28), 11476-11481.
- Haitin, Y., & Attali, B. (2008). The C-terminus of Kv7 channels: a multifunctional module. *The Journal of physiology*, 586(7), 1803-1810.
- Harvey, S. J., Mount, R., Sado, Y., Naito, I., Ninomiya, Y., Harrison, R., ... & Thorner, P. S.

(2001). The inner ear of dogs with X-linked nephritis provides clues to the pathogenesis of hearing loss in X-linked Alport syndrome. *The American journal of pathology*, 159(3), 1097-1104.

Hasson, T., Gillespie, P. G., Garcia, J. A., MacDonald, R. B., Zhao, Y. D., Yee, A. G., ... & Corey, D. P. (1997). Unconventional myosins in inner-ear sensory epithelia. *The Journal of cell biology*, 137(6), 1287-1307.

Heidet, L., Arrondel, C., Forestier, L., Cohen-Solal, L., Mollet, G., Gutierrez, B., ... & Antignac, C. (2001). Structure of the human type IV collagen gene COL4A3 and mutations in autosomal Alport syndrome. *Journal of the American Society of Nephrology*, 12(1), 97-106.

Hereditary Hearing loss Homepage. Disponível em: <<http://hereditaryhearingloss.org/>>. Acesso em: 29 de janeiro de 2021.

Hertzano, R., Shalit, E., Rzadzinska, A. K., Dror, A. A., Song, L., Ron, U., ... & Ben-Tal, N. (2008). A Myo6 mutation destroys coordination between the myosin heads, revealing new functions of myosin VI in the stereocilia of mammalian inner ear hair cells. *PLoS Genet*, 4(10), e1000207.

Hudson, B. G., Reeders, S. T., & Tryggvason, K. (1993). Type IV collagen: structure, gene organization, and role in human diseases. Molecular basis of Goodpasture and Alport syndromes and diffuse leiomyomatosis. *Journal of Biological Chemistry*, 268(35), 26033-26036.

Hudson, B. G., Tryggvason, K., Sundaramoorthy, M., & Neilson, E. G. (2003). Alport's syndrome, Goodpasture's syndrome, and type IV collagen. *New England Journal of Medicine*, 348(25), 2543-2556.

Hudspeth, A. J. (1989). How the ear's works work. *Nature*, 341(6241), 397-404.

IBGE-Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística Homepage. Disponível em: <<https://sidra.ibge.gov.br/tabela/3426#>>. Acesso em: 29 de janeiro de 2021.

Illumina, I. (2017). An introduction to next-generation sequencing technology.

Imafuku, A., Nozu, K., Sawa, N., Hasegawa, E., Hiramatsu, R., Kawada, M., ... & Ubara, Y. (2018). Autosomal dominant form of type IV collagen nephropathy exists among patients with hereditary nephritis difficult to diagnose clinicopathologically. *Nephrology*, 23(10), 940-947.

Kalluri, R. (2003). Basement membranes: structure, assembly and role in tumour angiogenesis. *Nature Reviews Cancer*, 3(6), 422-433.

Kalluri, R., Gattone, V. H., & Hudson, B. G. (1998). Identification and localization of type IV collagen chains in the inner ear cochlea. *Connective tissue research*, 37(1-2), 143-150.

