FÁBIO TADEU ARROJO MARTINS

OTIMIZAÇÃO DE RASTREAMENTO SIMULTÂNEO DAS PRINCIPAIS MUTAÇÕES ENVOLVIDAS NA SURDEZ NEUROSSENSORIAL NÃO-SINDRÔMICA UTILIZANDO A PLATAFORMA *TAQMAN[®] OPENARRAY*[™] *GENOTYPING*

CAMPINAS 2013 **UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS**

SECRETARIA DE FÓS-GRADUAÇÃO I. B.

i

INSTITUTO DE BIOLOGIA

FÁBIO TADEU ARROJO MARTINS

OTIMIZAÇÃO DE RASTREAMENTO SIMULTÂNEO DAS PRINCIPAIS MUTAÇÕES ENVOLVIDAS NA SURDEZ NEUROSSENSORIAL NÃO-SINDRÔMICA UTILIZANDO A PLATAFORMA *TAQMAN[®] OPENARRAY*[™] *GENOTYPING*

S de ave	malar corre	sponde	à redação f	inal
da tese	defendida	pelo(a)	candidato	(a)
Jakis	Jadell		ofe ma	
e aprovi	ada pela Co	missão .	Julgadora.	

Dissertação apresentada ao Instituto de Biologia para obtenção do Título de Mestre em Genética e Biologia Molecular, na área de Genética Animal e Evolução.

Orientadora: Profª. Drª. Edi Lúcia Sartorato

EL 1

CAMPINAS 2013

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA POR MARA JANAINA DE OLIVEIRA – CRB8/6972 BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA - UNICAMP

Martins, Fábio Tadeu Arrojo, 1989-Otimização de rastreamento simultâneo das principais mutações envolvidas na surdez neurossensorial não-sindrômica utilizando a plataforma TaqMan® OpenArray™Genotyping / Fábio Tadeu Arrojo Martins. – Campinas, SP: [s.n.], 2013.
Orientador: Edi Lucia Sartorato. Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.
1. Surdez. 2. OpenArray. 3. Genotipagem. 4. Otimização. 5. Perda auditiva. 1. Sartorato, Edi Lúcia. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em Inglês: Optimization of simultaneous screening of the main mutations involved in non-syndromic deafness using TaqMan® OpenArray™ Genotyping Platform

Palavras-chave em Inglês: Deafness OpenArray Genotyping Optimization Hearing Loss Área de concentração: Genética Animal e Evolução Titulação: Mestre em Genética e Biologia Molecular Banca examinadora: Edi Lucia Sartorato [Orientador] Renata de Lima Arthur Menino Castilho Data da defesa: 27-02-2013 Programa de Pós Graduação: Genética e Biologia Molecular Campinas, 27 de fevereiro de 2013

BANCA EXAMINADORA

Profª. Drª. Edi Lúcia Sartorato (Orientadora)

Assinatura

Assinatura

Assinatura

Prof^ª. Dr^ª. Renata de Lima

Prof. Dr. Arthur Menino Castilho

Prof^a. Dr^a. Katlin Brauer Massirer

Profª. Drª. Cláudia Vianna Maurer Morelli

Assinatura

Assinatura

"Vencer é nunca desistir!"

(Albert Einstein)

Dedico este trabalho a quem sempre acreditou, apoiou, incentivou e me amou...aos meus pais e minha avó! À Deus por todas experiências vividas em minha vida, boas e ruins que com certeza contribuiram para eu chegar onde hoje estou.

Aos meus pais, Tadeu e Rita e minha avó, Irene, que sempre se preocuparam em educar seus filhos/netos da melhor maneira possível, sabendo cobrar na hora correta, castigar em certos momentos, tornando-se modelo para mim! Com vocês foi que aprendi a fazer tudo da melhor forma possível e de nunca desistir.

Ao meu irmão Renato, pelos momentos de descontração e risadas.

À professora Dr^a. Edi Lúcia Sartorato, por ter me dado a oportunidade de estagiar em seu laboratório e de ser seu aluno de mestrado, apoiando e confiando em meu trabalho. É imensa a honra de trabalhar com uma pessoa importantíssima nesta linha de pesquisa que tanto gosto e que já contribuiu imensamente no campo científico. De mim sempre terá a eterna admiração e gratidão.

Às professoras Dr^a. Mônica Barbosa de Melo e Dr^a. Laura Maria Mariscal Ottoboni por aceitarem pronta e gentilmente a participar da banca avaliadora do exame de qualificação.

À professora Dr^a. Ana Carolina Martins Junqueira pela participação e contribuições na banca prévia à defesa da dissertação.

À professora Dr^a. Renata de Lima por tudo, pelo carinho, oportunidades, dicas e alegrias e orientação durante a graduação e também por participar da banca prévia a defesa e da defesa propriamente dita, podendo acompanhar o meu desenvolvimento desde o começo.

À professora Dr^a. Katlin Massirer, por estar sempre prontamente disposta a ajudar, fazendo parte como membro da pré-banca e da banca do trabalho.

Ao professor Dr. Arthur Menino Castilho por participar da banca examinadora da qualificação e do desfecho de meu trabalho, contribuindo com apontamentos na versão final da dissertação.

A todos professores que estiveram presentes, desde a formação básica até a formação durante a pós-graduação.

Aos meus colegas e amigos da faculdade.

Aos meus colegas e amigos do Laboratório de Genética Molecular Humana, que estavam sempre presentes, em momentos de risadas, tristezas, ajudas, ensinando a crescer, inclusive nas adversidades: Sueli, Vanessa, Paulo, Carol, Pri, Rogério, Nathy, Brutus, Jhonathan, Lilian, Ana Letícia, Zélo, Creyto, Rose, Cris, Helena, Débora, Reginaldo, Flor, Aliane, Mara, Bella, Laura, Taci, Pamela, Fer, Adriana, Luli, Ana Paula, Renata, Mari, Nathy Graviola, Foca, PicJrs e CAFs.

À professora Dr^a. Maricilda Palandi de Mello pelo profissionalismo e simpatia.

À todos funcionários, amigos e colegas do Centro de Biologia Molecular e Engenharia Genética, que sempre contribuiram para um ambiente harmonioso e positivo.

Aos pacientes utilizados e suas famílias.

À minha amiga Dru, que esteve presente em diversos momentos de minha vida, desde o ensino médio, acompanhando e apoiando durante a graduação e pós-graduação, assim como a Hortência, Juçara e Ubiratã. Os levo no meu coração.

À minha amiga Denise, sempre presente em momentos engraçados e complicados, alegres e tristes. Agradeço por conhecê-la e por cada momento/loucura vivida. Você é pequena por fora, mas gigante por dentro.

À Renata Bueno, senhorita que em pouco tempo de convivência me ajudou muito, me incentivando, estimulando, rindo. Grato por todas as ajudas com a dissertação, com as correções às 4 horas da manhã, a ajuda com as imagens, as sugestões. Grato também pelos momentos de loucura e também maravilhosos que passamos desfrutando da natureza, recarregando totalmente as energias para este ano de 2013. Enfim, muito grato pela sua presença diária nos últimos 2-3 meses. És muito especial para mim moça da "UFGo que fica no meio do país"...IgnoraNNNte!

Aos funcionários do Instituto de Biologia, e do Programa de Pós-Graduação da Genética e Biologia Molecular.

À professora Dr^a. Íscia Lopes Cendes por disponibilizar o espaço do seu laboratório para a realização dos meus experimentos.

Aos colegas de profissão da Genética Molecular da Faculdade de Ciências Médicas, especialmente ao Rodrigo, sempre auxiliando durante os experimentos.

À minha família não de sangue, mas de luta. Grato a todos do Taekwondo Unicamp. Sem sombra de dúvidas, os ensinamentos e treinos fizeram grande diferença em minha vida. Em especial agradeço a minha querida professora Malu, por sempre despejar adrenalina em suas palavras, acreditando que todos podemos ir mais longe, sempre. Aos meus amigos e professores Fábio, Gusta e Caio, por todos os momentos de trollagens e risadas, mas também pelos momentos de seriedade e treino pesado. Ao Zé, adulto porém com um espírito extremamente jovem.

Aos meus amigos de moradia, à extinta República ViraCopos, e ao grupo Rep LáEle/Titanic, pessoas com que tornaram-se mais que amigos: Preto, Ivens,Pira, Alê, Marcelo, Marcelino, Julito, Léo, Doug, Carlis, André, Júlio, Elvis, Pedro, Miss, Pedago, Lu, Thalita, Bianca, Mineira, Gaby, Olívia e Mel.

Aos meus demais familiares.

Às agências fomentadoras CAPES, CNPq e FAPESP, pelas bolsas e auxílios concedidos.

Enfim, a todos que, em algum momento de minha vida, estiveram presentes!

SUMÁRIO

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS E FLUXOGRAMASxiii
LISTA DE TABELASxviii
LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOSxx
RESUMOxxiii
ABSTRACTxxvi
1. INTRODUÇÃO
1.1. O sistema auditivo
1.1.1. A anatomia da orelha3
1.1.2. O som7
1.1.3. Fisiologia7
1.2. A Perda Auditiva8
1.2.1. Classificação das perdas auditivas9
1.2.2. Causas das perdas auditiva10
1.2.3. Principais genes estudados no trabalho25
1.2.4. Testes moleculares para o diagnóstico da perda auditiva
1.3. Justificativa do trabalho41
2. OBJETIVOS
2.1. Objetivo geral45
2.2. Objetivos específicos45
3. METODOLOGIA
3.1. Casuística49
3.2. Metodologia49
3.2.1. Escolha das alterações49
3.2.2. Extração do DNA genômico de sangue periférico50
3.2.3. Genotipagem utilizando a plataforma <i>TaqMan[®] OpenArray</i> [™] <i>Genotying</i> 51

4.	RE	SUL	TADOS	83
4	l.1.	Res	sultados Gerais	83
4	l.2.	Aná	álise dos resultados de genotipagem utilizando a Plataforma $\mathit{TaqMan}^{\circledast}$	
(Open	Arra	ay™ Genotyping	85
	4.2 sof	.1. twar	Verificação dos <i>clusters</i> gerados pelo OpenArray™ NT Cycler [®] utilizando re OpenArray™ SNP Genotyping Analysis	o o 86
	4.2 VIC	.2. プ [®] , F	Verificação das imagens da placa e da fluorescência emitida pelos fluoró FAM® e ROX®	foros 87
	4.2	.3.	Importação dos dados gerados para o software TaqMan [®] Genotyper v1.2	289
4 r	l.3. esult	Aná tados	álise dos resultados utilizando o <i>software TaqMan[®] Genotyper</i> e tabulação s gerados	o dos 92
	4.3	.1.	Análises das mutações no gene nuclear GJB2	93
	4.3	.2.	Análises das mutações no gene nuclear GJB6	106
	4.3	.3.	Análises das mutações no gene <i>miR96-183</i>	106
	4.3	.4.	Análises das mutações no gene mitocondrial 12S rRNA (MT-RNR1)	107
	4.3	.5.	Análises das mutações no gene mitocondrial MT-TS1	109
	4.3	.6.	Análises das mutações no gene nuclear SLC26A4	110
	4.3	.7.	Análises das mutações nos genes nucleares OTOF e TMC1	111
4	l.4.	Cus	sto dos exames moleculares para a triagem da perda auditiva	111
5.	DIS	SCUS	SSÃO	115
6.	CO	NCL	LUSÃO	123
7.	RE	FER	RÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	127
AN	EXC)1		171
AN	EXC) 2		176

LISTA DE FIGURAS E FLUXOGRAMAS

LISTA DE FIGURAS E FLUXOGRAMAS

Figura 1. Esquema geral da ore	ha e suas subdivisões3
Figura 2. Esquematização da or	elha interna4
Figura 3. Ilustração da cóclea.	isualização frontal e em secção transversal5
Figura 4. Esquematização do in	erior da cóclea6
Figura 5. Representação da fisi	ologia do sistema auditivo em humanos8
Figura 6. Representação da es	trutura da molécula circular de DNA mitocondrial (DNAmt),
indicando o posicioname	nto dos seus 37 genes22
Figura 7. Esquematização da es	trutura do gene <i>GJB2</i> 25
Figura 8. Esquematização da es	trutura das conexinas26
Figura 9. Estrutura cristalográfic	a do <i>conexon</i> (PDB ID 2ZW3)27
Figura 10. Esquematização da e	estrutura do gene <i>GJB6</i> 29
Figura 11. Representação esqu	emática das 4 grandes deleções envolvendo o gene <i>GJB6</i> e
possível região regulató	ia30
Figura 12. Esquema da estru	tura, domínios C2 e da mutação p.Q829X na Otoferlina
(isoforma 1)	
Figura 13. Representação do cl	uster <i>miR183/96/182</i> presente no cromossomo 733
Figura 14. Layouts disponíveis	ara a confecção das placas de <i>OpenArray</i> ™38
Figura 15. Placa de OpenArray	⁴
Figura 16. Plataforma TaqMan®	<i>OpenArray</i> [™] 40
Figura 17. Nanodrop® 8000, util	zado para a análise das purezas das amostras61
Figura 18. Qubit [®] 2.0 Fluorement	er, utilizado para a análise da concentração das amostras62
Figura 19. Esquema de distribui	ção das amostras na placa de 384 poços63
Figura 20. OpenArray [™] AccuFil	[®] System64
Figura 21. Ilustração da inserçã	o da placa de <i>OpenArray</i> [™] na <i>case</i> de vidro preenchida com
líquido de imersão	
Figura 22. Esquematização da	adição da goma fotossensível para fechar a case de vidro
com a placa de <i>OpenAr</i> i	<i>ay</i> [™] já posicionada no seu interior66
Figura 23. Foto do termociclado	or Dual Flat Block GeneAmp [®] PCR System 9700 da Applied
BioSystems	

Figura 24. Termociclagem utilizada nas placas de <i>OpenArray</i> [™] com máquina <i>Dual Flat Block</i>
GeneAmp [®] PCR System 9700 da Applied BioSystems67
Figura 25. Imagem do software OpenArray [™] SNP Genotyping Analisys após a captura da
fluorescência de uma placa de <i>OpenArray</i> [™] 68
Figura 26. Visão geral do software TaqMan [®] Genotyper utilizando o padrão Standard Diploid
<i>Genotypes</i> para análise69
Figura 27. Visão geral da planilha criada para organização, análise e comparação dos
resultados70
Figura 28. Termociclagem utilizado nas reações de sequenciamento dos genes GJB2,
<i>miR96/183, SLC26A4, TMC1</i> e <i>CRYL1.</i> 71
Figura 29. Termociclagem para a triagem da alteração p.829Q>X74
Figura 30. Termociclagem para a triagem da alteração mitocondrial m.1555A>G75
Figura 31. Termociclagem para a triagem da alteração mitocondrial m.1494C>T76
Figura 32. Esquema das 2 grandes deleções confirmadas e estudadas presentes no gene
<i>GJB6</i>
Figura 33. Visão geral do <i>software OpenArray[™] SNP Genotyping Analysis</i> 87
Figura 34. Imagens da placa de OpenArray [™] e seus fluoróforos capturados pelo <i>OpenArray</i> [™]
NT Cycler
Figura 35. Visão geral do <i>software TaqMan[®] Genotyper v1.2</i>
Figura 36. Visualização da genotipagem de acordo com o indivíduo pelo software TaqMan®
Genotyper v1.290
Figura 37. Visualização de todos resultados no ensaio de acordo com as chamadas geradas
pelo s <i>oftware TaqMan[®] Genotyper v1.2</i> 90
Figura 38. Visualização do ensaio da mutação p.M34T da placa de OpenArray™ pelo
software TaqMan [®] Genotyper da Applied BioSystems.
Figura 39. Gráfico gerado pelo software TaqMan® Genotyper utilizando o padrão Standard
Diploid Genotypes94
Figura 40. Visão geral do software CLC Sequence Viewer 6.5.1 utilizado para pareamento
das sequências95
Figura 41. Visão geral do software Chromas Lite 2.01 utilizado para verificação dos
eletroferogramas95
Figura 42. Detecção da alteração c.283G>A (p.V95M)96
Figura 43. Detecção da alteração c.71G>A (p.W24X)96

Figura 44. Detecção da alteração c.439G>A (p.E147K)	97
Figura 45. Detecção da alteração c.617A>G (p.N206S)	98
Figura 46. Detecção da alteração c.385G>A (p.E129K)	
Figura 47. Detecção da alteração c.109G>A (p.V37I)	
Figura 48. Detecção da alteração c.269T>C (p.L90P)	100
Figura 49. Detecção da alteração p.R184W no gene GJB2	101
Figura 50. Detecção da alteração c.551G>C (p.R184P)	101
Figura 51. Detecção da alteração c.101T>C (p.M34T)	102
Figura 52. Detecção da alteração c.503A>G (p.K168R)	103
Figura 53. Detecção da deleção c.167delT	103
Figura 54. Detecção da deleção c.35delG	104
Figura 55. Análise dos resultados de um invidíduo heterozigoto para a n	nutação c.35delG e
c.167delT no gene <i>GJB2</i>	105
Figura 56. Detecção da mutação p.R143W em heterozigose por sequer	nciamento direto do
gene GJB2	105
Figura 57. Gel de agarose dos resultados do PCR-Multiplex para a anália	se das deleções no
gene GJB6	106
Figura 58. Detecção do polimorfismo rs73159662 no gene miR96-183 e	m heterozigose por
sequenciamento direto	107
Figura 59. Gel de agarose 2% contendo os fragmentos gerados após a r	estrição enzimática
para análise da mutação m.1555A>G	107
Figura 60. Detecção da alteração mitocondrial m.1555A>G utilizando o g	ráfico do tipo " <i>Rare</i>
Fam Allele"	108
Figura 61. Gel de agarose 2% com os fragmentos gerados após a restriç	ão enzimática para
análise da mutação m.1494C>T	109
Figura 62. Visualização dos fragmentos gerados após a restrição enzimáti	tica para análise da
mutação m.7445A>G em gel de agarose 2%	109
Figura 63. Detecção da mutação p.V609G no gene SLC26A4 em	i heterozigose por
sequenciamento direto	110
Figura 64. Visualização do resultado do ensaio p.V609G utilizando o	software TaqMan [®]
Genotyper	111
Fluxograma 1. Resumo das etapas do trabalho realizado	

Fluxograma 2.	Esquema utili	zado para anális	e as placas de	OpenArray	[™] 86
---------------	---------------	------------------	----------------	-----------	-----------------