- Kamiyoshi, N., Nozu, K., Fu, X. J., Morisada, N., Nozu, Y., Ye, M. J., ... & Iijima, K. (2016). Genetic, clinical, and pathologic backgrounds of patients with autosomal dominant Alport syndrome. *Clinical Journal of the American Society of Nephrology*, 11(8), 1441-1449.
- Kashtan, C. E., & Michael, A. F. (1996). Alport syndrome. *Kidney international*, 50(5), 1445-1463.
- Kashtan, C. E. (2001). Collagen IV-related Nephropathies (Alport syndrome and thin basement membrane nephropathy). *Am J Kidney Dis*, 23(6), 756-758.
- Kashtan, C. E., Ding, J., Garosi, G., Heidet, L., Massella, L., Nakanishi, K., ... & Gross, O. (2018). Alport syndrome: a unified classification of genetic disorders of collagen IV $\alpha 345$: a position paper of the Alport Syndrome Classification Working Group. *Kidney international*, 93(5), 1045-1051.
- Kashtan, C. E. (2020). Alport Syndrome: Achieving Early Diagnosis and Treatment. *American Journal of Kidney Diseases*.
- Kazmierczak, P., Sakaguchi, H., Tokita, J., Wilson-Kubalek, E. M., Milligan, R. A., Müller, U., & Kachar, B. (2007). Cadherin 23 and protocadherin 15 interact to form tip-link filaments in sensory hair cells. *Nature*, 449(7158), 87-91.
- Keinan, A., Mullikin, J. C., Patterson, N., & Reich, D. (2007). Measurement of the human allele frequency spectrum demonstrates greater genetic drift in East Asians than in Europeans. *Nature genetics*, 39(10), 1251-1255.
- Khoshnoodi, J., Pedchenko, V., & Hudson, B. G. (2008). Mammalian collagen IV. *Microscopy research and technique*, 71(5), 357-370.
- Kubisch, C., Schroeder, B. C., Friedrich, T., Lütjohann, B., El-Amraoui, A., Marlin, S.,... & Jentsch, T. J. (1999). KCNQ4, a novel potassium channel expressed in sensory outer hair cells, is mutated in dominant deafness. *Cell*, 96(3), 437-446.
- Kühn, K. (1995). Basement membrane (type IV) collagen. *Matrix Biology*, 14(6), 439-445.
- James T. Robinson, Helga Thorvaldsdóttir, Wendy Winckler, Mitchell Guttman, Eric S. Lander, Gad Getz, Jill P. Mesirov. Integrative Genomics Viewer. *Nature Biotechnology* 29, 24–26 (2011).
- Jentsch, T. J. (2000). Neuronal KCNQ potassium channels: physiology and role in disease. *Nature Reviews Neuroscience*, 1(1), 21-30.
- Jerger, J. (1970). Clinical experience with impedance audiometry. *Archives of otolaryngology*, 92(4), 311-324.
- Jerger S, Jerger J. Alterações auditivas: um manual para avaliação clínica. Atheneu: São Paulo;1989.p.102.
- Longo, I., Porcedda, P., Mari, F., Giachino, D., Meloni, I., Deplano, C., ... & De Marchi, M. (2002). COL4A3/COL4A4 mutations: from familial hematuria to autosomal-dominant or

recessive Alport syndrome. *Kidney international*, 61(6), 1947-1956.

Manzoli, G. N., Bademci, G., Acosta, A. X., Félix, T. M., Cengiz, F. B., Foster, J., ... & Blanton, S. H. (2016). Targeted resequencing of deafness genes reveals a founder MYO15A variant in northeastern Brazil. *Annals of human genetics*, 80(6), 327-331.

Mehregan, H., Mohseni, M., Akbari, M., Jalalvand, K., Arzhang, S., Nikzat, N., ... & Najmabadi, H. (2019). Novel Mutations in KCNQ4, LHFPL5 and COCH Genes in Iranian Families with Hearing Impairment.

Merchant, S. N., Burgess, B. J., Adams, J. C., Kashtan, C. E., Gregory, M. C., Santi, P. A., ... & Nadol Jr, J. B. (2004). Temporal bone histopathology in alport syndrome. *The Laryngoscope*, 114(9), 1609-1618.

Mooseker, M. S., & Cheney, R. E. (1995). Unconventional myosins. *Annual review of cell and developmental biology*, 11(1), 633-675.

Morton, N. E. (1991). Genetic epidemiology of hearing impairment. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 630(1), 16-31.

Nozu, K., Nakanishi, K., Abe, Y., Udagawa, T., Okada, S., Okamoto, T., ... & Iijima, K. (2019). A review of clinical characteristics and genetic backgrounds in Alport syndrome. *Clinical and experimental nephrology*, 23(2), 158-168.

OMIM - Online Mendelian Inheritance in Man Homepage. Disponível em: <<http://omim.org/entry/121011>>. Acesso em: 29 de janeiro de 2021.

Organização Mundial de Saúde – OMS. Disponível em: <https://www.who.int/health-topics/hearing-loss#tab=tab_1>. Acesso em: 29 de janeiro de 2021.

Pelaseyed, T., & Bretscher, A. (2018). Regulation of actin-based apical structures on epithelial cells. *Journal of cell science*, 131(20).

Pirson, Y. (1999). Making the diagnosis of Alport's syndrome. *Kidney international*, 56(2), 760-775.

Prefeitura de Boca da Mata. Disponível em: <<https://bocadamata.al.gov.br/v5/historico/>>. Acesso em: 29 de janeiro de 2021.

Prockop, D. J., & Kivirikko, K. I. (1995). Collagens: molecular biology, diseases, and potentials for therapy. *Annual review of biochemistry*, 64(1), 403-434.