LISTA DE TABELAS

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Principais causas de perda auditiva. 10
Tabela 2. Informações sobre as síndromes relacionadas a perda auditiva12
Tabela 3. Informações referentes ao lócus e localização dos genes relacionados às perdas
auditivas não-sindrômicas autossômica dominante15
Tabela 4. Informações referentes ao lócus e localização dos genes relacionados às perdas
auditivas não-sindrômicas autossômica recessiva18
Tabela 5. Informações referentes ao lócus e localização dos genes relacionados às perdas
auditivas não-sindrômicas ligadas ao cromossomo X
Tabela 6. Alterações no DNAmt relacionadas a perda auditiva não-sindrômica
Tabela 7. Layouts oferecidos para a elaboração de placas de genotipagem e expressão
gênica
Tabela 8. Lista das 32 alterações analisadas utilizando a plataforma <i>TaqMan[®] OpenArray</i> [™]
Genotyping49
Tabela 9. Esquematização dos possíveis resultados de mascaramento de sequências. .53
Tabela 10. Alterações e sequências selecionadas para o estudo utilizando a plataforma
TaqMan [®] OpenArray [™] Genotyping54
Tabela 11. Detalhes da sequência, <i>primers</i> e sondas presentes nas placas de genotipagem
de <i>OpenArray</i> [™] 60
Tabela 12. Técnicas utilizadas para a validação dos ensaios testados na placa de
<i>OpenArray</i> [™] 70
Tabela 13. Primers utilizados para as reações de sequenciamento direto72
Tabela 14. Primers utilizados para a triagem da mutação mitocondrial m.7445A>G77
Tabela 15. Primers utilizados para a validação das deleções no gene GJB6.78
Tabela 16. Identificação dos experimentos e placas de OpenArray [™] utilizados para a
otimização da plataforma <i>TaqMan[®] OpenArray</i> [™] <i>Genotyping</i> 84
Tabela 17. Rendimento de genotipagens dos indivíduos por placa de <i>OpenArray</i> [™] 85
Tabela 18. Alterações presentes nas placas de OpenArray [™] analisadas e validações das
mutações detectadas92
Tabela 19. Ensaios que apresentaram falso positivos utilizando a plataforma TaqMan [®]
<i>OpenArray</i> [™] <i>Genotyping</i> 116

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

ATP	Trifosfato de adenosina
CCD	Charge-coupled Device
CCE	Células Ciliadas Externas
CCI	Células Ciliadas Internas
CD	Compact Disc
Сх	Conexina
dB	Decibel
DFN	Deafness
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
DNAmt	DNA mitocondrial
dNTP	Desoxinucleotídeo trifosfato
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
g	Grama
h	Hora
Hz	Hertz
kb	Quilobase
kDa	Quilodalton
L	Ladder
Μ	Massa molar
MGB	Minor Groove Binder
min	Minuto
miRNA	MicroRNA
mL	Mililitro
mM	MiliMolar
mm	Milimetro
ng	Nanograma
nL	Nanolitro
NTC	No Template Control
ΟΑ	OpenArray™
OMS	Organização Mundial de Saúde

pb	Par de base
PCR	Polymerase chain reaction (reação em cadeia da polimerase)
рН	Potencial de hidrogênio iônico
RNA	Ácido Ribonucleico
RNAm	RNA mensageiro
RNAnc	RNA não-codificante
RNAr	RNA ribossomal
RNAt	RNA transportador
rpm	Rotações por minuto
SNP	Single-Nucleotide Polymorphism (Polimorfismo de nucleotídeo único)
Taq	Thermus aquaticus (enzima Polimerase)
ТВЕ	Tris, base, ácido bórico, EDTA
TE	Tris EDTA
Тт	Temperatura de <i>melting</i>
U	Unidade
°C	Grau Celsius
R\$	Real
\$	Dólar Americano
μg	Micrograma
μL	Microlitro
.pdf	Extensão de aquivo do tipo Portable Document Format
.spd	Extensão de aquivo do tipo SNP Plate Dates
.spf	Extensão de aquivo do tipo SNP Plate File
.tiff	Extensão de aquivo do tipo Tagged Image File Format
.txt	Extensão de aquivo do tipo texto

RESUMO

xxiii

RESUMO

A perda auditiva é a deficiência sensorial mais frequente em humanos, atingindo aproximadamente 10% de toda a população mundial. A restrição da comunicação pela expressão oral resulta em alterações no desenvolvimento cognitivo e psicológico do indivíduo afetado. Em países desenvolvidos, um a cada 500 indivíduos apresenta perda auditiva neurossensorial bilateral profunda/severa. Já nos casos de indivíduos com até 5 anos, a porcentagem é maior, atingindo 0,27% de 1000 indivíduos, número que se torna maior ainda nos casos em jovens, chegando a 0,35%. Dentre as causas da perda auditiva, mais de 60% dos casos de perda auditiva congênita são genéticos. Até o momento já se tem conhecimento de 150 *loci* e 103 genes envolvidos com a perda auditiva, sendo que a maioria deles apresenta, no mínimo, 20 alterações (mutações de ponto, deleções, inserções, etc.) que podem causar a perda. O gene que apresenta maior número de alterações é o *GJB2*, codificador da conexina 26, uma proteína relacionada a trocas iônicas intercelulares, mantendo a homeostase de potássio do sistema auditivo, essencial para a audição. Apenas este gene apresenta mais de 302 alterações confirmadas até o presente momento, sendo o principal gene relacionado aos casos de perda auditiva de origem genética.

Tendo em vista a grande heterogeneidade clínica e genética da perda auditiva e a importância do diagnóstico molecular correto dos indivíduos que apresentam perda auditiva hereditária, o presente trabalho propôs padronizar um *layout* para diagnóstico através de genotipagens utilizando uma tecnologia *'high-throughput'* baseada em *PCR* (*Polymerase Chain Reaction*) em tempo real denominada *TaqMan[®] OpenArray[™] Genotyping*. Com esta, foi desenvolvido um *layout* das placas de genotipagem de *OpenArray[™]*, sendo possível analisar 32 alterações de 96 indivíduos simultâneamente por placa.

Ao todo, foram analisados 376 indivíduos, sendo 94 deles controles ouvintes, totalizando 4 placas em duplicata. Todas as 31 alterações analisadas estavam presentes nos genes nucleares *GJB2, GJB6, CRYL1, TMC1, SLC26A4, miR-96, OTOF* e nos genes mitocondriais *12S rRNA* e *MT-TR1*. As reações foram validadas posteriormente por técnicas previamente estabelecidas (sequenciamento direto, *PCR Multiplex* e *RFLP-PCR*) nos testes utilizados para o diagnótisco molecular da perda auditiva do Laboratório de Genética Huma-

na do Centro de Biologia Molecular e Engenharia Genética (CBMEG) da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP). Ao total, foram realizados 11.656 reações de genotipagem. Apenas 353 reações falharam, representando, aproximadamente, 3,03% das reações. Dentre as reações que falharam, estavam as amostras de nove indivíduos que não obedeciam os requisitos mínimos de concentração, pureza e integridade do DNA para a realização dos experimentos. Com isso, calculou-se o rendimento médio das placas de genotipagem utilizando as placas de *OpenArray*TM, que apresentou acurácia de, aproximadamente, 96,97%. Tais resultados comprovam a ótima acurácia, o baixo custo e a fácil reprodutibilidade da técnica, tornando este *layout* customizado para a plataforma *TaqMan[®] OpenArray*TM *Genotyping* uma ferramenta ótima e confiável a ser empregada nos teste de diagnóstico molecular da perda auditiva no nosso país.

ABSTRACT

ABSTRACT

Hearing loss is the most common sensory deficit in humans, affecting approximately 10% of the entire world population. The restriction of communication by the oral expression results in changes in cognitive and psychological development of the affected individual. In developed countries, one in every 500 individuals has severe/profound bilateral sensorineural hearing loss. In cases of individuals with up to 5 years, the percentage is higher, reaching 0.27% of 1000 individuals, that number becomes even greater in cases where young people, reaching 0.35%. Among all the causes of hearing loss, more than 60% of congenital hearing loss are genetics. So far already aware of 150 *loci* and 103 genes involved in hearing loss, and most of them have at least 20 changes (point mutations, deletions, insertions, etc.) which may cause the loss. The gene that has the higher number of changes is the *GJB2*, encoding connexin 26, a protein related to ion exchange intercellular maintaining homeostasis potassium auditory system, essential for hearing. Only this gene has over 302 changes confirmed so far, being the main gene related to cases of hearing loss with genetic origin.

Due to the great clinical and genetic heterogeneity of hearing loss and the importance of correct molecular diagnosis of individuals with hereditary hearing loss, this work proposes standardize a layout to the diagnosis by a genotyping technology using a high-throughput technique based on real-time PCR called $TaqMan^{@}$ $OpenArray^{TM}$ Genotyping. With this, we customized a layout to the *OpenArray*TM genotyping plates, being possible to analyze 32 changes of 96 individuals per plate simultaneously.

Were analyzed 376 individuals, being 94 of them controls listeners, totaling 4 plates in duplicate. All 31 changes analyzed were present in the nuclear genes *GJB2, GJB6, CRYL1, TMC1, SLC26A4, miR-96, OTOF* and in the mitochondrial genes *12S rRNA* and *MT-TR1*. Reactions were subsequently validated by previously established techniques (direct sequencing, multiplex PCR and RFLP-PCR), tests used for the molecular diagnostic of the hearing loss at Human Genetics Laboratory of the Center for Molecular Biology and Genetic Engineering (CBMEG), located at State University Campinas (UNICAMP). In total, 11.656 reactions of genotyping were performed using this platform. Only 353 reactions failed, representing approximately 3.03% of the reactions. Among the reactions that failed, were

xxvii

samples of nine individuals who did not meet the minimum concentration, purity and integrity of the DNA for the experiments. With this, was calculated the average income of the $OpenArray^{TM}$ genotyping plates, which showed an accuracy of approximately 96.97%. These results and the comparative analysis of the costs among $OpenArray^{TM}$ platform and the others molecular techniques demonstrated the great accuracy, low cost and easy reproducibility of the technique, making this layout customized for the platform $TaqMan^{@}$ $OpenArray^{TM}$ *Genotyping* a good and reliable tool to be used in the molecular diagnostic of hearing loss in our country.

INTRODUÇÃO

1.1. O sistema auditivo

1.1.1. A anatomia da orelha

A audição é um dos sentidos mais complexos dos seres vivos. Ele é responsável pela captação das diversas ondas sonoras presentes no ambiente e codificação destas em impulsos nervosos. A estrutura responsável pela audição é a orelha humana (Figura 1). Esta é o órgão vestíbulococlear altamente sensível às ondas sonoras, capaz de mecanotransduzir o som em um espectro amplo de frequências (20 a 20.000 Hz). O seu desenvolvimento começa no 22º dia de gestação e obtém sua diferenciação morfológica aproximadamente no sexto mês da gestação. Anatomicamente, constitui-se de três diferentes partes, a Orelha Externa, a Média e a Interna. Além disso, é importante para comunicação e o equilíbrio do corpo (Petit C, 1996; Moussalle *et al.*, 1997).



Figura 1. Esquema geral da orelha e suas subdivisões (Modificado de: Starkey, 2009).

A orelha externa é composta pelo pavilhão auricular e pelo meato auditivo (canal auditivo externo). Estas são estruturas com diâmetros de aproximadamente 7mm e 25mm de comprimento, respectivamente, que são responsáveis pela captação das ondas no ambiente, amplificação e condução até a orelha média, além de servir como proteção para a orelha média e interna. A orelha média é composta pela cavidade timpânica e por três ossículos: o martelo, a bigorna e o estribo. O som, que entra pelo canal auditivo externo, gera uma vibração da membrana timpânica para dentro e para fora da orelha média (fases de compressão e de rarefação). Os ossículos que se encontram posicionados na orelha média coletam as vibrações e as transmitem para a orelha interna, através da janela oval. A estrutura mais interna da orelha é composta pelo labirinto anterior (cóclea), responsável pela codificação do som e pelo labirinto posterior (vestíbulo e canais semicirculares), responsável pelo equilíbrio (Figura 2) (Medeiros EB, 2002; Mousalle *et al.*, 1997).



Figura 2. **Esquematização da orelha interna.** Destaque para o labiritinto anterior, responsável pela audição e labirinto posterior, associado ao equilíbrio. (Modificado de: Kierszenbaum AL, 2004).

A cóclea (Figura 3) é o órgão relacionado a audição. Tem estrutura cônica de 9 mm de diâmetro e parede extremamente delgada, estando disposta em espiral, em torno do osso de nome modíolo, em torno do qual dá duas voltas e meia. Sua base é mais alargada e possui duas janelas, a oval e a redonda. Este órgão é composto por um sistema de três tubos enrolados e sobrepostos, sendo eles: a rampa vestibular, a rampa média e a rampa timpânica.



Figura 3. **Ilustração da cóclea. Visualização frontal e em secção transversal.** Destaque para o esquema detalhado do órgão de Corti e micrografia dos estereocílios das células ciliadas (Modificado de: "The inner ear", capítulo "The Auditory System" do livro "Neuroscience", editado por Purves e colaboradores (2001) e disponível no NCBI Bookshelf – http://www.ncbi.nlm.nih.gov/bookshelf/br.fcgi?book=neurosci&part=894).

Entre a rampa vestibular e média, há uma membrana denominada de Reissner ou Vestibular (Figura 4). Entre a rampa timpânica e a média, encontramos a membrana basilar, uma membrana fibrosa composta de 20.000 a 30.000 fibras basilares que se projetam do centro ósseo da cóclea (modíolo) em direção a parede externa. Estas fibras estão fixas por suas extremidades basais na estrutura óssea central da cóclea, mas livre nas extremidades distais, exceto por estas extremidades distais estarem incluídas na frouxa membrana basilar. Toda esta estrutura confere a capacidade de vibrar. Pelo fato da orelha interna estar dentro

de uma cavidade óssea do osso temporal, chamada labirinto ósseo, podem chegar à cóclea todas as vibrações da caixa craniana (Bogar *et al.*, 2008; Guyton & Hall, 1996).



Figura 4. **Esquematização do interior da cóclea.** Destaque para as 3 rampas do interior da cóclea (rampa vestibular, rampa média e rampa timpânica) (Modificado de: Kierszenbaum AL, 2004).

O órgão de Corti é a estrutura mecanotransdutora responsável pela mecanotransdução da energia mecânica para a energia elétrica e localiza-se ao longo e sobre a membrana basilar. É formado por cinco tipos básicos de células, sendo elas: as Células Ciliadas Internas (CCI), as Células Ciliadas Externas (CCE) e as Células de Sustentação, onde encontramos as Células de Deiters, Células de Hensen e Células de Claudius. Além desses tipos celulares, o órgão espiral também possui as aferências neuronais do tipo I e II (Zorzetto NL, 2006).

A membrana tectória, posicionada acima das células ciliadas, está em íntimo contato com os estereocílios das CCI e CCE, sendo responsável pela deflexão e hiperflexão dessas estruturas durante a vibração da membrana basilar (Guyton & Hall, 1996).

O VIII par craniano, conhecido como Vestíbulo-Coclear, é o responsável pela captação dos impulsos nervosos provenientes da orelha interna e a transmissão destes até a

região do cérebro responsável pela audição. Este par de nervos também transmite as informações provenientes do labirinto (Landau & Barner, 2009).

1.1.2. O som

As ondas sonoras, responsáveis pelo som, são ondas longitudinais de compressão e se propagam exclusivamente através de um meio físico. Estas ondas passam pelo ambiente causando a vibração e colisão das partículas, que é captada pela orelha externa, sendo posteriormente transmitida para a orelha média e interna, onde desencadeia o processo da audição (Medeiros EB, 2002).

1.1.3. Fisiologia

O processo da audição consiste na transformação das ondas sonoras em impulsos nervosos. O som entra pela orelha externa, através do conduto auditivo externo, que tem função de tubo coletor para canalizar as ondas acústicas até a membrana timpânica. Na orelha média, as ondas sonoras fazem com que a membrana timpânica vibre, movimentando o martelo e a bigorna e transmitindo ao estribo um movimento como de pistão (Alberts *et al.*, 1989).

De acordo com Casanova (1997), na orelha interna, os movimentos da janela oval são transmitidos para a rampa timpânica e em seguida para a membrana de Reissner, sendo então traduzidos em movimentos da endolinfa, consequentemente, da membrana tectória sobre as células sensoriais do órgão espiral. Estas últimas são responsáveis pela criação do impulso nervoso, que será encaminhado ao cérebro pelo VIII par de nervos (Figura 5).



Figura 5. **Representação da fisiologia do sistema auditivo em humanos** (Modificado de: Neurelec <http://www.neurelec.com.br/implantes/sobre-audicao.html>).

1.2. A Perda Auditiva

O termo surdez refere-se à perda completa da audição em uma ou nas duas orelhas. Já a terminologia perda auditiva indica a perda total ou parcial da audição (OMS, 2009).

A perda auditiva é o *déficit* sensorial mais frequente em humanos, restringindo a expressão oral do deficiente, além de causar alterações no desenvolvimento cognitivo e psicológico. A perda auditiva pode interferir na vida social e econômica dos indivíduos afetados, das famílias e comunidades. Em crianças, dependendo do tipo da perda e do grau, pode haver o retardamento no desenvolvimento cognitivo e linguístico, atrapalhando no desempenho da aprendizagem. Em adultos, a perda auditiva pode criar barreiras para a obtenção e manutenção de um emprego. Além destes fatores, pessoas com deficiência auditiva geralmente vivem em um grupo com pessoas também deficientes auditivas, isolando-se socialmente dos demais, que por sua vez também isolam os deficientes, seja por preconceito ou por não ter conhecimento da linguagem apropriada para a comunicação, como a Língua Brasileira de Sinais (LIBRAS) (OMS, 2009).

Ainda de acordo com dados da OMS, em 2009, pelo menos 278 milhões de pessoas do mundo inteiro apresentavam perda auditiva bilateral moderada ou severa, o correspondente a 4,2% da população mundial. Neste mesmo levantamento, 364 milhões de pessoas apresentavam perda auditiva de forma mais leve (5,5% da população mundial) e 80% dos casos ocorriam em países de média e baixa renda.
Nos países desenvolvidos, uma a cada 500 crianças nasce portadora de surdez neurossensorial bilateral (nas duas orelhas) sendo esta profunda ou severa (período prélingual). Antes dos 5 anos de idade, este número sobe para 2,7 a cada 1000 crianças e durante a adolescência atinge 3,5 a cada 1000 jovens. Já para recém-nascidos internados em Unidades de Cuidados Intensivos Neo-Natais, o número é maior, 20 a 40 em mil neonatos (Petit C, 1996; Oliveira *et al.* 2002; Morton & Nance, 2006).

Nos casos menos graves de surdez profunda unilateral, o número é de três a seis crianças em mil. Já entre duas a quatro em mil crianças serão deficientes auditivos antes da vida adulta (período pós-lingual), podendo os valores citados variar de acordo com o local da pesquisa (Petit C, 1996; Nance, 2003).

No Brasil, 66,7% das perdas auditivas têm como etiologia principal os fatores ambientais (sendo a rubéola congênita e a anóxia neonatal responsáveis por 1/3 das etiologias), sendo outros 18,5% de etiologia desconhecida e 14,8% de herança genética (Simões *et al.*, 1992).

Em pesquisa realizada concluiu-se que 0,3% da população com idade entre 30 e 50 anos apresenta perda auditiva acima de 65 dB. Já entre populações de idade entre 60 e 70 anos esta porcentagem sobe para 2,3%. Estima-se também que 60% das pessoas acima de 70 anos apresentam perdas auditivas maiores que 25 dB (Van Laer *et al.*, 1999).

1.2.1. Classificação das perdas auditivas

As perdas auditivas podem ser classificadas de acordo com a sua localização ou de acordo com a sua expressão clínica. A localização se refere à região afetada e é subdividida em perda auditiva condutiva, perda auditiva neurossensorial e perda auditiva mista. A perda auditiva condutiva se refere a problemas na condução do som, ou seja, problemas físicos na orelha externa e média, como má formação, injúrias, etc., que impedem que as ondas sonoras cheguem sem muita perda até a membrana timpânica. Já a perda auditiva neurossensorial representa a perda oriunda de problemas na orelha interna, gerando o *déficit* na mecanotransdução das ondas sonoras e envio dos impulsos elétricos para o cérebro. A

perda auditiva mista é classificada como apresentando tanto os problemas da perda auditiva condutiva quanto da neurossensorial (Filho OL, 1997).

Ao considerar o grau de perda auditiva, de acordo com Silman & Silverman (1997), ela pode ser leve (27-40 dB's), moderada (41-55 dB's), moderada/severa (56-70 dB's), severa (71-90 dB's) e profunda (superior a 90dB's). Além disso, a perda pode ser unilateral, quando afeta apenas uma das orelhas, ou bilateral, afetando ambas orelhas. Outra classificação varia de acordo com a época que a perda auditiva se manifesta, podendo ser pré-lingual (antes da aquisição da expressão oral) ou pós-lingual (após a aquisição da expressão oral) (Hilgert *et al.*, 2009; Petit C, 1996; Filho OL, 1997).

1.2.2. Causas das perdas auditiva

As perdas auditivas podem ser causadas tanto por fatores genéticos, como alterações em um gene ou diferentes genes ou em elementos regulatórios que estão envolvidos no desenvolvimento adequado, na estrutura e na função da orelha; ou por lesões causadas no sistema auditivo ao longo da vida, devido a exposição frequente a alta intensidade do som, trauma acústico, infecções, drogas ototóxicas, entre outros (Tabela 1), ou por ambos fatores (Petersen MB, 2002; Gardner *et al.*, 2006; Dror & Avraham, 2009).

Tabela 1. Principais causas de perda auditiva.

Causas de perda auditiva				
	Pré-Natal	Infecções congênitas (rubéola, citomegalovírus,		
		toxoplasmose, sífilis, herpes)		
		Utilização de drogas ototóxicas		
		Irradiação durante a gestação		
Ambiental	Peri-Natal	Icterícia grave		
		Trauma de parto		
		Anóxia		
		Otites		
		Meningite		
	Pós-Natal	Sarampo		
		Caxumba		
		Traumatismos		

	Sindrômico	Autossômico dominante
		Autossômico recessivo
		Ligada ao X
		Mitocondrial
Genética	Não-Sindrômico	Autossômico dominante
		Autossômico recessivo
		Ligada ao X
		Ligada ao Y
		Mitocondrial

Fonte: adaptado de Filho, (1997).

Sendo o foco deste trabalho, será apontado apenas a perda auditiva de origem genética e suas variações.

Estudos mostram que cerca de 60% dos problemas relacionados à surdez congênita são hereditários, 30% adquiridos e 10% de etiologia idiopática. Estima-se que mais de 50% das perdas auditivas em países desenvolvidos tenham origem genética e que 2/3 delas sejam pré-linguais. Estes valores divergem do Brasil, onde 66,7% das perdas auditivas têm como etiologia principal os fatores ambientais, sendo outros 18,5% de etiologia desconhecida e 14,8 % de herança genética (Bitner-Glindzicz M, 2002; Godinho *et al.* 2003; Ardle & Bitner-Glindzicz, 2010; Simões *et al.*, 1992; Pupo *et al.*, 2008).

Na maioria dos casos, a perda de origem genética é monogênica. Destes 60% relacionados a perda auditiva de origem genética, 70% ocorre de forma isolada, sendo chamada de Perda Auditiva Não-Sindrômica (*NSHL*, sigla oriunda do inglês que significa '*Non-Syndromic Hearing Loss*'), onde o indivíduo apresenta apenas a perda auditiva de forma isolada em seu fenótipo. Os 30% restantes representam as Perdas Auditivas Sindrômicas (*SHL*, sigla que em inglês significa '*Syndromic Hearing Loss*'), sendo estas associadas a outros sintomas ou anomalias além da perda auditiva, como malformações, problemas de visão, entre outros (Van Camp *et al.*, 1995; Ludman & Wright, 1998).

Já foram relatados mais de 103 genes distribuídos em 150 *loci* comprovadamente relacionados com as perdas auditivas, estimando que este número pode atingir 300 genes, o equivalente a 1% de todos os genes do ser humano (Van Camp & Smith, 2012; Nance WE, 2003).

As perdas auditivas genéticas são subdivididas, de uma forma geral, de acordo com seu padrão de herança, sendo estas: autossômico dominante (20%), autossômico recessivo

12

(80%), ligado ao sexo (menor que 1%) e mitocondrial (menor de 1%) (Cryns & Van Camp, 2004).

1.2.2.1. Perdas Auditivas Sindrômicas

As perdas auditivas sindrômicas representam cerca de 30% das perdas auditivas de origem genética, onde os genes relacionados a estas síndromes são, geralmente, responsáveis pela codificação de enzimas, fatores de transcrição, componentes da matrix extracelular e do citoesqueleto (Petit C, 1996).

Segundo Gorlin e colaboradores (1995), este tipo de perda auditiva apresenta várias formas de transmissão, inclusive a herança mitocondrial.

Para Nance (2003), as estimativas são de mais de 400 síndromes já citadas, sendo as principais as Síndromes de *Alport*, *BOR*, *Jervell e Lange-Nielsen*, *Norrie*, *Pendred*, *Stickler*, *Treacher Collins*, *Usher* e *Waardenburg* (Tabela 2).

Tabela 2. Informações sobre as síndromes relacionadas a perda auditiva. Genes envolvidos, localização no DNA genômico (DNAg) e referências.

Síndrome	OMIM	Genes	Localização	Referências Bibliográficas
	301050	COL4A5	Xq22	Barker <i>et al.</i> , 1990
Alport	203780	COL4A3	2a36-a37	Mochizuki <i>et al.</i> , 1994
		COL4A4	_400 407	
	113650	EYA1	8q13.3	Abdelhak et al., 1997
	610896	SIX5	19q13.3	
Branchio-Oto-Renal		Desconhecido	1q31	Kumar <i>et al.</i> , 2000
	608380 SIX1		14a21 3-a 24 3	Ruf <i>et al.</i> , 2003
	000000	Circi	14421.0 4.24.0	Ruf <i>et al.</i> , 2004
	192500	KCNQ1	11p15.5	Neyroud et al., 1997
Jervell & Lange-Nielsen		KCNE1		Tyson <i>et al.</i> , 1997
Jerven & Lange-Meisen	176261		21q22.1-q.22.2	Schulze-Bahr <i>et al.</i> , 1997
CHARGE	214800	SEMA3E	7q21.11	
OIIAIIGE	214000	CHD7	19q13.3	Vissers et al., 2004
Nervie			Vall 0	Chen <i>et al.</i> , 1992
Norrie	310600	NDP	Xp11.3	Berger <i>et al.</i> , 1992
Pendred		SLC26A4	7q21-q34	Everett <i>et al.</i> , 1997
		FOXI1	5q35.1	Yang <i>et al.</i> , 2007

		KCNJ10	1q23.2	Yang et al., 2009
	108300	COL2A1	12q13.11-q13.2	
	604841	COL11A1	1p21	Richards et al., 1996
Stickler	184840	COL11A2	6p21.3	Vikkula <i>et al.</i> , 1995
		COL9A1	6q13	Van Camp <i>et al.</i> , 2006
		COL9A2	1p34.2	Baker <i>et al.</i> , 2011
Treacher Collins	154500	TCOF1	5q32-q33.1	Dixon <i>et al.</i> , 1996
	193500	PAX3	2q35	Tassabehji <i>et al.</i> , 1992
	193510	MITF	3p14.1-p13.3	Tassabehji <i>et al.</i> , 1994
	600193	Desconhecido	1p21-p13.3	
	606662	Desconhecido	8p23	
Waardenburg	608890	SNAI2	8q11	Sanchez-Martin <i>et al.</i> , 2002
	148820	PAX3	2q35	
	131244	EDNRB	13q22	Attie <i>et al.</i> , 1995
	131242	EDN3	20q13.2-q13.3	
	602228	SOX10	22q13	Pingault <i>et al.</i> , 1998
	276903	MYO7A	11q13.5	Weil <i>et al.</i> ,1995
				Smith <i>et al.</i> , 1992
	276904	USH1C	11p15.1	Verpy <i>et al.</i> , 2000
				Bitner-Glindzicz et al., 2000
				Wayne <i>et al.</i> , 1996
	601067	CDH23	10q22.1	Bork <i>et al.</i> , 2001
				Bolz <i>et al.</i> , 2001
	602097	Desconhecido	21q21	Chaib <i>et al.</i> , 1997
	602083	PCDH15	10g21-22	Ahmed <i>et al.</i> , 2001
			·•••	Alagramam <i>et al.</i> , 2001
Usher	606943	SANS	17q24-25	Mustapha <i>et al.</i> , 2002
			•	Weil <i>et al.</i> , 2003
	612632	Desconhecido	15q22-23	
	276901	USH2A	1q41	Kimberling <i>et al.</i> , 1990
				Eudy <i>et al.</i> , 1998
		Desconhecido	3p23-24.2	Hmani <i>et al.</i> , 1999
	605472	VLGR1	5q14.3-q21.3	Pieke-Dahl <i>et al.</i> , 2000
	611202		0=00	Weston <i>et al.</i> , 2004
	011303	WHRIN	9q32	Epermann <i>et al.</i> , 2007
	2/0902	USH3A	3q21-q25	Sankiia <i>et al.</i> , 1995
	606397		10~24.21	Joensuu <i>et al.</i> , 2001
		FUZUI	10424.31	

Fonte: Van Camp & Smith (2012).

1.2.2.2. Perdas Auditivas Não-Sindrômicas

As perdas auditivas não-sindrômicas correspondem a 70% dos casos de perda auditiva relacionada à genética. Deste total, aproximadamente 80% correspondem ao padrão de herança autossômica recessiva, sendo os outros 15% correspondentes ao padrão autossômico dominante, seguidos de 2-3% ligado a sexo e 1-2% ao DNA mitocondrial (DNAmt) (Pfeilsticker *et al.*, 2004; Godinho *et al.*, 2003).

Para melhor classificá-las, foram adotadas siglas internacionais para os representar os tipos de perda auditiva não-sindrômica de acordo com o *lócus*. Utiliza-se o radical DFN, oriundo do inglês *Deafness*, para nomear o *lócus* relacionado a perda auditiva, seguido do número do *lócus*, numerado crescentemente de acordo com a ordem de descoberta. Dentre as classificações, temos o padrão autossômico dominante (DFNA), o padrão autossômico recessivo (DFNB), ligada ao cromossomo X (DFNX) e ao cromossomo Y (DFNY) e o padrão mitocondrial (Van Laer *et al.*, 2003).

Até o momento, mais de 134 *loci* estão relacionados à perda auditiva nãosindrômica, sendo que as mutações mais frequentemente encontradas estão presentes no gene *GJB2* (que codifica a proteína Conexina 26), responsável por mais de 50% dos casos de perda auditiva não-sindrômica e 10-20% de todas as perdas auditivas pré-linguais em países desenvolvidos (Van Camp & Smith, 2012).

1.2.2.2.1. Perda Auditiva Não-Sindrômica Autossômica Dominante (DFNA)

Representando, aproximadamente, 15% dos casos de perda auditiva nãosindrômica, quase todos os genes relacionados à DFNA tem como principal característica a perda auditiva pós-lingual, de caráter progressivo. Logo, as perdas auditivas não-sindrômicas autossômicas dominantes iniciam-se entre os 20 e 40 anos de idade, o que permite ao indivíduo já ter adquirido algum tipo de comunicação (expressão oral) para se relacionar (Petersen MB, 2002). Em torno de 54 *loci* foram relacionados com perdas auditivas genéticas dominantes, sendo classificados por número, 1 a 64 (Tabela 3) de acordo com a sua descoberta (Van Camp & Smith, 2012).

O primeiro gene relacionado a este padrão de herança foi denominado de *DIAPH1*, este foi localizado no cromossomo 5, mais precisamente na região q31, estando presente o *lócus* DFNA1. Este gene, relatado em 1992 e mapeado em 1997, é pertencente à família das forminas e está envolvido na citocinese e polaridade da célula (Leon *et al.*, 1992; Petersen MB, 2002).

Lócus	Gene	Localização no genoma	Referências Bibliográficas
	CRYM	16p12.3	Abe <i>et al.</i> , 2003
DFNA1	DIAPH1	5q31	Léon <i>et al.</i> , 1992 Lynch <i>et al.</i> , 1997
DFNA2A	KCNQ4	1p34	Coucke <i>et al.</i> , 1994 Kubisch <i>et al.</i> , 1999
DFNA2B	GJB3	1p35.1	Xia <i>et al.</i> , 1999
DFNA3A	GJB2	13q11-q12	Chaib <i>et al.</i> , 1994 Denoyelle <i>et al.</i> , 1998 Kelsell <i>et al.</i> , 1997
DFNA3B	GJB6	13q12	Grifa <i>et al.</i> , 1999
	MYH14	19q13	Chen <i>et al.</i> , 1995 Donaudy <i>et al.</i> , 2004
DFNA4	CEACAM16		Zheng <i>et al.</i> , 2011
DFNA5	DFNA5	7p15	Van Camp <i>et al.</i> , 1995 Van Laer <i>et al.</i> , 1998
DFNA6/14/38	WFS1	4p16.3	Lesperance <i>et al.</i> , 1995 Van Camp <i>et al.</i> , 1999 Bespalova <i>et al.</i> , 2001 Young <i>et al.</i> , 2001
DFNA7	Desconhecido	1q21 - q23	

Tabela 3. Informações referentes ao *lócus* e localização dos genes relacionados às perdas auditivas não-sindrômicas autossômica dominante.

			Fagerheim et al., 1996		
DFNA8/12	TECTA	11q22 - 24	Verhoeven <i>et al.</i> , 1997 Verhoeven <i>et al.</i> , 1998		
DFNA9	СОСН	14q12 - q13	Manolis <i>et al.</i> , 1996 Robertson <i>et al.</i> , 1998		
DFNA10	EYA4	6q22 - q23	O'Neill <i>et al.</i> , 1996 Wayne <i>et al.</i> , 2001		
DFNA11	ΜΥΟ7Α	11q12.3 - q21	Tamagawa <i>et al.</i> , 1996 Liu <i>et al.</i> , 1997		
DFNA13	COL11A2	6q21	Brown <i>et al.</i> , 1997 McGuirt <i>et al.</i> , 1999		
DFNA15	POU4F3	5q31	Vahava <i>et al.</i> , 1998		
DFNA16	Desconhecido	2q24	Fukushima <i>et al.</i> , 1999		
DFNA17	МҮНЭ	22q12.2 - q13.3	Lalwani <i>et al.</i> , 1999 Lalwani <i>et al.</i> , 2000		
DFNA18	Desconhecido	3q22	Bonsch <i>et al.</i> , 2001		
DFNA19	Desconhecido	10 (Pericentr.)	Green <i>et al.</i> , 1998		
DFNA20/26	ACTG1	17q25	Morell <i>et al.</i> , 2000 Zhu <i>et al.</i> , 2003, Van Wijk <i>et al.</i> , 2003		
DFNA21	Desconhecido	6p21	Kunst <i>et al.</i> , 2000		
DFNA22	MYO6	6q13	Melchionda <i>et al.</i> , 2001		
DFNA23	Desconhecido	14q21 - q22	Salam <i>et al.</i> , 2000		
DFNA24	Desconhecido	4q35	Hafner <i>et al.</i> , 2000		
DFNA25	SLC17A8	12q21 - 24	Greene <i>et al.</i> , 1999 Ruel <i>et al.</i> , 2008		
DFNA27	Desconhecido	4q12	Peters <i>et al.</i> , 2008		
DFNA28	GRHL2	8q22	Peters <i>et al.</i> , 2002		
DFNA30	Desconhecido	15q25-q26	Mangino <i>et al.</i> , 2001		
DFNA31	Desconhecido	6p21.3	Snoeckx <i>et al.</i> , 2004		
DFNA32	Desconhecido	11p15	Chatterjee et al., 2009		
DFNA33	Desconhecido	13q34-qter	Bonsch <i>et al.</i> , 2009		
DFNA36	TMC1	9q1 <mark>3-q21</mark>	Kurima <i>et al.</i> , 2002		

DFNA39	DSPP	4q21.3	Xiao <i>et al.</i> , 2001				
DFNA41	Desconhecido	12q24-qter	Blanton <i>et al.</i> , 2002				
DFNA42	Desconhecido	5q31.1-q32	Xia <i>et al.</i> , 2002				
DFNA43		2p12	Flex <i>et al.</i> , 2003				
DFNA44	CCDC50	3a28-a29	Modamio-Hoybjor <i>et al.</i> , 2003				
211011	002000		Modamio-Hoybjor <i>et al.</i> , 2007				
DFNA47	Desconhecido	9p21-p22	D'Adamo <i>et al.</i> , 2003				
DENA48	MYO14	12a13-a14	D'Adamo <i>et al.</i> , 2003				
DINATO	WHO IX		Donaudy et al., 2003				
DFNA49	Desconhecido	1q21-q23	Moreno-Pelayo et al., 2003				
	MIRNOG	7~22.2	Modamio-Hoybjor <i>et al.</i> , 2004;				
DINASU		7902.2	Mencia <i>et al.</i> , 2009				
DFNA51	TJP2	9q21	Walsh <i>et al.</i> , 2010				
DFNA52	Desconhecido	4q28	Xia <i>et al.</i> , 2002				
DFNA53	Desconhecido	14q11.2-q12	Yan <i>et al.</i> , 2005				
DFNA54	Desconhecido	5q31	Gurtler <i>et al.</i> , 2004				
DFNA57	Desconhecido	19p13.2	Bonsch <i>et al.</i> , 2008				
DFNA58	Desconhecido	2p12-p21	Lezirovitz et al., 2009				
DFNA59	Desconhecido	11p14.2-q12.3	Chatterjee et al., 2009				
DFNA60		2a21 3-a24 1	Liu XZ et al. ARO meeting. Denver,				
2. 11/100			February 2007.				
DFNA64	SMAC/DIABLO	12q24.31-q24.32	Cheng <i>et al.</i> , 2011				

Fonte: Van Camp & Smith (2012); Petersen MB (2002).