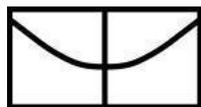
Prosser, H. M., Rzadzinska, A. K., Steel, K. P., & Bradley, A. (2008). Mosaic complementation demonstrates a regulatory role for myosin VIIa in actin dynamics of stereocilia. *Molecular and cellular biology*, 28(5), 1702-1712.

- Reeders, S. T. (1992). Molecular genetics of hereditary nephritis. *Kidney international*, 42(3), 783-792.
- Rana, K., Tonna, S., Wang, Y. Y., Sin, L., Lin, T., Shaw, E., ... & Savige, J. (2007). Nine novel COL4A3 and COL4A4 mutations and polymorphisms identified in inherited membrane diseases. *Pediatric Nephrology*, 22(5), 652-657.
- Ricard-Blum, S. (2011). The collagen family. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 3(1), a004978.
- Richards, S., Aziz, N., Bale, S., Bick, D., Das, S., Gastier-Foster, J., ... & Voelkerding, K. (2015). Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: a joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology. *Genetics in medicine*, 17(5), 405-423.
- Rzadzinska, A. K., Nevalainen, E. M., Prosser, H. M., Lappalainen, P., & Steel, K. P. (2009). Myosin VIIa interacts with Twinfilin-2 at the tips of mechanosensory stereocilia in the inner ear. *PLoS One*, 4(9), e7097.
- Sarafidis, P. A., Khosla, N., & Bakris, G. L. (2007). Antihypertensive therapy in the presence of proteinuria. *American Journal of Kidney Diseases*, 49(1), 12-26.
- Savige, J. (2018). Alport syndrome: deducing the mode of inheritance from the presence of haematuria in family members. *Pediatric Nephrology*, 35(1), 59-66.
- Schwander, M., Kachar, B., & Müller, U. (2010). Review series: The cell biology of hearing. *The Journal of cell biology*, 190(1), 9.
- Senften, M., Schwander, M., Kazmierczak, P., Lillo, C., Shin, J. B., Hasson, T., ... & Müller, U. (2006). Physical and functional interaction between protocadherin 15 and myosin VIIa in mechanosensory hair cells. *Journal of Neuroscience*, 26(7), 2060-2071.
- Shearer AE, Hildebrand MS, Smith RJH. Hereditary Hearing Loss and Deafness Overview. 1999 Feb 14 [Atualizado em 27 Jul 2017]. In: Adam MP, Ardinger HH, Pagon RA, et al., editors. GeneReviews® [Internet]. Seattle (WA): University of Washington, Seattle; 1993-2021. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1434/>
- Silman, S., & Silverman, C. A. (1997). Basic audiologic testing. *Silman S, Silverman CA. Auditory diagnosis: principles and applications. San Diego: Singular Publishing Group*, 44-52.
- Silverthorn, D. U. (2017). *Fisiologia humana: uma abordagem integrada*. 7ª edição. Artmed editora. 960 páginas.
- Sokac, A. M., & Bement, W. M. (2000). Regulation and expression of metazoan unconventional

myosins. *International Review of Cytology*, 200, 197-304.

- Su, Z., Ning, B., Fang, H., Hong, H., Perkins, R., Tong, W., & Shi, L. (2011). Next-generation sequencing and its applications in molecular diagnostics. *Expert review of molecular diagnostics*, 11(3), 333-343.
- Sun, Y., Chen, J., Sun, H., Cheng, J., Li, J., Lu, Y., ... & Yuan, H. (2011). Novel missense mutations in MYO7A underlying postlingual high-or low-frequency non-syndromic hearing impairment in two large families from China. *Journal of human genetics*, 56(1), 64-70.
- Tilney, L. G., Tilney, M. S., & Cotanche, D. A. (1988). New observations on the stereocilia of hair cells of the chick cochlea. *Hearing research*, 37(1), 71-82.
- Tilney, L. G., Tilney, M. S., & DeRosier, D. J. (1992). Actin filaments, stereocilia, and hair cells: how cells count and measure. *Annual review of cell biology*, 8(1), 257-274.
- Van Camp G, Smith RJH. Hereditary Hearing Loss Homepage. <<https://hereditaryhearingloss.org>> Acesso em: 29 de janeiro de 2021.
- VarSome: The Human Genomic Variant Search Engine*. Christos Kopanos, Vasilis Tsiolkas, Alexandros Kouris, Charles E. Chapple, Monica Albarca Aguilera, Richard Meyer, and Andreas Massouras. *Oxford Bioinformatics*, bty897, 30 October 2018
- Voelkerding, K. V., Dames, S. A., & Durtschi, J. D. (2009). Next-generation sequencing: from basic research to diagnostics. *Clinical chemistry*, 55(4), 641-658.
- Willems, P. J. (2000). Genetic causes of hearing loss. *New England Journal of Medicine*, 342(15), 1101-1109.
- Wu, L., Pan, L., Wei, Z., & Zhang, M. (2011). Structure of MyTH4-FERM domains in myosin VIIa tail bound to cargo. *Science*, 331(6018), 757-760.
- Xiao, Q., Hu, X., Wei, Z., & Tam, K. Y. (2016). Cytoskeleton molecular motors: structures and their functions in neuron. *International journal of biological sciences*, 12(9), 1083.
- Yamamoto, N., Mutai, H., Namba, K., Goto, F., Ogawa, K., & Matsunaga, T. (2020). Clinical Profiles of DFNA11 at Diverse Stages of Development and Aging in a Large Family Identified by Linkage Analysis. *Otology & Neurotology*, 41(6), e663-e673.
- Zehnder, A. F., Adams, J. C., Santi, P. A., Kristiansen, A. G., Wacharasindhu, C., Mann, S., ... & Merchant, S. N. (2005). Distribution of type IV collagen in the cochlea in Alport syndrome. *Archives of Otolaryngology–Head & Neck Surgery*, 131(11), 1007-1013.