1.2.2.2.2. Perda Auditiva Não-Sindrômica Autossômica Recessiva (DFNB)

De acordo com estudos de Petersen & Willems (2006), a DFNB apresenta, na maioria dos casos, perda auditiva pré-lingual e severa/profunda, sendo geralmente neurossensorial. Há casos de DFNB pós-lingual, mas estes são raros. Dentre os casos de perda auditiva não-sindrômica, este padrão é o que apresenta maior porcentagem, sendo responsável por, aproximadamente, 80% dos casos.

Petersen & Willems (2006) ainda destacam que o primeiro estudo sobre DFNB foi publicado em 1994, mas apenas em 1997 é que os primeiros genes (*MYO7A* e *GJB2*) relacionados à DFNB foram mapeados.

Segundo o site *Hereditary Hearing Loss Home Page*, criado e mantido por Van Camp & Smith (2012), já foram reportados 41 genes distribuídos em 71 diferentes *loci* de DFNB (Tabela 4).

Lócus	Gene	Localização no genoma	Referencias Bibliográficas		
	G IB2	12010	Guilford <i>et al.</i> , 1994		
DENDIA	GJB2	13412	Kelsell <i>et al.</i> , 1997		
DFNB1B	GJB6	13q12	Del Castillo <i>et al.</i> , 2002		
			Guilford et al., 1994		
DFNB2	MYO7A	11q13.5	Liu <i>et al.</i> , 1997		
			Weil <i>et al.</i> , 1997		
DENB3	MY0154	17n11 2	Friedman <i>et al.</i> , 1995		
DINES	WIT O TON	17011.2	Wang <i>et al.</i> , 1998		
DENB4	SI C2644	7031	Baldwin <i>et al.</i> , 1995		
DFNB4	3202044		Li <i>et al.</i> , 1998		
DFNB5	Desconhecido	14q12	Fukushima et al., 1995		
DFNB6	TMIE	3n1/1-n21	Fukushima <i>et al.</i> , 1995		
			Naz et al, 2002		
DFNB7/11	TMC1		Jain <i>et al.</i> , 1995		
		9q13-q21	Scott <i>et al.</i> , 1996		
			Kurima <i>et al.</i> , 2002		
	TMPRSS3		Veske <i>et al.</i> , 1996		
DFNB8/10		21q22	Bonné-Tamir <i>et al.</i> , 1996		
			Scott <i>et al.</i> , 2001		
	OTOF	2n22-n23	Chaib <i>et al.</i> , 1996		
DINES	0101		Yasunaga <i>et al.</i> , 1999		
DENB12	CDH23	10a21-a22	Chaib <i>et al.</i> , 1996		
UFIND 12	001120		Bork <i>et al.</i> , 2001		
DFNB13	Desconhecido	7q34-q36	Mustapha <i>et al.</i> , 1998		
DFNB14	Desconhecido	7q31	Mustapha <i>et al.</i> , 1998		
			Chen <i>et al.</i> , 1997		
DFNB15/72/95	GIPC3	19p13.3	Ain <i>et al.</i> , 2007		
			Charizopoulou <i>et al</i> ., 2011		

Tabela 4. Informações referentes ao *lócus* e localização dos genes relacionados às perdas auditivas não-sindrômicas autossômica recessiva.

			Rehman <i>et al.</i> , 2011		
DFNB16	STRC	15q21-q22	Verpy <i>et al.</i> , 2001		
DFNB17	Desconhecido	7q31	Greinwald <i>et al.</i> , 1998		
			Jain <i>et al.</i> , 1998		
DFNB18	USH1C	11p14-p15.1	Ouyang <i>et al.</i> , 2002		
			Ahmed <i>et al.</i> , 2002		
			The Molecular Biology of Hearing		
	Descentraide	10-11	and Deafness meeting Bethesda,		
DENRIA	Desconnecido	18011	October 8-11, 1998 (Green et		
			<i>al</i> ., abstract 108)		
DFNB20	Desconhecido	11q25 - qter	Moynihan <i>et al.</i> , 1999		
DFNB21	TECTA	11q	Mustapha <i>et al.</i> , 1999		
DFNB22	ΟΤΟΑ	16p12.2	Zwaenepoel <i>et al.</i> , 2002		
DFNB23	PCDH15	10p11.2 - q21	Ahmed <i>et al.</i> , 2003		
DFNB24	RDX	11q23	Khan <i>et al.</i> , 2007		
DFNB25	GRXCR1	4p13	Schraders <i>et al.</i> , 2010		
DFNB26	Desconhecido	4q31	Riazuddin <i>et al.</i> , 2000		
DFNB27	Desconhecido	2q23 - q31	Pulleyn <i>et al.</i> , 2000		
	TRIOBP	22012	Shahin <i>et al.</i> , 2006		
DFINDZO		22413	Riazuddin <i>et al.</i> , 2006		
DFNB29	CLDN14	21q22	Wilcox <i>et al.</i> , 2001		
DFNB30	МҮОЗА	10p11.1	Walsh <i>et al.</i> , 2002		
DENB31	WHRN	9a32 - a31	Mustapha <i>et al.</i> , 2002		
DINEST		5452 - 454	Mburu <i>et al.</i> , 2003		
DENB32/82	GPSM2	1n13 3-n22 1	Masmoudi et al., 2003		
BI 11802/02			Walsh <i>et al.</i> , 2010		
DFNB33	Desconhecido	9q34.3	Medlej-Hashim <i>et al.</i> , 2002		
DENB35	ESBBB	14024 1-024 3	Ansar <i>et al.</i> , 2003		
Britboo			Collin <i>et al.</i> , 2008		
DFNB36	ESPN	1p36.3	Naz <i>et al.</i> , 2004		
DFNB37	MYO6	6q13	Ahmed <i>et al.</i> , 2003		
DFNB38	Desconhecido	6q26-q27	Ansar <i>et al.</i> , 2003		
DFNB39	HGF	7q21.1	Schultz et al., 2009		
DFNB40	Desconhecido	22q	Delmaghani <i>et al.</i> , 2003		
DFNB42	ILDR1	3g13 31-g22 3	Aslam <i>et al.</i> , 2005		
UFIND42		0410.01-422.0	Borck <i>et al.</i> , 2011		

DFNB44	Desconhecido	7p14.1-q11.22	Ansar <i>et al.</i> , 2004		
DFNB45	Desconhecido	1q43-q44	Bhatti <i>et al.</i> , 2008		
DFNB46	Desconhecido	18p11.32-p11.31	Mir <i>et al.</i> , 2005		
DFNB47/83	Desconhecido	2p25.1 - p24.3	Hassan <i>et al.</i> , 2005		
DFNB48	Desconhecido	15q23 - q25.1	Ahmad <i>et al.</i> , 2005		
	MARVELD2	5a12 3-a1/ 1	Ramzan <i>et al.</i> , 2004		
DINDAS			Riazuddin <i>et al.</i> , 2006		
DFNB51	Desconhecido	11p13-p12	Shaikh <i>et al.</i> , 2005		
DFNB53	COL11A2	6p21.3	Chen <i>et al.</i> , 2005		
DFNB55	Desconhecido	4q12-q13.2	Irshad <i>et al.</i> , 2005		
DFNB59	PJVK	2q31.1-q31.3	Delmaghani <i>et al.</i> , 2006		
DFNB61	SLC26A5	7q22.1	Liu <i>et al.</i> , 2003		
DFNB62	Desconhecido	12p13.2-p11.23	Ali <i>et al.</i> , 2006		
DFNB63	LRTOMT/COMT2	11a13 2-a13 4	Du <i>et al.</i> , 2008		
		11915.2-915.4	Ahmed <i>et al.</i> , 2008		
DFNB66/67	LHFPL5	6p21.2-p22.3	Tlili <i>et al.</i> , 2005		
			Shabbir <i>et al.</i> , 2006		
			Kalay <i>et al.</i> , 2006		
DFNB68	Desconhecido	19p13.2	Santos <i>et al.</i> , 2006		
DFNB71	Desconhecido	8p22-p21.3	Chishti <i>et al.</i> , 2009		
DFNB73	BSND	1p32.3	Riazuddin <i>et al.</i> , 2009		
DENB74	MSBB3	12a1/ 2-a15	Waryah <i>et al.</i> , 2009		
	MONEO		Ahmed <i>et al.</i> , 2011		
DFNB77	LOXHD1	18q12-q21	Grillet <i>et al.</i> , 2009		
DFNB79	TPRN	9q34.3	Rehman <i>et al.</i> , 2010		
DFNB81	Desconhecido	19p	Rehman <i>et al.</i> , 2011		
DFNB84	PTPRQ	12q21.2	Schraders et al., 2010		
DFNB85	Desconhecido	17p12-q11.2	Shahin <i>et al.</i> , 2010		
DFNB91	SERPINB6	6p25	Sirmaci <i>et al.</i> , 2010		
DFNB93	Desconhecido	11q12.3-q13.2	Tabatabaiefar <i>et al.</i> , 2011		

Fonte: Van Camp & Smith, (2012); Petersen & Willems, (2006).

1.2.2.2.3. Perda Auditiva Não-Sindrômica Ligada ao Cromossomo X (DFNX)

As DFNXs são menos comuns que as DFNAs e as DFNBs, apresentando aproximadamente 1,7% dos casos de perda auditiva relacionados às causas genéticas. Na maioria destes casos, a perda é pré-lingual e mista ou neurossensorial (Lalwani *et al.* 1994).

Até 2012 já haviam sido relatadas cinco tipos de DFNX (Tabela 5).

Tabela 5. Informações referentes ao *lócus* e localização dos genes relacionados às perdas auditivas não-sindrômicas ligadas ao cromossomo X.

Lócus	Gene	Localização	Referências Bibliográficas			
DFNX1 (DFN2)	PRPS1	Xq22	Liu <i>et al.</i> , 2010			
DFNX2 (DFN3)	POU3F4	Xq21.1	De Kok <i>et al.</i> , 1995			
DFNX3 (DFN4) Desconhecido		Xp21.2	Lalwani <i>et al.</i> , 1994			
DFNX4 (DFN6) SMPX		Xp22	del Castillo <i>et al.</i> , 1996			
DFNX5 (AUNX)	Desconhecido	Xq23-q27.3	Wang <i>et al.</i> , 2006			

Fonte: Van Camp & Smith (2012).

1.2.2.2.4. Perda Auditiva Não-Sindrômica Ligada ao Cromossomo Y (DFNY)

Outra classificação de perda auditiva não-sindrômica, ainda mais rara que a DFN, sendo conhecido de forma parcial apenas um *lócus* no cromossomo Y que possa apresentar alguma mutação e acarretar em algum tipo de perda auditiva. O *lócus* é chamado de DFNY1 (Wang *et al.*, 2004).

1.2.2.2.5. Perda Auditiva Não-Sindrômica Ligada ao DNA Mitocondrial (DNAmt)

A mitocôndria é uma organela esférica e alongada presente dentro das células da maioria dos eucariontes. Cada célula apresenta de 2 a 100 mitocôndrias e estas tem várias

funções, sendo a principal delas a transformação dos metabólitos em energia acessível para as células na forma de *ATP* (Trifosfato de Adenosina). Além disso, ela apresenta seu próprio DNA, conhecido com DNA mitocondrial (DNAmt) (Figura 6), responsável pela codificação de proteínas relacionadas a cadeia respiratória e de componentes do complexo de síntese protéica. Este tem estrutura circular fechada com 16.569 bases pareadas e 37 genes, sendo 13 genes relacionados ao RNAm, 2 ao RNAr e 22 ao RNAt. Esta estrutura possui seu prórpio mecanismo de replicação, transcrição e tradução, porém necessita dos estímulos/interações oriundos do DNA nuclear e do sistema de reparo deste, sendo assim considerada uma estrutura semi-autônoma (Carvalho & Ribeiro, 2002; Xin Guan *et al.*, 2004; Alberts *et al.*, 2002).





Estima-se que a ocorrência de mutações no DNAmt é superior ao DNA nuclear pois a mitocôndria não apresenta um sistema de reparo próprio, sendo exposto constantemente a ação de radicais livres. Alterações no DNAmt não acarretam em problemas estruturais, mas sim funcionais nas células afetadas. Além disso, a mutação neste DNA pode estar presente em todas as mitocôndrias das células filhas (homoplasmia) ou apenas em algum tecido ou órgão (heteroplasmia) (Wallace DC, 1992).

Assim sendo, algumas mutações no DNA mitocondrial de células ciliadas pode causar perda auditiva do tipo bilateral, simétrica, neurossensorial e progressiva, devido ao

fato da cóclea ser um órgão que necessita de alta demanda energética. Algumas das principais alterações podem ser vistas na Tabela 6 (Brianti *et al.*, 2003; Carvalho & Ribeiro, 2002).

Calcula-se que perda auditiva associada à mutações do DNAmt de células ciliadas correspondam a 0,5-1% do total relacionado à genética, podendo ser sindrômica ou não-sindrômica (Carvalho & Ribeiro, 2002).

Esta relação da mutação do DNA mitocondrial com a perda auditiva foi estabelecida em 1986 por Petty e colaboradores, em um estudo realizado em cima de um caso sindrômico (paciente com miopatia mitocondrial e perda auditiva). Já o primeiro relato de perda auditiva não-sindrômica relacionada a mutação mitocondrial foi feito em 1993, por Fishel-Ghodsian e colaboradores.

Um dos principais casos de perda auditiva causada por mutações no DNA mitocondrial é relatado num quadro clínico de suscetibilidade aos aminoglicosídeos. Estes são antibióticos que começaram a ser utilizados de forma ampla na década de 60, no tratamento de infecções do trato respiratório. O seu uso causou perda auditiva em alguns pacientes e estudos comprovaram seu efeito ototóxico (Carvalho & Ribeiro, 2002).

Higashi (1989), após algumas observações no padrão de herança materno sugeriu que a sensibilidade poderia estar relacionada a algum tipo de mutação no DNA mitocondrial. Já Prezant e colaboradores (1993) relacionaram uma mutação do DNAmt com a sensibilidade ao antibiótico aminoglicosídeo. A alteração encontrada foi a troca do nucleotídeo adenina (A) por uma guanina (G) no gene ribossômico *12S rRNA (MT-RNR1)*, localizado na posição 1555 do DNA mitocondrial. Este tipo de mutação é caracterizado como homoplásmica, tendo um quadro de perda auditiva neurossensorial, bilateral e profunda.

Quadro Clínico	Lócus	Gene	Mutação	Status	Но	Не	Referências
							Bibliográficas
Perda Auditiva	MT-RNR1	12S rRNA	m.827A>G	Prov	+	-	Li <i>et al</i> . (2005)
Perda Auditiva	MT-RNR1	12S rRNA	m.961T>C	Prov	+	-	Li <i>et al</i> . (2005)
Perda Auditiva	MT-RNR1	12S rRNA	T961delT+C(n)i	Prov	+	+	Bacino <i>et al.</i> (1995)

Tabela 6. Alterações no DNAmt relacionadas a perda auditiva não-sindrômica.

			ns				
Perda Auditiva	MT-RNR1	12S rRNA	T961insC	Prov	+	-	Bacino <i>et al.</i> (1995)
Perda Auditiva	MT-RNR1	12S rRNA	m.1005T>C	Prov	+	-	Li <i>et al</i> . (2005)
Perda Auditiva	MT-RNR1	12S rRNA	m.1095T>C	Conf	+	+	Tessa <i>et al.</i> (2001)
Perda Auditiva	MT-RNR1	12S rRNA	m.1116A>G	Prov	+	-	Li <i>et al</i> . (2005)
Perda Auditiva	MT-RNR1	12S rRNA	m.1494C>T	Prov	+	-	Zhao <i>et al</i> . (2004)
Perda Auditiva	MT-RNR1	12S rRNA	m.1555A>G	Conf	+	-	Fischel-Ghodsian <i>et al.</i> (1993) Hutchin <i>et al.</i> (1993) Matthijs <i>et al.</i> (1996) Prezant <i>et al.</i> (1993) Tono <i>et al.</i> (1998) Tulinius <i>et al.</i> (1995) Usami <i>et al.</i> (1998)
Perda Auditiva Neurossensorial	MT-TS1	tRNA Ser (UCN)	m.7510T>C	Prov	-	+	Hutchin <i>et al.</i> (2000)
Perda Auditiva Neurossensorial	MT-TS1	tRNA Ser (UCN)	m.7511T>C	Prov	+	+	Sue <i>et al.</i> (1999)
Perda Auditiva e Disfunção Cerebelar	MT-TS1	tRNA Ser (UCN)	7472insC	Prov	-	+	Tiranti <i>et al.</i> (1995)
Perda Auditiva	MT-TS1	tRNA Ser (UCN)	m.7445A>G	Conf			Reid et al. (1994) Fischel-Ghodsian <i>et al.</i> (1995) Servior <i>et al.</i> (1998)
Perda Auditiva	MT-TH	tRNA His	m.12183G>A	Prov	-	+	Crimi <i>et al.</i> (2003)
Perda Auditiva, Retardo Mental e Disfunção Cerebelar	MT-TE	tRNA Glu	m.14709T>C	Prov	-	+	Hanna <i>et al.</i> (1995)

Legenda. **Ho:** Homoplasmia; **He:** Heteroplasmia; **Prov:** Reportado, porém não confirmado; **Conf:** Confirmado por vários relatos na litaratura.

Fonte: MITOMAP < http://www.mitomap.org/bin/view.pl/MITOMAP/ClinicalPhenotypesRNA#21>; Van Camp & Smith, (2012).

1.2.3. Principais genes estudados no trabalho

1.2.3.1. O gene GJB2

O gene *GJB2* (GenBank 2706) foi o primeiro gene de perda auditiva não-sindrômica autossômica neurossensorial a ser relatado, sendo mais tarde confirmado como o maior responsável de perda auditiva não-sindrômica autossômica recessiva, presente em, aproximadamente, 80% dos casos (Rabionet *et al.*, 2000).

Segundo levantamento de Mignon e colaboradores (1996), o *lócus* onde se encontra o gene está na região cromossômica 13q11-q12, responsável pela codificação de uma proteína da família das *Gap Junction* β .

O gene *GJB2* apresenta tamanho de 5513 pb e é composto por 2 exons, porém apenas um deles é codificante (Figura 7). Seu RNA mensageiro (RNAm) apresenta 2250 pb e é traduzido em uma proteína de 226 aminoácidos.



Figura 7. **Esquematização da estrutura do gene** *GJB2* (Disponível em: GenBank < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/2706 >).

O gene é expresso na estria vascular, na membrana basal, no limbus e na espiral da cóclea. Este é responsável pela codificação da uma proteína Conexina 26 (Cx26), pertencente à família das conexinas, que apresentam 4 domínios transmembranares (Figura 8) (Kelley *et al.*, 1998).



Figura 8. **Esquematização da estrutura das conexinas.** Domínios transmembrânicos (TM1-TM4); extremidade aminoterminal (NH2); extremidade carboxiterminal (COOH); alça intracitoplasmática (IC) e extracelulares (EC1 e EC2) (Modificado de: Rabionet *et al.*, 2000).