ANEXO A - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido



Universidade de Brasília

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

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido – TCLE

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

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

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

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

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

Informamos que o Senhor (a) poderá se recusar a responder qualquer questão (ou participar de qualquer procedimento) que lhe traga constrangimento, podendo desistir de participar da pesquisa em qualquer momento sem nenhum prejuízo para o (a) senhor(a) e nenhum comprometimento em seu acompanhamento médico. Sua participação é voluntária, isto é, não há qualquer tipo de pagamento por sua colaboração. Caso solicite e mediante comprovação, o senhor(a) poderá ser ressarcido(a) pelos gastos com deslocamento e alimentação devido à participação nessa pesquisa. Além disso, será garantido atendimento imediato e /ou indenização diante de eventuais danos **comprovadamente** decorrentes dessa pesquisa, vistas as medidas

administrativas e judiciais cabíveis.

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

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

Caso o (a) Senhor (a) tenha sido fotografado (a), solicitamos a sua autorização para a utilização das fotografias em publicações científicas, teses e/ou dissertações acadêmicas e atividades relacionadas: () autorizo () não autorizo.

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.

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^[1]Campus Universitário Darcy Ribeiro – Brasília/DF^[1]
Tel: (61) 3107-1947/ (61) 8334-8973/ (63) 8114-1174

ANEXO B - Questionário Clínico

Universidade de Brasília Departamento de Genética e Morfologia Laboratório de Genética
n^o ALS

Universidade Estadual de Ciências da Saúde de Alagoas Núcleo de Saúde Materno Infantil e do Adolescente

FICHA CADASTRAL PARA DOADORES DE MATERIAL BIOLÓGICO PROJETO PPSUS - Surdez não-sindrômica

Data da Coleta: ____/____/____

IDENTIFICAÇÃO

Nome: _____

Endereço: _____

CEP: _____

Telefone (1): (__) _____ Telefone (2): (__) _____

e-

mail: _____

—

Documento de identificação

Tipo: _____ Número: _____ Data de

expedição: _____

Nascimento: ____/____/____ Idade na coleta: ____ Sexo (biológico): F[] M[]

Local de Nascimento: _____ Adoção: S[] N[]

Residência dos pais ao nascimento (se nasceu fora de Alagoas): _____

FILIAÇÃO

Mãe: _____

Código: _____ **Local de nascimento:** _____

Tempo em Boca da Mata (se imigrante): _____ Motivo da mudança: _____

Pai: _____

Código: _____ **Local de nascimento:** _____

Tempo em Boca da Mata (se imigrante): _____ Motivo da mudança: _____

Consanguinidade entre os pais: S[] N[]

Avó materna: _____

Código: Local de nascimento: _____

Avô materno: _____

Código: Local de nascimento: _____

Consanguinidade entre os avós: S[] N[]

Avó partena: _____

Código: Local de nascimento: _____

Avô paterno: _____

Código: Local de nascimento: _____

Consanguinidade entre os avós: S[] N[]

CLASSIFICAÇÃO FENOTÍPICA E ANCESTRALIDADE

Autoatribuída

Categorias do IBGE:

Preto[] Pardo[] Branco[] Amarelo[] Indígena[] Não declarada[]

IRMÃOS

Feminino: _____ Masculino: _____ (Listar no final)

Gêmeos: Não [] Sim [] O doador [] Irmãos []

Univitelinos [] Bivitelinos [] Sexo: _____

Histórico de gemelaridade na família próxima: Sim [] Não [] Não sei []

se sim, listar _____

DOENÇAS NA FAMÍLIA

Outros casos de

surdez: _____

Cegueira: _____

Deficiência intelectual: _____

Malformações: _____

Outros relevantes: _____

Quem respondeu o questionário:

IRMANDADE

1. Nome _____
Código _____ Data de nascimento __/__/__ Sexo (biológico):F [] M []
Local de nascimento _____
2. Nome _____
Código _____ Data de nascimento __/__/__ Sexo (biológico):F [] M []
Local de nascimento _____
3. Nome _____
Código _____ Data de nascimento __/__/__ Sexo (biológico):F [] M []
Local de nascimento _____
4. Nome _____
Código _____ Data de nascimento __/__/__ Sexo (biológico):F [] M []
Local de nascimento _____
5. Nome _____
Código _____ Data de nascimento __/__/__ Sexo (biológico):F [] M []
Local de nascimento _____
6. Nome _____
Código _____ Data de nascimento __/__/__ Sexo (biológico):F [] M []
Local de nascimento _____
7. Nome _____
Código _____ Data de nascimento __/__/__ Sexo (biológico):F [] M []
Local de nascimento _____
8. Nome _____
Código _____ Data de nascimento __/__/__ Sexo (biológico):F [] M []
Local de nascimento _____
9. Nome _____
Código _____ Data de nascimento __/__/__ Sexo (biológico):F [] M []
Local de nascimento _____
10. Nome _____
Código _____ Data de nascimento __/__/__ Sexo (biológico):F [] M []
Local de nascimento _____

ANEXO C - Genes sequenciados no *Inherited disease panel* relacionados com deficiência auditiva

Genes relacionados à deficiência auditiva não sindrômica:

ACTG1		LOXHD1
	DSPP	
ADCY1		LRTOMT
	ELMOD3	
BDNF		MARVELD2
	EPS8	
BSND		MET
	EPS8	
CABP2		MSRB3
	ESPN	
CCDC50		MYH9
	ESRRB	
CDH23		MYH14
	EYA4	
CEACAM16		MYO3A
	GIPC3	
CIB2		MYO6
	GJB2	
CLDN14		MYO7A
	GJB3	
CLIC5		MYO15A
	GJB6	
COCH		NARS2
	GPSM2	
COL4A6		OTOA
	GRHL2	
COL11A2		OTOF
	GRXCR1	
CRYM		OTOG
	GRXCR2	
DFNA5		OTOGL
	HGF	
DFNB31		P2RX2
	ILDR1	
DFNB59		PCDH15
	KARS	
DIABLO		PNPT1
	KCNQ4	
DIAPH1		POU3F4
	LHFPL5	
DIAPH3		POU4F3

PRPS1	SMPX	TMPRSS3
RDX	STRC	TNC
SERPINB6	SYNE4	TPRN
SIX1	TBC1D24	TRIOBP
SLC17A8	TECTA	TSPEAR
SLC26A4	TJP2	USH1C
SLC26A5	TMC1	WFS1
SLITRK6	TMIE	

Genes relacionados à deficiência auditiva sindrômica:

ABHD12		COL9A3
	CHD7	
ACTG1		COL11A1
	CHSY1	
ALMS1		COL11A2
	CIB2	
ANKH		DCAF17
	CLPP	
ATP6V1B1		DFNB31
	CLRN1	
BCS1L		DLX5
	COL2A1	
BSND		DNMT1
	COL4A3	
BTD		EDN3
	COL4A4	
C10orf2		EDNRB
	COL4A5	
CACNA1D		EYA1
	COL4A6	
CD151		FGF3
	COL9A1	
CDH23		FOXI1
	COL9A2	
CDKN1C		GATA3

GJA1	NDP	SLC52A2
HARS	NLRP3	SLC52A3
HARS2	PAX3	SLITRK6
HOXB1	PCDH15	SMAD4
KCNE1	PDZD7	SNAI2
KCNJ10	PEX1	SOX10
KCNQ1	PEX6	TCOF1
KIT	PEX26	TFAP2A
LARS2	POLR1C	TIMM8A
LRP2	POLR1D	TYR
MAN2B1	SALL1	USH1C
MANBA	SEMA3E	USH1G
MGP	SIX1	USH2A
MITF	SIX5	VCAN
MYH9	SLC19A2	WFS1
MYO7A	SLC26A4	