Seis conexinas se complexam formando um hexâmero na membrana plasmática denominado *conexon* (Figura 9a). Estes podem ser compostos por conexinas de apenas um tipo, sendo denominados *conexons* homoméricos, ou por diferentes tipos de conexinas, sendo chamado de heteromérico. Cada *conexon* se associa a outro *conexon* de uma célula adjacente, formando assim um canal intercelular denominado *gap junction* (Figura 9b), que podem ser heterotípicos, quando formados por *conexons* heteroméricos ou por dois *conexons* homoméricos diferentes, ou podem ser homotípicos, quando ambos *conexons* são idênticos (Figura 9c) (Kumar & Gilula, 1996; D'Andrea *et al.*, 2002; Zeilinger *et al.*, 2005; Dahl *et al.*, 1992).

а





Figura 9. Estrutura cristalográfica do *conexon* (PDB ID 2ZW3). (a) Modelo estrutural de um *conexon*, onde cada conexina está representada por uma cor diferente. Destaque para a visualização do canal formado para a troca de íons e passagem de demais moléculas (Estrutura obtida utilizando o *software* PyMol. Disponível em:< http://www.pymol.org/>, 2012); (b) Modelos das interações entre os *conexons* de células adjacentes (*gap junction*); (c) Representação esquemática das interações entre conexinas e *conexons* (Modificao de: Maeda *et al.*, 2009).

Os *gap junctions* são únicos em vários aspectos, sendo estruturas grandes e com um canal relativamente largo, permitindo a passagem de íons e pequenas moléculas, tornandose então estruturas não seletivas. Além disso, eles não precisam de estímulos de origem química para serem abertos, necessitando apenas da alteração de potencial da membrana plasmática. Outra característica dos *gap junctions* é a de realizarem, na grande maioria, trocas bidirecionais, ou seja, eles permitem tanto a entrada quanto a saída de íons e moléculas (Connors & Long, 2004).

De acordo com Holt e colaboradores (1999), as alterações no gene *GJB2* que resultam em mudanças na conformação das conexinas acaba por prejudicar não apenas a reciclagem dos íons de potássio na endolinfa coclear, mas também a troca de outros íons e pequenas moléculas. O problema na reciclagem destes íons acaba acarretando no quadro clínico de perda auditiva neurossensorial, decorrente da falta da homeostase iônica da endolinfa, essencial para a audição normal (Mignon *et al.*, 1996; Steel KP, 1999).

Até o momento, já foram reportadas mais de 302 alterações no gene da *GJB2* (Cooper *et al.* - Human Gene Mutation Database. Disponível em: <www.hgmd.org>, 2012) e estas estão envolvidas em perdas auditivas com padrão autossômico dominante (DFNA3A), porém o padrão autossômico recessivo (DFNB1A) é que apresenta maior número de mutações, gerando um quadro clínico de perda auditiva pré-lingual, bilateral, simétrica de grau moderado à profundo (Kemperman *et al.*, 2002).

A principal alteração detectada no gene *GJB2* corresponde a uma deleção de uma única base denominada c.35delG. Esta é a deleção de uma base nitrogenada guanina em uma sequência de 6 guaninas. A sua localização se dá na posição 35 do gene. Estima-se que esta seja responsável por 70% de todos os casos de perda auditiva não-sindrômico com padrão autossômico recessivo na população caucasiana (Wilcox *et al.*, 2000).

A frequência da c.35delG, em algumas populações, chega a 4% (Gasparini *et al.* 2000; Roux *et al.*, 2004). Na população européia apresenta frequência maior até mesmo que a mutação ΔF508 no gene *CFTR*, causador da fibrose cística na população dos países do mediterrâneo. Estruturalmente falando, a alteração c.35delG ocorre no primeiro domínio intracitoplasmático (IC1) da Cx26, resultando em na troca do quadro de leitura dos *códons* (*frameshift*). Assim, no *códon* 12, o aminoácido Glicina é trocado por uma Valina, gerando um códon de terminação (*stop códon*) na sequência, resultando no término da tradução. Com esse término prematuro, é formado um peptídeo não funcional de apenas 12 aminoácidos, ao invés de 226 aminoácidos. Outras alterações estão presentes em grande frequência de acordo com a população. Um exemplo se dá com a população de judeus e de asiáticos, sendo as principais alterações detectadas a c.167delT e a c.235delC, respectivamente. Ambas deleções também causam *frameshift* e geram proteínas não funcionais (Zelante *et al.*, 1997; Kemperman *et al.*, 2002).

1.2.3.2. O gene GJB6

O gene *GJB6* (GenBank 10804) está presente na região cromossômica 13q12 e codifica outra proteína da família das conexinas, denomidada 30 (Cx30). Este gene apresenta 10.434 pb de comprimento e 3 éxons, gerando um RNAm de 1808 pb e uma

proteína de 261 aminoácidos (Figura 10). Está localizado a, aproximadamente, 35 kb do gene *GJB2* (Kelley *et al.*, 1999).



Figura 10. Esquematização da estrutura do gene *GJB6.* (GenBank. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/10804>, 2012).

Estima-se que 10-40% dos indivíduos com mutações no gene *GJB2* apresentam a alteração em apenas um dos alelos. Sendo assim, em alguns estudos realizados na tentativa de justificar a perda auditiva nestes casos, pesquisadores detectaram casos de heterozigotos compostos envolvendo os genes *GJB2* e *GJB6*. Duas grandes deleções foram detectadas associadas à heterozigotos para mutação no gene *GJB2*, sendo elas: a *del(GJB6-D13S1830)*, uma deleção de 342 kb relacionada a 50% dos casos de heterozigotos para o gene *GJB2* e a *del(GJB6-D13S1854)* de 232 kb de comprimento, com 25% dos casos. Ainda não se tem conhecimento se estas grandes deleções associadas aos heterozigotos para *GJB2* apresentam alto grau de complexidade de herança digênica ou se há a deleção de elementos regulatórios do gene *GJB2*, gerando a inativação deste (Wilcox *et al.*, 2000; Del Castillo *et al.*, 2005).

De acordo com relatos na literatura, outras alterações e grandes deleções no gene da Cx30 podem existir. Como o caso de um indivíduo que apresentou uma deleção de 920 kb no *lócus* DFNB1, removendo tanto o gene *GJB6* quanto o *GJB2*. Em outro estudo, uma nova deleção de 131,4 kb que apresenta ponto de quebra a mais de 100 kb dos genes *GJB2* e *GJB6* foi encontrada em quatro indivíduos heterozigotos para a deleção c.35delG no gene *GJB2*. Esta deleção resultou na redução do nível de expressão do RNAm dos genes próximos, sendo então associada a existência de alguma região regulatória que controle a expressão dos genes responsáveis pela codificação da Cx26 e Cx30. A figura 11 esquematiza as 4 deleções reportadas na literatura em relação ao gene *GJB6* (Feldmann *et al.*, 2009; Wilch *et al.*, 2010).



Figura 11. Representação esquemática das 4 grandes deleções envolvendo o gene *GJB6* e possível região regulatória (Modificado de: Wilch *et al.*, 2010).

Com todos os dados relatados, a detecção das deleções é indicada na presença de alguma alteração, em heterozigose, do gene *GJB2*.

1.2.3.3. O gene OTOF

Na região cromossômica 2p22-p23, o gene *OTOF* apresenta 101.496 pb arranjados em 48 éxons, sendo os primeiros 19 éxons comuns a todas isoformas, que podem variar devido aos *splicing* alternativos que ocorrem, mas a sua maior estrutura apresenta um RNAm com 7171 pb e uma proteína de 1997 aminoácidos. Este gene codifica a proteína citosólica denominada Otoferlina, expressa no cérebro, no sistema vestibular e nas células ciliadas internas e externas (Yasunaga *et al.*, 2000).

Pertencente a família das Ferlinas, a Otoferlina consiste em uma região transmembrânica e seis domínios citoplasmáticos C2 (Figura 12). Estima-se que esta proteina apresenta papel importante nas sinapses entre as células ciliadas internas e o nervo auditivo (Roux *et al.*, 2006; Dulon *et al.*, 2009).



Figura 12. **Esquema da estrutura, domínios C2 e da mutação p.Q829X na Otoferlina (isoforma 1).** TM = Domínio Transmembrânico; C2A/C2B/C2C/C2D/C2E/C2F = Domínios C2; NT = Região Amino-Terminal; CT = Região Carboxi-Terminal. Destaque para a alteração p.Q829X, que ocorre entre o domínio C2C e C2D, finalizando a proteína nesta posição e gerando um peptídeo não funcional (Modificado de: Mahdieh *et al.*, 2012).

Sabendo que a otoferlina está envolvida no processo auditivo, estudos foram realizados para detectar a interferência desta na audição, associando alterações no gene ao padrão autossômico recessivo. O *lócus* ocupado inicialmente era DFNB6, porém o gene *OTOF* recebe atualmente a classificação no *lócus* DFNB9 (Van Camp & Smith, 2012).

Aproximadamente 80 alterações neste gene foram reportadas até 2012 de acordo com o *Human Gene Mutation Database*. Em um estudo realizado com indivíduos espanhóis, a mutação que apresentou-se com maior frequência foi a p.Q829X. A troca de uma glutamina na posição 829 por um *stop códon* é oriunda da troca de uma citosina por uma timina na posição 2485 do gene (éxon 22), gerando uma proteína truncada e não funcional. Neste mesmo estudo, verificou-se a frequência de 4,4% nos casos recessivos esporádicos ou familial da população espanhola, sendo considerada a terceira mais frequente mutação relacionada com a perda auditiva nesta população, responsável por, aproximadamente, 3%

de todos os casos de perda auditiva pré-lingual com padrão autossômico recessivo. Com tais parâmetros, é sugerido incluir tal alteração na triagem laboratorial da perda auditiva pré-lingual (Migliosi *et al.*, 2002).

1.2.3.4. O gene miR96

MicroRNA (miRNA) é a classificação da classe mais proeminentes dos RNAs não codificantes (RNAnc) e estão envolvidos com a regulação da expressão em células animais e vegetais. Dentre as funções dos miRNAs está a supressão da tradução do RNA mensageiro. Para isso, há o anelamento imperfeito na região 3' *UnTranslated Region* (3' UTR) entre o miRNA e o RNAm, resultando no bloqueio e término da tradução, gerando um peptídeo não funcional ou na clivagem do RNAm.

Estudos da associação dos miRNAs com a perda auditiva começaram em 2005. Em um dos estudos feito com animais foi possível verificar a presença de miRNAs na orelha interna. Verificou-se que os miRNAs também estavam presentes na cóclea, no ganglio espiral e no vestíbulo, porém estes RNAs não codificantes apresentavam seu nível reduzido com o passar do tempo, desaparecendo gradativamente das células ciliadas da cóclea. Com isso, sugeriu-se que estes miRNAs estavam associados a diferenciação e maturação das células ciliadas (Weston *et al.*, 2006; Friedman *et al.*, 2009).

De acordo com o banco de dados MirBase (Disponível em: <www.mirbase.org>, 2012), já se tem relatados 21.264 entradas de miRNAs. Entre os humanos, este número é de 1.600 precursores e 2.042 microRNAs maduros relatados até agosto de 2012.

Os genes de miRNA podem estar isolados ou em *clusters*, podendo gerar transcritos policistrônicos. Este é o caso do *cluster miR183/96/182* (Figura 13), o principal *cluster* de microRNAs relacionados a perda auditiva (Weston *et al.*, 2006). Mencía e colaboradores (2009) relataram a presença de 2 novas mutações na conservada região *seed* do gene do *miR96* (GenBank 407053), a c.13G>A e a c.14C>A em indivíduos que apresentavam perda auditiva progressiva, classificando o gene com padrão autossômico domintante (DFNA50). O gene *miR96* está presente na região cromossômica 7q32.2, contendo um éxon de 78 pb de

comprimento. O RNA gerado do DNA, denominado *pri-miRNA*, é clivado até originar o miRNA maduro de 23 pb, denominado *hsa-mir-96*.



Figura 13. Representação do cluster *miR183/96/182* presente no cromossomo 7 (Modificado de: NCBI <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/407053>, 2012).

Muitos estudos são necessários para verificar as funções de cada microRNA, uma vez que estes estudos são recentes. Porém, é alta a velocidade do avanço nos estudos relacionados aos microRNAs, o que auxiliará no entendimento destes pequenos transcritos e suas relações com várias patologias.

1.2.3.5. O gene TMC1

Localizado no cromossomo 9, na região q13-q21, o gene *TMC1* (*TransMembrane Channel-like 1* – GenBank 117531) apresenta comprimento de 314,551 pb, arranjados em 24 éxons. Este origina sete isoformas de transcrito, porém a principal delas apresenta um RNA de 3.201 pb e uma proteína de 760 aminoácidos (Kurima *et al.*, 2003).

Este gene é conhecido por ser o sexto gene mais comum causador de perda auditiva na população mundial, sendo expresso especificamente na cóclea, codificando a proteína de canal transmembrânico. Em torno de 40 alterações estão associadas a este gene, sendo a troca de uma Timina por uma Citosina na posição 1939 do gene, responsável por alteração p.S647P, a principal alteração detectada em um estudo envolvendo um grupo de 104 judeus marroquinos não relacionados que apresentavam perda auditiva, totalizando 35 casos. Destes casos, 10 eram homozigotos para a alteração c.35delG (gene *GJB2*) e p.S647P (gene *TMC1*), 10 casos eram homozigotos apenas para a alteração p.S647P, 6 casos de

heterozigotos compostos para p.S647P e p.R604X (ambas no gene *TMC1*) e 9 casos de heterozigotos para a p.S647P.

A alteração p.S647P está locaizada no sexto domínio transmembrânico TMC1, em um sítio totalmente conservado, aparentando ser uma mutação fundadora na população de judeus marroquinos devido a comunidade apresentar, até recentemente, alta taxa de endogamia. Esta alteração foi reportada como altamente frequente nos casos de perda auditiva nesta população, sendo detectada em padrão autossômico recessivo (DFNB7/11) em 38% dos casos estudados, sendo também detectada com padrão autossômico dominante (DFNA36). Em outras populações, como de turcos e israelitas, alterações neste gene são as principais causadoras de perda auditiva. Assim, o rastreamento das alterações no gene *TMC1* é tão importante quanto a triagem das alterações do gene *GJB2* em determinadas populações (Brownstein *et al.*, 2011; Labay *et al.*, 2010; Hilgert *et al.*, 2009).

1.2.3.6. O gene SLC26A4

Composto por 21 éxons, porém apenas 20 codificantes, o gene *SLC26A4* (GanBank 5172) é responsável pela codificação da proteína altamente hidrofóbica denominada Pendrina. Localizado na região 7q31 e com 57.175 pb, o gene gera um transcrito de 4.930 pb, que codifica a maior isoforma, com 780 aminoácidos. A pendrina está associada a formação e reabsorção da endolinfa, sendo conhecida como um transportador de ânions expresso na tireóide, nos rins e na orelha interna (Scott *et al.*, 1999; Iwasaki *et al.*, 2001).

Everett (1997) associou mutações neste gene a Síndrome de Pendred (SP), sendo esta a causa mais comum de perda auditiva sindrômica. Porém além da forma sindrômica, este gene esta relacionado a perda auditiva não-sindrômica autossômica recessiva (DFNB4) juntamente com o alargamento do aqueduto vestibular, sendo esta a má formação radiologicamente mais frequentemente detectável na orelha interna em indivíduos com perda auditiva (Bamiou *et al.*, 2000; Mafong *et al.*, 2002).

Mais de 200 alterações foram reportadas no gene *SLC26A4*, sendo o segundo maior gene causador de perda auditiva de origem genética, responsável por 4% a 10% dos casos, seja ele na forma sindrômica (SP) ou na forma não-sindrômica (DFNB4). O padrão da perda

auditiva neurossensorial é bilateral, pré-lingual ou durante a aquisição da expressão oral, com grau severo/profundo (Angeli *et al.*, 2012).

Embora se tenha conhecimento de várias mutações e a sua associação, não se tem o esclarecimento dos mecanismos das mutações no gene *SLC26A4* e nem um estudo da associação deste gene com outros genes. Por isso, é de extrema importância o estudo aprofundado para entendimento funcional e fisiológico de tais alterações, uma vez que as mutações neste gene aparecem com uma frequência alta na população.

1.2.3.7. Genes Mitocondriais

Dentre os principais genes mitocondriais relacionados a perda auditiva nãosindrômica estão o *MT-RNR1* com 953 pb, que codifica a subunidade 12S do RNA ribossômico (RNAr) e o *MT-TS1* com 68 pb, que codifica RNAs transportadores de serina [RNAtSer(UCN)]. Dentre as mutações relacionadas ao DNA mitocondrial (DNAmt) e a perda auditiva a principal é a m.1555A>G no gene *MT-RNR1*, estimada em 2% na população brasileira. A substituição de uma Adenina por uma Guanina na posição 1555 do DNAmt foi relatada, pela primeira vez por Prezant e colaboradores (1993) em uma família árabeisraelense. Esta alteração associa a susceptibilidade à perda auditiva quando induzida por aminoglicosídeos, antibiótico amplamente usado na década de 60. Indivíduos com essa alteração apresentam a subunidade 12S rRNA semelhante ao seu homólogo bacteriano, a subunidade 16S rRNA, o principal alvo do antibiótico (Abreu-Silva *et al.*, 2006).

Outras alterações mitocondriais e outras patologias merecem estudos aprofundados, uma vez que estas interferem nas funções celulares, diminuindo a quantidade de energia disponível nas células de todo o organismo para a realização de suas funções, fato preocupante, já que a cóclea é um órgão que necessita de alta demanda energética para a manutenção da audição. Além disso, casos como o da alteração m.1555A>G permitem o conhecimento de que o indivíduo com a mutação não deve fazer uso de aminoglicosídeos, evitando assim o quadro clínico de perda auditiva, a não ser que risco de morte esteja presente caso o antibiótico não seja ministrado.

1.2.4. Testes moleculares para o diagnóstico da perda auditiva

Durante os últimos 20 anos, o objetivo das pesquisas moleculares nos estudos de perda auditiva genética foi para detectar novos genes relacionados a este tipo de perda. Para isso, utilizou-se o sequenciamento de regiões suscetíveis a conter genes candidatos de perda auditiva. Historicamente, Sanger introduziu o conceito de sequenciamento de DNA em 1975 e este método continua sendo empregado atualmente. Porém, com o aperfeiçoamento das tecnologias, o sequenciamento passou a ser feito por sequenciadores de DNA automáticos, que detectavam a fluorescência de cada base nitrogenada marcada com fluoróforos quando pareada na fita, não necessitando assim a utilização de géis para a corrida da sequência, reduzindo também os riscos de erro na leitura das bases (Sanger F, 1975; Hilgert *et al.*, 2009).

O sequenciamento automático foi muito empregado na descoberta de novos genes e alterações, porém este apresentava baixo rendimento pois o sequenciamento de grandes fragmentos, além de apresentar custo elevado, exigia demasiado tempo para preparo e análise. Tendo em mente estas limitações, a aplicabilidade dos sequenciadores automáticos restringiu-se à apenas a varredura de genes pequenos, ou de fragmentos não muito grandes de DNA. Em busca de opções não muito expendiosas para a detecção de mutações no diagnóstico, variações das técnicas de *PCR (Polymerase Chain Reaction)* foram elaboradas, objetivando sempre detectar as principais mutações. Porém esta técnica também apresentava grandes limitações tendo em vista a sua aplicabilidade para o diagnóstico. Independente da variação da técnica, os resultados de *PCR* eram dados, em sua maioria, individualmente, ou seja, um resultado por reação, além de se tornar um processo caro devido o custo dos reagentes (Hilgert *et al.*, 2009).

Como mostrado acima, muitos genes e mutações estão relacionados à perda auditiva de origem genética. Sendo assim, há a necessidade de um estudo aprofundado, utilizando as mutações já descritas em um só ensaio para que possa ser feito o diagnóstico associação das mutações, podendo vir a entender os mecanismos moleculares da perda auditiva de indivíduos com etiologia desconhecida. Com o surgimento das tecnologias *'high-throughput*' (alto rendimento), foi possível a realização de vários ensaios simultâneos de uma só vez, podendo auxiliar na elucidação da etiologia de várias perdas auditivas e outras patologias de origem genética. Além disso, estas técnicas também possibilitaram o rápido

diagnóstico de várias patologias de origem genética e a genotipagem de indivíduos, detectando *SNPs* (do inglês *Single-Nucleotide Polymorphism*), mutações, deleções, inserções, etc. (Morrison *et al.*, 2006).

As plataformas *'high-throughput'* surgiram principalmente para o estudo de *SNPs* e de associação. Os *SNPs* são as formas mais comuns de variação genética entre indivíduos, estando presente a cada 1000 pb. Para ser considerado um *SNP*, a alteração deve estar presente em mais de 1% da população. Embora a frequência seja relativamente alta na população, a maioria dos *SNPs* ou ocorrem fora das regiões não codificantes de proteínas ou são alterações silenciosas, onde a troca das bases não irá resultar na troca de aminoácidos (Lai *et al.*, 2012).

Estas tecnologias são novas e tem como principais características a utilização de pequenos volumes de amostras e reagentes nas reações, a ótima acurácia e simplicidade (devido às poucas etapas e a automação, com as estações de pipetagem que, consequentemente, diminuem o tempo necessário para o desenvolvimento da parte experimental e os possíveis erros da pipetagem manual), a realização simultânea de diversos ensaios e o baixo custo (Morrison *et al.*, 2006).

1.2.4.1. A Plataforma TaqMan[®] OpenArray[™] Genotyping

A plataforma *TaqMan[®] OpenArray[™] Genotyping* (BioTrove Inc., Woburn, MA, USA) é uma tecnologia de alto rendimento (*high-throughput*) baseado em *PCR* em tempo real, que permite verificar até 3072 *SNP*s, mutações de ponto, pequenas deleções e inserções em uma única placa de genotipagem. Esta plataforma também permite realizar 2688 ensaios de expressão gênica por placa de expressão gênica. Tanto a plataforma para genotipagem quanto para expressão gênica devem obedecer um *layout* padrão de ensaio oferecido pela empresa (Applied BioSystems, 2012) (Tabela 7 – Figura 14). Baseado nas sondas de hidrólise *TaqMan[®]*, a técnica *TaqMan[®] OpenArray[™] Genotyping* necessita de um par de *primers* comuns tanto para a sequência normal quanto para a mutante, além de duas sondas *MGB* (do inglês *Minor Groove Binder*) diferentes por ensaio, sendo uma sonda para a

sequência normal, marcada com o fluoróforo $VIC^{@}$, e a outra sonda para a sequência mutante, com o fluoróforo $FAM^{@}$.

Tipos de Placas	Quantidade de Ensaios	Quantidade de Amostras			
	16	144			
Constination	32	96			
	64	48			
Genotipageni	128	24			
	192	16			
	256	12			
	18	48			
Expressão Gênica	56	48			
	112	24			
	168	16			
	224	12			

Tabela 7. Layouts oferecidos para a elaboração de placas de genotipagem e expressão gênica.

Fonte: *TaqMan[®] OpenArray[™] Genotyping System – User Guide*, 2011.



Figura 14. *Layouts* disponíveis para a confecção das placas de *OpenArray*[™]. (a) *Layout* para estudo de 16 ensaios em 144 indivíduos. Por *subarray* são analisados 3 indivíduos. (b) *Layout* para estudo de 32 ensaios em 96 indivíduos. Por *subarray* são analisados 2 indivídíduos. (c) *Layout* para estudo de 64 ensaios em 48 indivíduos. Por *subarray* é analisado 1 indivíduo. (d) *Layout* para estudo de 128 ensaios em 24 indivíduos. São necessários 2 *subarrays* para analisar todos ensaios por indivíduo. (e) *Layout* para estudo

de 192 ensaios em 16 indivíduos. São necessários 3 *subarrays* para analisar todos ensaios de um indivíduo. **(f)** *Layout* para estudo de 256 ensaios em 12 indivíduos. São necessários 4 *subarrays* para analisar todos ensaios de um único indivíduo (Modificado de: Applied BioSystems, 2012).

As placas utilizadas nos ensaios de *OpenArray*[™] apresentam as seguintes dimensões: 25 mm x 75 mm x 0,3 mm. Elas são compostas por 48 *subarrays* (4,5mm x 4,5mm), com 64 nano-poços cada (Figura 15). A sua superfície apresenta propriedades hidrofóbicas, enquanto o interior dos poços (local onde já estão as sondas e os *primers* necessários para as reações) apresenta característica hidrofílica. Esta engenharia é capaz de permitir a distribuição dos pequenos volumes (33nL) das amostras com grande acurácia e precisão (Morrison *et al.*, 2006).



Figura 15. **Placa de OpenArray™**. Representação da placa de OpenArray™, contendo os 48 subarrays e, em destaque, a esquematização de um subarray com 64 nano-poços, cada um apresentando o volume de 33nL (Modificado de: Applied BioSystems, 2012).

A plataforma é composta por um robo pipetador, *o OpenArray*[™] AccuFill[®] System (Applied Biosystems), interligado a um computador para comandar todas as operações

através do *software OpenArray*TM *AccuFill*[®]. Além deste, a plataforma conta com o termociclador *Dual Flat Block GeneAmp*[®] *PCR System 9700* da Applied Biosystems, próprio para a ciclagem das placas de *OpenArray*TM, uma estação de selagem e o *OpenArray*TM *NT Cycler*[®], o equipamento responsável pela captura da fluorescência emitida pela lâmina, também controlado via computador pelo *software OpenArray*TM *Genotyper*. Uma representação de quase toda a plataforma *TaqMan*[®] *OpenArray*TM está presente na figura 16 (Applied BioSystemns, 2012).



Figura 16. Plataforma *TaqMan*® *OpenArray*™ (Applied BioSystems, 2012).

A plataforma *TaqMan[®] OpenArray[™] Genotyping* tem como principais características, além de ser considerada tecnologia *'high- throughput'*, a praticidade, o baixo custo, a acurácia e a fácil reprodutibilidade, uma vez que os ensaios já estejam padronizados. Assim sendo, a sua utilização nas rotinas de diagnóstico de doenças complexas é muito bem vista, como é o caso da perda auditiva, que apresenta um grau de heterogeneidade elevado.

1.3. Justificativa do trabalho

Tendo em vista a grande heterogeneidade não apenas clínica, mas genética da perda auditiva, é de fundamental importância a existência de uma plataforma de testes moleculares capaz de detectar, simultaneamente, diversas alterações em diversos genes, reduzindo assim o tempo na busca pela etiologia da perda auditiva em indivíduos. Com o avanço e aperfeiçoamento das técnicas moleculares de genotipagem e diagnósticos, o surgimento da plataforma *TaqMan[®] OpenArray*[™] *Genotyping* e a padronização de um *layout* contendo algumas das principais alterações presentes na nossa população foi sugerido no trabalho, objetivando a utilização destes *layouts* para as triagens inicias no Laboratório de Genética Molecular Humana do Centro de Biologia Molecular e Engenharia Genética da Universidade Estadual de Campinas.

Espera-se, com os resultados obtidos, a padronização de uma placa de *OpenArray*[™] e um *layout* aplicável ao diagnóstico na nossa população, realizando a triagem inicial de indivíduos que apresentarem perda auditiva causadas por fatores não ambientais e de etiologia ainda desconhecida. Com isso, além de reduzir o tempo para fazer a genotipagem dos indivíduos, reduzirá o custo para a triagem das mutações, diminuindo assim os gastos para a realização do diagnóstico molecular.

OBJETIVOS
2.1. Objetivo geral

Elaborar e testar uma placa de diagnóstico contendo as principais mutações relacionadas à perda auditiva neurossensorial não-sindrômica na população brasileira, a fim de otimizar rotinas de diagnósticos das perdas auditivas de origem genética em laboratórios de pesquisa e de triagem.

2.2. Objetivos específicos

1. Rastreamento de mutações nos genes nucleares *GJB2*, *GJB6*, *OTOF*, *miR96*, *TMC1*, *CRYL1*, *SLC26A4*;

2. Rastreamento de mutações nos genes mitocondriais 12s rRNA e MT-TS1;

3. Validação da detecção de mutações contidas na placa e dos ensaios utilizando outras técnicas;

4. Avaliação das vantagens e limitações do método desenvolvido.

METODOLOGIA

3.1. Casuística

Foram selecionados 376 indivíduos entre os encaminhados ao Laboratório de Genética Molecular Humana do Centro de Biologia Molecular e Engenharia Molecular (CBMEG), por diferentes serviços do país para a busca da etiologia da perda auditiva. Destes, 86 apresentavam resultados prévios para o gene *GJB2* e/ou para o gene *GJB6* e para a mutação m.1555A>G, no gene *12S rRNA*. Ao todo, foram utilizados 94 controles ouvintes (uma placa de *OpenArray*[™]).

Este projeto foi aprovado, em forma de adendo (Anexo 1), pelo Comitê de Ética da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP, sob Nº 396/2006 (Anexo 2). Todos os pacientes incluídos nesta amostra tiveram a sua participação previamente autorizada, mediante assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, após terem recebido esclarecimento sobre o estudo a ser realizado.

3.2. Metodologia

3.2.1. Escolha das alterações

Após o levantamento bibliográfico das alterações genéticas relacionadas à perda auditiva e à população brasileira, foram selecionadas 32 mutações (Tabela 8) com a maior frequência na população a ser estudada para a elaboração da placa de *OpenArray*[™] com os ensaios.

Tabela 8. Lista das 32 alterações analisadas utilizando a plataforma TaqMan[®] OpenArray™ Genotyping.

Gene	Alteração	Modificação Proteica	Referência
GJB2	c.283 G>A	p.V95M	Kelley <i>et al.</i> , 1998
	c.339 T>G	p.S113R	Kelley <i>et al.</i> , 1998
	c.279 G>A	p.M93I	Wu <i>et al.</i> , 2002
	c.286 G>A	p.W24X	Kelsell et al., 1997

	c.439 G>A	p.E147K	Murgia PC
	c.617 A>G	p.N206S	Kenna <i>et al.</i> , 2001
	c.385 G>A	p.E129K	Kenna <i>et al.</i> , 2001
	c.109 G>A	p.V37I	Kelley <i>et al.</i> , 1998
	c.269 T>C	p.L90P	Murgia <i>et al.</i> , 1999
	c.550 C>G	p.R184W	Wilcox <i>et al.</i> , 2000
	c.551 G>C	p.R184P	Denoyelle et al., 1997
	c.516 G>A	p.W172X	Sartorato et al.
	c.224 G>A	p.R75Q	Rabionet et al.
	c.101 T>C	p.M34T	Feldmann <i>et al., 2004</i>
	c.457 G>A	p.V153I	Hilbert PC
	c.503 A>G	p.K168R	
	c.35delG	Frameshift	Zelante et al., 1997
	c.167delT	Frameshift	Zelante et al., 1997
	c.235delC	Frameshift	Fuse <i>et al., 1999</i>
GJB6	c.6013G>T		
OTOF	c.2485 C>T	p.Q829X	Migliosi <i>et al., 2002.</i>
miR96	c.13 G>A		Mencía <i>et al., 2009</i>
	c.14 C>A		Mencía <i>et al., 2009</i>
TMC1	c.1939 T>C	p.S647P	Brownstein et al., 2011
CRY1L	c.1622 T>C		
MT-TS1	m.7445 A>G		Sevior <i>et al., 1998.</i>
12S rRNA	m.1555 A>G		Prezant <i>et al., 1993</i>
	m.827 A>G		Xing <i>et al., 2006</i>
	m.1494 C>T		Zhao <i>et al.</i> , 2005
SLC26A4	c.445 G>A	p.G149R	de Moraes et al., 2012.
	c.1238 A>G	p.Q413R	de Moraes <i>et al.</i> , 2012.
	c.1826 T>G	p.V609G	Dossena <i>et al.</i> , 2011.

3.2.2. Extração do DNA genômico de sangue periférico

A extração de DNA genômico foi realizada a partir de leucócitos obtidos em 10 a 15mL de sangue periférico, coletado em tubos Vacutainer contendo 10% do anticoagulante EDTA (ácido etilenodiamino tetra-acético dissódico 2H₂O 0,5 M pH 8,0). Foi empregado o método de extração com fenol-clorofórmio, padronizado no Laboratório de Genética Molecular Humana do Centro de Biologia Molecular e Engenharia Genética (CBMEG) da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP).

Lise das hemácias. Foi adicionada a *Solução A* (Triton-X 100 a 1%; MgCl₂ 5mM; Sacarose 0,32M; Tris-HCl 10mM pH 8,0) ao sangue coletado, até atingir o volume de 50mL. Após homogeneização, o material foi preservado por 30 minutos em gelo. Em seguida, foi centrifugado a 2000rpm por 15 minutos a 4°C. O sobrenadante foi então descartado e adicionou-se 35mL de *Solução A* ao precipitado (*pellet*). Esta última operação foi repetida até a obtenção de um *pellet* branco, livre de hemácias. Posteriormente, foi adicionado 1mL da *solução B* 1X (Na₂EDTA 20mM; NaCl 20mM; Tris-HCl 20mM pH 8,0) e 250µL de *solução C* [para 1mL de solução C: 0,5mL de solução B 1X, 1mg de *Proteinase K* (Boerhinger Mannheim GmbH, Mannheim, Alemanha) e 0,5mL de SDS 10%]. O material foi incubado em banho-maria a 56°C por aproximadamente 2 horas ou a 37°C por 18 horas em alguns casos.

Purificação do DNA genômico com fenol-clorofórmio. Adicionou-se 1mL de TE 1X (Tris-HCl 10 mM, pH 8,0; EDTA 1 mM) e quantidade suficiente de fenol saturado com Tris-HCl 10mM pH 8,0 até dobrar o volume da amostra contida no tubo. Foi realizada a homogeneização por inversão lenta dos tubos durante 5 minutos, seguida da separação e da recuperação da fase aquosa (sobrenadante), onde o tubo foi centrifugado a 2.500rpm por 15 minutos à temperatura ambiente. O precipitado foi descartado e o sobrenadante foi passado para outro tubo. O procedimento foi repetido por duas vezes, primeiro substituindo o fenol por uma solução de fenol:clorofórmio:álcool isoamílico (25:24:1; v:vv) e o segundo por uma solução clorofórmio:álcool isoamílico (24:1; v:v).

Precipitação do DNA. Acrescentou-se 0,1 do volume da amostra de acetato de sódio 3M, com pH 5,5, e 2,5 volumes de etanol absoluto gelado. O DNA precipitado foi recuperado com auxílio de uma haste plástica esterilizada e lavado com etanol 70%, para a retirada do excesso de sal, antes de ser ressuspendido em um volume de 200µL de TE 1X e armazenado.

3.2.3. Genotipagem utilizando a plataforma *TaqMan[®] OpenArray[™] Genotying*

A utilização da plataforma *TaqMan[®] OpenArray[™] Genotyping*, da *Biotrove, Inc.*, exige uma série de passos para que se obtenha ótimos resultados. O experimento foi separado em 3 partes para melhor entendimento: o pré-bancada, bancada e pós-bancada (Fluxograma 1),

onde a atenção é fundamental para todas etapas. Desde o desenho dos ensaios até a análise dos resultados é necessária total concentração, uma vez que se está trabalhando com uma nova tecnologia e com inúmeros dados e pacientes.

O total de um *set* (10 placas) foi customizado para o presente trabalho. Cada placa apresentava seu código de barras e um nome próprio, que variava de HKM74 até o HKM84. Juntos com as placas de *OpenArray*TM, outros itens estavam presentes no *kit*, sendo eles: 10 placas de 384 poços; 10 minipipetas de plástico lacradas contendo 5mL do líquido de imersão; 2 seringas contendo 10mL da goma fotossensível para a selagem das placas; 10 cases de vidro; 2 caixas com ponteiras específicas e o *TaqMan[®] OpenArrayTM Genotyping Master Mix*.



Fluxograma 1. **Resumo das etapas do trabalho realizado.** Pré-Bancada: Caixas 1 e 2; Bancada: Caixas 3, 4, 5, 6 e 7; Pós-Bancada: Caixas 8 e 9.

3.2.3.1. Desenho e Síntese dos ensaios

Dentre os *layouts* disponíveis, foi escolhido o de 32 ensaios / 96 amostras para as placas de *OpenArray*[™] do trabalho, contendo dois ensaios por *subarray*. Nenhuma das sequências objetivadas no estudo haviam sido desenhadas anteriormente pela empresa

Applied BioSystems, não constando no banco de dados "Made to order" da mesma. Sendo assim, todas as alterações, mutações e SNPs selecionados para a realização dos ensaios foram customizados. Para isso, foram selecionadas as 32 seguências onde se encontravam alterações estudadas. Estas foram analisadas no site "Repeat Masker" as (http://www.repeatmasker.org/cgi-bin/WEBRepeatMasker), do Institute for Systems Biology, para verificar se as sequências eram repetitivas em outras partes do mesmo genoma ou em outro genomas (mascaramento das sequências). Assim sendo, após a inserção das sequências no software, poderia-se obter três resultados de mascaramento (Tabela 9), sendo eles:

• A sequência não ter nenhum local repetitivo no mesmo genoma estudado ou em outros genomas. Como resultado, a sequência será apresentada da mesma forma que foi inserida e estará pronta para a customização.

• A sequência apresentar alguns locais repetitivos. Como resposta, o *software* irá trocar as bases repetitivas pela letra "N", indicando que a base, ou o fragmento pode aparecer em outros locais, diminuindo a especificidade do ensaio. Ensaios com estas características só serão impedidos de ser customizados caso as bases repetitivas estejam presentes na região de confecção dos *primers* e sondas.

• Toda a sequência inserida é repetida em algum genoma. Sendo assim, o ensaio fica impossibilitado de ser customizado, pois a especificidade dele fica extremamente baixa.

Tabela 9. Esquemati	zação dos	possíveis resulta	dos de mascara	mento de sequências.

	• • •	
	Sequencia a ser mascarada	
ATGGATTGGGGCA	CGCTGCAGACGATCCTGGGGGGGT	GTGAACAAACACTC
	Possíveis Resultados	
Nenhuma sequência repetitiva	Algumas bases repetitivas	Todas bases repetitivas
ATGGATTGGGGCACGCTGCAGACGATC	ATGGATTGNNNCACGCTGCAGACGANN	NNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNN
CTGGGGGGTGTGAACAAACACTC	CTNGGGGGTGTGAACAANNACTC	NNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNN

N = Base repetitiva presente no mesmo ou em outros genomas.

Após o mascaramento, foi verificado que nenhuma das sequências, que continham de 281 a 626 pb, mostraram-se ser repetitiva no mesmo genoma a ser estudado (genoma humano) ou em qualquer outro. Para enviar as sequências para a customização, foram adicionadas as alterações alélicas a serem estudadas, todas entre colchetes precisamente no local da variação (Tabela 10). A representação das alterações alélicas a ser enviadas obedece o padrão [X/Y], onde o X representa a base da sequência normal e o Y a troca. Para deleções, o padrão utilizado foi [X/*].

Tabela	10.	Alterações	е	sequências	selecionadas	para	0	estudo	utilizando	а	plataforma	TaqMan®
OpenA	rray	™ Genotypin	ıg.									

Gene	Ensaio	Alteração	Sequência	Tamanho da sequência utilizada
GJB2	c.35delG	[G/*]	ATACATTTAATCCTATGACAAACTAAGTTGGTTCTGTCTTCAC CTGTTTTGGTGAGGTTGTGTGTAAGAGTTGGTGTTTGCTCAGGA AGAGATTTAAGCATGCTTGCTTACCCAGACTCAGAGAAGTCT CCCTGTTCTGTCCTAGCTAGTGATTCCTGTGTGTGTGTGT	403
	c.167delT	[T/*]	ATGGATTGGGGCACGCTGCAGACGATCCTGGGGGGTGTGAA CAAACACTCCACCAGCATTGGAAAGATCTGGCTCACCGTCCT CTTCATTTTTCGCATTATGATCCTCGTTGTGGCTGCAAAGGAG GTGTGGGGAGATGAGCAGGCCGACTTTGTCTGCAACACCC[T /*]GCAGCCAGGCTGCAAGAACGTGTGCTACGATCACTACTTC CCCATCTCCCACATCCGGCTATGGGCCCTGCAGCTGATCTTC GTGTCCACGCCAGCGCCTCTAGTGGCCCATGCACGTGGCCTA CCGGAGACATGAGAAGAAGAAGAAGTTCATCAAGGGGGGAGA TAAAG	336
	c.235delC	[C/*]	CTGGCTCACCGTCCTCTTCATTTTTCGCATTATGATCCTCGTT GTGGCTGCAAAGGAGGTGTGGGGGAGATGAGCAGGCCGACTT TGTCTGCAACACCCTGCAGCCAGGCTGCAAGAACGTGTGCT ACGATCACTACTTCCCCATCTCCCACATCCGGCTATGGGCC[C/*]TGCAGCTGATCTTCGTGTCCACGCCAGCGCTCCTAGTGG CCATGCACGTGGCCTACCGGAGACATGAGAAGAAGAAGAGGAAG TTCATCAAGGGGGAGATAAAGAGTGAATTTAAGGACATCGAG GAGATCAAAACCCAGAAGGTCCGCATCGAAGGCTCCCTGTG GTGGA	335
	c.283G>A (p.V95M) rs104894821	[G/A]	CCAGCATTGGAAAGATCTGGCTCACCGTCCTCTTCATTTTC GCATTATGATCCTCGTTGTGGCTGCAAAGGAGGTGTGGGGA GATGAGCAGGCCGACTTTGTCTGCAACACCCTGCAGCCAGG CTGCAAGAACGTGTGCTACGATCACTACTTCCCCATCTCCCA CATCCGGCTATGGGCCCTGCAGCTGATCTTCGTGTCCACGC CAGCGCTCCTAGTGGCCATGCAC[G/A]TGGCCTACCGGAGAC ATGAGAAGAAGAGGAAGTTCATCAAGGGGGGAGATAAAGAGT GAATTTAAGGACATCGAGGAGATCAAAACCCAGAAGGTCCGC ATCGAAGGCTCCCTGTGGTGGACCTACACAAGCAGCAGCATCTTC TTCCGGGTCATCTTCGAAGCCGCCTTCATGTACGTCTTCTAT GTCATGTACGACGGCTTCCCATGCAGCGGCTGGTGAACTG CAACGCCTGGCCTTGTCCCAACACACTGTGGACTGGTGTGC CCGGCCCACGGA	508
	c.339T>G (p.S113R)	[T/G]	CAAAGGAGGTGTGGGGGAGATGAGCAGGCCGACTTTGTCTGC AACACCCTGCAGCCAGGCTGCAAGAACGTGTGCTACGATCA CTACTTCCCCATCTCCCACATCCGGCTATGGGCCCTGCAGCT GATCTTCGTGTCCACGCCAGCGCTCCTAGTGGCCATGCACG TGGCCTACCGGAGACATGAGAAGAAGAGGAAGTTCATCAAG GGGGAGATAAAGAG[T/G]GAATTTAAGGACATCGAGGAGATC AAAACCCAGAAGGTCCGCATCGAAGGCTCCTGTGGTGGAC CTACACAAGCAGCATCTTTTCCGGGTCATCTTCGAAGCCGC CTTCATGTACGTCTTCTATGTCATGTACGACGACGGCTTCTCCATG	439

c.279G>A (p.M93I)	[G/A]	ATCTGGCTCACCGTCCTCTTCATTITTCGCATTATGATCCTCG TTGTGGCTGCAAAGGAGGTGTGGGGGAGATGAGCAGGCCGAC TTTGTCTGCAACACCCTGCAGCCAGGCTGCAAGAACGTGTGC TACGATCACTACTTCCCCATCTCCCACATCCGGCTATGGGCC CTGCAGCTGATCTTCGTGTCCACGCCAGCGCTCCTAGTGGC CAT[G/A]CACGTGGCCTACCGGAGACATGAGAAGAAGAAGAGGAA GTTCATCAAGGGGGAGATAAAGAGTGAATTTAAGGACATCGA GGAGATCAAAACCCAGAAGGTCCGCATCGAAGGCTCCTGT GGTGGACCTACACAAGCAGCATCTTCTCCGGGTCATCTTCG AAGCCGCCTTCATGTACGTCTTCTATGTCATGTACGACGGCT	420
c.71G>A (p.W24X) rs104894396	[G/A]	TTGTGTAAGAGTTGGTGTTTGCTCAGGAAGAGATTTAAGCAT GCTTGCTTACCCAGACTCAGAGAAGAGTCTCCCTGTTCTGTCCT AGCTAGTGATTCCTGTGTTGTGT	404
c.439G>A (p.E147K)	[G/A]	TTCGTGTCCACGCCAGCGCTCCTAGTGGCCATGCACGTGGC CTACCGGAGACATGAGAAGAAGAAGAAGAAGTTCATCAAGGGGG AGATAAAGAGTGAATTTAAGGACATCGAGGAGATCAAAACCC AGAAGGTCCGCATCGAAGGCTCCCTGTGGTGGACCTACACA AGCAGCATCTTCTTCCGGGTCATCTTC[G/A]AAGCCGCCTTCA TGTACGTCTTCTATGTCATGTACGACGGCTTCTCCATGCAGC GGCTGGTGAAGTGCAACGCCTGGCCTTGTCCCAACACTGTG GACTGCTTTGTGTCCCGGCCCACGGAGAAGACTGTCTTCACA GTGTTCATGATTGCAGTGTCTGGAATTTGC	360
c.617A>G (p.N206S)	[A/G]	CCGCCTTCATGTACGTCTTCTATGTCATGTACGACGGCTTCT CCATGCAGCGGCTGGTGAAGTGCAACGCCTGGCCTTGTCCC AACACTGTGGACTGCTTTGTGTCCCGGCCCACGGAGAAGAC TGTCTTCACAGTGTTCATGATTGCAGTGTCTGGAATTTGCATC CTGCTGA[A/G]TGTCATGAATTGCAGTGTTTATTTGCTAATTAGATA TTGTTCTGGGAAGTCAAAAAAGCCAGTTTAACGCATTGCCCA GTTGTTAGATTAAGAAATAGACAGCATGAGAGGGATGAGGCA ACCCGTGCTCAGCTGTCAAGGCTCAGTCGCTAGCATTTCCCA ACACAAAGATTCTGACCTTAAATGCAACCATTTGAAACCCCTG TAGGCCTCAGGTGAAACTCCAGATGCCACAATGGAGCTCTGC TC	421
с.385G>A (р.Е129К)	[G/A]	GAACGTGTGCTACGATCACTACTTCCCCATCTCCCACATCCG GCTATGGGCCCTGCAGCTGATCTTCGTGTCCACGCCAGCGC TCCTAGTGGCCATGCACGTGGCCTACCGGAGACATGAGAAG AAGAGGAAGTTCATCAAGGGGGGAGATAAAGAGTGAATTTAAG GACATCGAGGAGATCAAAACCCAGAAGGTCCGCATC[G/A]AA GGCTCCCTGTGGTGGACCTACACAAGCAGCATCTTCTTCCGG GTCATCTTCGAAGCCGCCTTCATGTACGTCTTCTATGTCATGT ACGACGGCTTCTCCATGCAGGGCTGGTGAAGTGCAACGCC TGGCCTTGTCCCAACACTGTGGACTGCTTTGTGTCCCGGCCC ACGGAGAAGACTGTCTTCACAGTGTTCATGATTGCAGTGTC GGAATTTGCATCCTGCTGAATGTCAC	441
c.109G>A (p.V37I) rs72474224	[G/A]	ATTTAAGCATGCTTGCTTACCCAGACTCAGAGAAGTCTCCCT GTTCTGTCCTAGCTAGTGATTCCTGTGTTGTGT	360
c.79G>A (p.V27I)	[G/A]	TAAGAGTTGGTGTTTGCTCAGGAAGAGATTTAAGCATGCTTG CTTACCCAGACTCAGAGAAGATCTCCCTGTTCTGTCCTAGCTA GTGATTCCTGTGTTGTGT	441

		CCATGCACGTGGCCTACCGGAGACAT	
c.269T>C (p.L90P) rs80338945	[T/C]	GTGTGGGGGAGATGAGCAGGCCGACTTTGTCTGCAACACCCT GCAGCCAGGCTGCAAGAACGTGTGCTACGATCACTACTTCCC CATCTCCCACATCCGGCTATGGGCCCTGCAGCTGATCTTCGT GTCCACGCCAGCGCTCC[T/C]AGTGGCCATGCACGTGGCCTA CCGGAGACATGAGAAGAAGAAGAGGAAGTTCATCAAGGGGGAGA TAAAGAGTGAATTTAAGGACATCGAGGAGATCAAAACCCAGA AGGTCCGCATCGAAGGCTCCCTGTGGTGGACCTACACAAGC AGCATCTTCTTC	300
c.550C>G (p.R184W)	[C/G]	AAGTTCATCAAGGGGGGGGAGATAAAGAGTGAATTTAAGGACATC GAGGAGATCAAAACCCAGAAGGTCCGCATCGAAGGCTCCCT GTGGTGGACCTACACAAGCAGCATCTTCTTCGGGTCATCTT CGAAGCCGCCTTCATGTACGTCTTCTATGTCATGTACGACGG CTTCTCCATGCAGCGGCTGGTGAAGTGCAACGCCTGGCCTT GTCCCAACACTGTGGACTGCTTTGTGTCC[C/G]GGCCCACGG AGAAGACTGTCTTCACAGTGTTCATGATTGCAGTGTCTGGAA TTTGCATCCTGCTGAATGTCACTGAATTGCAGTGTCTTGGAA TTTGCATCTGCTGGAATGTCACTGAATTGTGTTATTTGCTAAT TAGATATTGTTCTGGGAAGTCAAAAAAGCCAGTTTAACGCATT GCCCAGTTGTTAGATTAAGAAATAGACAGCATGAGAGGGATG AGGCAACCCGTGCTCAGCTGTCAA	441
c.551G>C (p.R184P)	[G/C]	AAGTTCATCAAGGGGGGAGATAAAGAGTGAATTTAAGGACATC GAGGAGATCAAAACCCAGAAGGTCCGCATCGAAGGCTCCCT GTGGTGGACCTACACAAGCAGCATCTTCTTCCGGGTCATCTT CGAAGCCGCCTTCATGTACGTCTTCTATGTCATGTACGACGG CTTCTCCATGCAGCGGCTGGTGAAGTGCAACGCCTGGCCTT GTCCCAACACTGTGGACTGCTTTGTGTCCC[G/C]GCCCACGG AGAAGACTGTCTTCACAGTGTTCATGATTGCAGTGTCTGGAA TTTGCATCCTGCTGAATGTCACTGAATTGTGTTATTTGCTAAT TAGATATTGTTCTGGGAAGTCAAAAAAGCCAGTTTAACGCATT GCCCAGTTGTTAGATTAAGAAATAGACAGCATGAGAGGGATG AGGCAACCCGTGCTCAGCTGTCAA	441
c.516G>A (p.W172X)	[G/A]	GTCCACGCCAGCGCTCCTAGTGGCCATGCACGTGGCCTACC GGAGACATGAGAAGAAGAAGAGGAAGTTCATCAAGGGGGAGATA AAGAGTGAATTTAAGGACATCGAGGAGATCAAAACCCAGAAG GTCCGCATCGAAGGCTCCCTGTGGTGGACCTACACAAGCAG CATCTTCTTCCGGGTCATCTTCGAAGCCGCCTTCATGTACGT CTTCTATGTCATGTACGACGGCTTCTCCATGCAGCGGCTGGT GAAGTGCAACGCCTG[G/A]CCTTGTCCCAACACTGTGGACTG CTTTGTGTCCCGGCCCACGGAGAAGACTGTCTTCACAGTGTT CATGATTGCAGTGTCTGGAATTTGCATCCTGCTGAATGTCACT GAATTGTGTTATTTGCTAATTAGATATTGTTCTGGGAAGTCAA AAAAGCCAGTTTAACGCATTGCC	439
c.224G>A (p.R75Q) rs28931593	[G/A]	ATCTGGCTCACCGTCCTCTTCATTTTTCGCATTATGATCCTCG TTGTGGCTGCAAAAGGAGGTGTGGGGAGAATGAGCAGGCCGAC TTTGTCTGCAACACCCTGCAGCCAGGCTGCAAGAACGTGTGC TACGATCACTACTTCCCCATCTCCCACATCC[G/A]GCTATGGG CCCTGCAGCTGATCTTCGTGTCCACGCCAGCGCTCCTAGTG GCCATGCACGTGGCCTACCGGAGACATGAGAAGAAGAAGAAGAA GTTCATCAAGGGGGGAGATAAAGAGTGAATTTAAGGACATCGA GGAGATCAAA	300
c.101T>C (p.M34T) rs35887622	[T/C]	ATTCCTGTGTTGTGTGCATTCGTCTTTTCCAGAGCAAACCGC CCAGAGTAGAAGATGGATTGGGGCACGCTGCAGACGATCCT GGGGGGTGTGAACAAACACTCCACCAGCATTGGAAAGATCT GGCTCACCGTCCTCTTCATTTTCGCATTA[T/C]GATCCTCGTT GTGGCTGCAAAGGAGGTGTGGGGAGAGATGAGCAGGCCGACTT TGTCTGCAACACCCTGCAGCCAGGCTGCAAGAACGTGTGCT ACGATCACTACTTCCCCATCTCCCACATCCGGCTATGGGCCC TGCAGCTGATCTTCGTGTCCACGCCAGCGCTCCTAGTGGCC ATGCACGTGGCCTACCGGAGACATGAGAAG	360
c.457G>A (p.V153I)	[G/A]	CGTGTGCTACGATCACTACTTCCCCATCTCCCACATCCGGCT ATGGGCCCTGCAGCTGATCTTCGTGTCCACGCCAGCGCTCC TAGTGGCCATGCACGTGGCCTACCGGAGACATGAGAAGAAG AGGAAGTTCATCAAGGGGGGAGATAAAGAGTGAATTTAAGGAC ATCGAGGAGATCAAAACCCAGAAGGTCCGCATCGAAGGCTC CCTGTGGTGGACCTACACAAGCAGCATCTTCTTCCGGGTCAT CTTCGAAGCCGCCTTCATGTAC[G/A]TCTTCTATGTCATGTAC GACGGCTTCTCCATGCAGCGGCTGGTGAAGTGCAACGCCTG GCCTTGTCCCAACACTGTGGACTGCTTTGTGTCCCGGCCCAC GGAGAAGACTGTCTTCACAGTGTTCATGATTGCAGTGTCTGG AATTTGCATCCTGCTGAATGTCACTGA	441
c.503A>G (p.K168R)	[A/G]	TCGTGTCCACGCCAGCGCTCCTAGTGGCCATGCACGTGGCC TACCGGAGACATGAGAAGAAGAGGGAAGTTCATCAAGGGGGA GATAAAGAGTGAATTTAAGGACATCGAGGAGATCAAAACCCA	439

			GAAGGTCCGCATCGAAGGCTCCCTGTGGTGGACCTACACAA GCAGCATCTTCTTCCGGGTCATCTTCGAAGCCGCCTTCATGT	
			ACGTCTTCTATGTCATGTACGACGGCTTCTCCATGCAGCGGC TGGTGA[A/G]GTGCAACGCCTGGCCTTGTCCCAACACTGTGG	
			ACTGCTTTGTGTCCCGGCCCACGGAGAAGACTGTCTTCACAG	
			CACTGAATTGTGTTATTTGCTAATTAGATATTGTTCTGGGAAG TCAAAAAAGCCAGTTTAACGCAT	
OTOF	c.2485C>T (p.Q829X) rs80356593	[C/T]	TCGCCCTACCCCAGCCGCTTCCTCTCCCTCGCTGACAAGG ACCAGGGCCACTCATCCCGCACCAGGCTTGACCGGGAGCGC CTCAAGTCCTGCATGAGGGGAGCTGGTGAGGACGCAACTGGA CGGCGGGGGCTGGAGGGAGGGCCTGGTTGTGAGAAGGTGT CACAACCCCCTTTGTCATGGCCCGAGCTGTCCCCCAGGTGAG GGGTTCACTGACACCCCCTCCTTCGCAGGAAAACATGGGGC AGCAGGCCAGGATGCTGCGGGCCCAGGTGAAGCGGCACAC GGTGCGGGACAAGCTGAGGCTGTGC[C/T]AGAACTTCCTGCA GAAGCTGCGCTTCCTGGCGGACGAGGTGCGCCCAAGGGG TCGGGGCTTTGCCTCATCCAGGGCTGGCCCCAAGGGG TCGGGGCTTGCCCCAACGGGCTGGCCCCAAGGGG TCGGGGCTTGCCCACCGGGCCCCAGGCCCCCTTAC	626
			GCATTCCCGACATCTTCATCTGGATGATGAGCAACAACAAGC GTGTCGCCTATGCCCGTGTGCCCTCCAAGGACCTGCTCTTCT CCATCGTGGAGGAGGAGGACTGGCAAGGACTGCGCCAAGGTC AAGACGCTCTTCC	
niR96	c.13G>A	[G/A]	CTTACCCACTTCTGCCTTGAGTGCTCCTAGACGTCGGAAACA GGCTGCTTCCAAGGGTGCAGGGATGCAAGGCCCCTCGTCCA GTGTGTCCCCAGAGAGCCCGCACCAGTGCCATCTGCTTGGC CGATTTTG[G/A]CACTAGCACATTTTTGCTTGTGTCTCTCCGC TCTGAGCAATCATGTGCAGTGCCAATATGGGAAAAGCAGGAC CCGCAGCTGCGTCCGCCTCCCCTGCATCCTTGTGTCAGGGC CCCAGCCTGCTCCTCCTCAAGGCCTCCTCACCGC	281
	c.14C>A	[C/A]	CTTACCCACTTCTGCCTTGAGTGCTCCTAGACGTCCGAAACA GCCTGCTTCCAAGGGTGCAGGGATGCAAGGCCCCTCGTCCA GTGTGTCCCCAGAGAGCCCGCACCAGTGCCATCTGCTTGGC CGATTTTGG[C/A]ACTAGCACATTTTTGCTTGTGTCTCCGC TCTGAGCAATCATGTGCAGTGCCAATATGGGAAAAGCAGGAC CCGCAGCTGCGTCCGCCTCCCTGCATCCTTGTGTCAGGGC CCCAGCCTGCTCCTCCAAGGCCTCCTCACCGC	281
TMC1	c.1939T>C (p.S647P) rs138527651	[T/C]	GATGGGCTCCTTCTTTGCTCCCAGCCTCCCAGGCATCAATAT CCTTCGACTCCATACATCCATGTACTTCCAGTGCTGGGCCGT TATGTGCTGCAATGTTCCTGAGGCCAGGGTCTTCAAAGCTTC CAGATCAAATAACTTCTACCTGGGCATGCTACTGCTCATCCTC TTCCTG[T/C]CCACAATGCCTGTCTTGTACATGATCGTGTCCC TCCCACCATCTTTTGATTGTGGTCCATTCAGGTCTCTTGCTTT TGAAATTTGACTCAGGCATCGTGTTCTTTCGGGGGGTGGAGGT GGGAATGGTCATTCA	309
GJB6	c.6013G>T rs11843171	[G/T]	GCTTCCGAGAAACTTGTGAAATGCTGATGACAATAGCGTGGA CGACAGTAATTAAAAGTAATTGGCGACACATCTTAGTTAAAAC GTGCAGGCACCAGAAGGCACTTCCTGTCGGTGAAGAAGACC TGTCTCCGGTGTCACGGGCATCCTGTGTTTTGCAAACGGGG CTGACCTCCCTTCCTGGGGAGCAGGAAGGGTCA[G/T]GGTGA GTGTGGCCTGCCCGCAGCTCTGCACTCCCGGAGGGGTTAGG GACCTGCAACCAGGCGGGGACACTGGCCCAGCGACCTCAGT GTCCCCTGGGTGGGGCGTGCACTCTGTTTAGTGTCTGATTGAA CGTAACCGTGCCGGGTTGTTCTTTTCCCTCAAGTAGACTTTAT GCCATACAGCTATTTTCTTGCCCCAGTT	401
CRYL1	c.1622T>C rs144457142	[T/C]	CTTCCAGAATTCTGCACTGCCAAATTAACACTTAGGTTAAATG AGATGACACCCCTTCTTTTATAAACAGAGTACCCATCCGTTAA TTTCAGATGCTAATGTCAGAAAAGTTGGTATGTTTGAGTCTTT TACCCTTCAAAACCATTTTGGGGGGAAATTTTAACACACTGAGA GAGAAGAAC[T/C]ATTTGAAGCAAATAAATTGCAACCCAATGA TTTTAGGCTTTCAAATCAGCATAGGTCAATCAAAACTAAACCC CAAAGATGATGTTTGTTTATTTTTGCTTTTTGAGCGTATCTAG TACCGATGGTTCGTATTTTAACTTAATCATCCACGGTTTTTGT GGGGAGTGGGAAGCTGAGCTG	365
SLC26A4	c.445G>A (p.G149R)	[G/A]	CTTCCCACCTCAGTCTCCCAAAGTGCTGCGGTTACAGATGTG AGCCACTGGGTCCGGCTCAGCTTCTTTCGTGAACAAACAA	405

			ATTGCCAGTGCCCTGACTCTGCTGGTTGGAATTATACAGGTA	
	c.1238A>G	[A/G]	GAGTAGGCATGGGGAGTTTCATCTTAATGTACTTCCTGAAAT	406
	(p.Q413R)			
	u ,		GICAICCAGICICITCCITAGGAATICATIGCCITTGGGATCA	
	c 1826T.C		CTTCTGGCCAGTGTATTTCTTGGCAAAGTTCCACAATCATCCA	520
	(n V = 0 = 0)	[1/0]	GAAAACAAAAGTTTCCTGGCTCCTCTGTTCTCCCAGTTTTCTT	525
	(p.vouag)		CCTAGACAACATCAAAGTTTGGGCTGAGGTGAAACCCATCCT	
			TAAAAATTCATCTCCTTGATGTCTTGCTTACCAAGGAACAGTG	
			TGTAGGTCTTTTGGATAATTTGATATGAATGGTTGAAAGATTT	
			CAAATCTTTGACAATTAAGTTGACAGTGTTTTCTTCGTTTAGAA	
			TGGCATCATAAGTGATGCTG[T/G]TTCAACAAATAATGCTTTTG	
			AGCCTGATGAGGATATTGAAGATCTGGAGGAACTTGATATCC	
			CAACCAAGGAAATAGAGATTCAAGTGGATTGGAACTCTGAGC	
			TTCCAGTCAAAGTGAACGTTCCCAAAGTGCCAATCCATAGCC	
			TTGTGCTTGACTGTGGAGCTATATCTTTCCTGGACGTTGTTG	
			GAGTGAGATCACTGCGGGTGGTAAGGTTCTGGTTTTCTGAAT	
			TATACATTTGGAGCTTTGGC	
12S rRNA	m.1555A>G	[A/G]	AGTAGAGTGCTTAGTTGAACAGGGCCCTGAAGCGCGTACAC	300
(1111-61161)			ACCGCCCGTCACCCTCCTCAAGTATACTTCAAAGGACATTTA	
	m 9074. C	[A/C]		200
	111.027A>G	[A/G]		300
			AAGTTTAACTAAGCTATACTAACCCCAGGGTTGGTCAATTTCG	
			TGCCAGCCACCGCGGTCACACGATTAACCCAAGTCAATAGAA	
			GCCGGCGTAAAGAGTGTTTTAGATCACCCCCTCCCCAATAAA	
			GCTAAAACTCACCTGAGTTGTAAAAAACTCCAGTTGACACAAA	
			ATAGAC	
	m.1494C>T	[C/T]	AAAACTACGATAGCCCTTATGAAACTTAAGGGTCGAAGGTGG	300
			ATTTAGCAGTAAACTAAGAGTAGAGTGCTTAGTTGAACAGGG	
			CCCTGAAGCGCGTACACACCGCCCGTCAC[C/T]CTCCTCAAG	
			TATACTTCAAAGGACATTTAACTAAAACCCCTACGCATTTATAT	
			AGAGGAGACAAGTCGTAACATGGTAAGTGTACTGGAAAGTGC	
			ACTIGGACGAACCAGAGIGIAGCIIAACACAAAGCACCCAAC	
MT TO1				000
IVI I - 1 3 1 [+DNI 4	m./445A>G	[A/G]		260
LIUNA Sor				
			CTATATATCTTAATGGCACATGCAGCGCAAGTAGGTCTACAA	
			GACGCTACTTCCCCTATCATAGAAGAGCTTATCACCTTTCATG	
			ATCACGCCCTCATAATCATTTT	

As 32 sequências foram inseridas no *software Custom TaqMan[®] Genomic Assays* - *File Builder Version 3.1* (Applied BioSystems), no qual foi gerado um arquivo na extensão '.txt' contendo todos os dados dos ensaios. Posteriormente, este arquivo foi enviado para a Applied BioSystems via e-mail com as demais descrições do ensaio para a customização das placas de *OpenArray*[™].

Após a verificação, feita pela empresa, das sequências e a validação das mesmas para a realização dos ensaios, foram elaborados os ensaios contendo um par de *primers* em comum e duas sondas, uma contendo a sequência normal, sendo marcada com o fluoróforo *VIC*[®] e outra contendo a sequência mutante, juntamente com o fluoróforo *FAM*[®] (Tabela 11). Estas informações foram entregues pela empresa em um *CD* (*Compact Disc*), contendo a informação de cada uma das 10 placas customizadas. Os 10 arquivos (HKM74 ao HKM84) eram da extensão .*spf* (*SNP Plate File*). Outros 2 arquivos, contendo as informações gerais dos ensaios, como sequência dos primers, das sondas, etc., também estavam presente no *CD*, sendo um deles em .*pdf* (*Portable Document Format*) e outro na extensão .*txt* (*Text File*).

3.2.3.2. Verificação de Concentração e Pureza das Amostras e Diluição

A reprodutibilidade, acurácia e precisão da técnica *TaqMan[®] OpenArray*[™] está intimamente relacionada à integridade das amostras (verificada em gel de agarose), à concentração correta e a pureza das amostras. Para isso, utilizou-se o *NanoDrop[®] 8000* (Thermo Scientific) para verificação de pureza e o *Qubit[®] 2.0 Fluorometer* para obter a concentração das amostras.

Tanto a visualização da pureza quanto a quantificação foram feitas em triplicata, utilizando a média dos três resultados como o valor a ser considerado para os cálculos nas diluições. Todos os valores foram tabulados em uma planilha criada no *software Microsoft*[®] *Office Excel*[®] e tiveram as valores médios obtidas através das fórmulas de cálculos de médias. Toda esta precisão foi necessária pois, para a realização do experimento, eram necessárias 250 cópias haplóides do DNA do indivíduo, e isto só é obtido caso as amostras apresentem as características citadas acima relacionadas a integridade, pureza e concentração.

Ensaio	Posição no SubArray	Nome do <i>Primer</i> F	Sequência do <i>Primer</i> F	Nome do <i>Primer</i> R	Sequência do <i>Primer</i> R	Sequência sonda <i>VIC®</i>	Sequência sonda FAM®
p.V95M	A01	V95M_F	CGCCAGCGCTCCTAGTG	V95M_R	CCCTTGATGAACTTCCTCTTCTTCT	CATGCACGTGGCCTA	CCATGCACATGGCCTA
p.L90P	A02	L90P_F	CCCTGCAGCTGATCTTCGT	L90P_R	CGGTAGGCCACGTGCAT	AGCGCTCCTAGTGGCC	CGCTCCCAGTGGCC
p.Q829X	A03	Q829X_F	CGGTGCGGGACAAGCT	Q829X_R	CCTCGTCCGCCAGGAA	AGGAAGTTCTGGCACAGC	AGGAAGTTCTAGCACAGC
p.Q413R	A04	Q413R_F	TGGCCACCACTGCTCTTTC	Q413R_R	GTTGTTCCTACCTGTGTCTTTCCT	CAGTGCTCTCCTGGACGG	AGTGCTCTCCCGGACGG
p.S113R	B01	S113R_F	GGAGACATGAGAAGAAGAGGAAGTT	S113R_R	CGGACCTTCTGGGTTTTGATCTC	ATGTCCTTAAATTCACTCTTT	ATGTCCTTAAATTCCCTCTTT
p.R184W	B02	R184W_F	GGCCTTGTCCCAACACTGT	R184W_R	ACTGCAATCATGAACACTGTGAAGA	CTTTGTGTCCCGGCCCA	TTTGTGTCCGGGCCCA
miR96-13	B03	MiR96-13_F	CGCACCAGTGCCATCTG	MiR96-13_R	AGCGGAGAGACACAAGCAAAA	CCGATTTTGGCACTAGC	CCGATTTTGACACTAGC
p.V609G	B04	V609G_F	GTGTTTTCTTCGTTTAGAATGGCATCA	V609G_R	TCCTCATCAGGCTCAAAAGCATT	AAGTGATGCTGTTTCAACA	TGATGCTGGTTCAACA
p.M93I	C01	M93I_F	CCCTGCAGCTGATCTTCGT	M93I_R	CCCTTGATGAACTTCCTCTTCTTCT	TAGTGGCCATGCACGTG	CTAGTGGCCATACACGTG
p.R184P	C02	R184P_F	GGCCTTGTCCCAACACTGT	R184P_R	ACTGCAATCATGAACACTGTGAAGA	TTGTGTCCCGGCCCAC	TTGTGTCCCCGCCCAC
miR96-14	C03	MiR96-14_F	CGCACCAGTGCCATCTG	MiR96-14_R	AGCGGAGAGACACAAGCAAAA	TGTGCTAGTGCCAAAAT	ATGTGCTAGTTCCAAAAT
c.35delG	C04	35delG_F	GCCCAGAGTAGAAGATGGATTGG	35delG_R	TGAGCCAGATCTTTCCAATGCT	TGTTTGTTCACACCCCCCA	TGTTTGTTCACACCCCCA
p.W24X	D01	W24X_F	CACGCTGCAGACGATCCT	W24X_R	CACAACGAGGATCATAATGCGAAAA	TTGGAAAGATCTGGCTCAC	TTGGAAAGATCTAGCTCAC
p.W172X	D02	W172X_F	CAGCGGCTGGTGAAGTG	W172X_R	CACAAAGCAGTCCACAGTGTTG	AACGCCTGGCCTTGT	AACGCCTGACCTTGT
m.1555A>G	D03	A1555G_F	GACATTTAACTAAAACCCCTACGCATT	A1555G_R	GTCCAAGTGCACTTTCCAGTACA	ATGTTACGACTTGTCTCCTC	ACGACTTGCCTCCTC
c.167delT	D04	167delT_F	GAGCAGGCCGACTTTGTCT	167delT_R	TCGTAGCACACGTTCTTGCA	AACACCCTGCAGCCAG	ACACCCGCAGCCAG
p.E147K	E01	E147K_F	ACCTACACAAGCAGCATCTTCTTC	E147K_R	GAAGCCGTCGTACATGACATAGA	TCATCTTCGAAGCCGC	TCATCTTCAAAGCCGC
p.R75Q	E02	R75Q_F	CTACGATCACTACTTCCCCATCTC	R75Q_R	GGCGTGGACACGAAGATCA	CCACATCCGGCTATG	CCACATCCAGCTATG
c.235delC	E04	235delC_F	ACTACTTCCCCATCTCCCACATC	235delC_R	CTGGCGTGGACACGAAGA	AGCTGCAGGGCCCA	CAGCTGCAGGCCCA
p.N206S	F01	N206S_F	TGTTCATGATTGCAGTGTCTGGAA	N206S_R	TTTTGACTTCCCAGAACAATATCTAATTAGCA	TCCTGCTGAATGTCAC	TCCTGCTGAGTGTCAC
p.M34T	F02	M34T_F	GGCTCACCGTCCTCTTCATTTT	M34T_R	CCCCACACCTCCTTTGCA	ACGAGGATCATAATGC	ACGAGGATCGTAATGC
m.1494C>T	F03	C1494T_F	CCCTGAAGCGCGTACACA	C1494T_R	ACCATGTTACGACTTGTCTCCTCTATAT	ACTTGAGGAGGGTGACG	ACTTGAGGAGAGTGACG
c.1393T>C	F04	T1393C_F	CTTCTACCTGGGCATGCTACTG	T1393C_R	GGGACACGATCATGTACAAGACA	TCCTCTTCCTGTCCACAAT	CTCTTCCTGCCCACAAT
p.E129K	G01	E129K_F	GAGGAGATCAAAACCCAGAAGGT	E129K_R	AAGAAGATGCTGCTTGTGTAGGT	CGCATCGAAGGCT	CGCATCAAAGGCT
p.V153I	G02	V153I_F	CTTCTTCCGGGTCATCTTCGAA	V153I_R	GAGAAGCCGTCGTACATGACAT	CCTTCATGTACGTCTTCT	CTTCATGTACATCTTCT
m.7445A>G	G03	A7445G_F	CACACATTCGAAGAACCCGTATACA	A7445G_R	TTGGCTTGAAACCAGCTTTGG	CTTCCTTTTTTGTCTAGATTT	CCTTTTTTGCCTAGATTT
rs11843171	G04	rs11843171_F	GGGCTGACCTCCCTTCCT	rs11843171_R	CCGGGAGTGCAGAGCTG	CACACTCACCCTGACCC	CACTCACCATGACCC
p.V37I	H01	V37I_F	GGCTCACCGTCCTCTTCATTTT	V37I_R	CCCCACACCTCCTTTGCA	ATTATGATCCTCGTTGTGGC	ATTATGATCCTCATTGTGGC
p.K168R	H02	K168R_F	CGACGGCTTCTCCATGCA	K168R_R	CACAAAGCAGTCCACAGTGTTG	CGTTGCACTTCACC	CGTTGCACCTCACC
p.G149R	H03	G149R_F	CAGGACCTTTTCCAGTGGTGAG	G149R_R	GCTGCTGGATACGAGAAAGTGTT	TTTAATGGTGGGATCTGT	TTTAATGGTGAGATCTGT
rs144457142	H04	144457142_F	TTGGTATGTTTGAGTCTTTTACCCTTCA	144457142_R	GAAAGCCTAAAATCATTGGGTTGCA	TTGCTTCAAATAGTTCTTC	CTTCAAATGGTTCTTC

Tabela 11. Detalhes da sequência, primers e sondas presentes nas placas de genotipagem de OpenArray™.

3.2.3.2.1. Verificação da pureza através do Nanodrop[®] 8000

Para início, foi feito a limpeza dos *slots* do *Nanodrop[®] 8000* (Figura 17) com 2µL de água ultrapura e a leitura do branco no equipamento utilizando 2µL de TE 1X por *slot*. A releitura do branco foi refeita sempre que solicitado pelo *software*. Em seguida, os tubos contendo as amostras foram agitados por um vórtex para homogeneizar o conteúdo. Utilizou-se um total de 6µL de cada amostra para a verificação da pureza, sendo este valor dividido em 3 alíquotas de 2µL (triplicata). Para uma ótima pureza, os valores da razão A_{260/280} deveriam estar entre 1,8 e 2,0, podendo se considerar amostras com valor de 1,7. Após a leitura e o cálculo da média dos valores, notou-se que mais de 97% das amostras apresentaram valores entre 1,7 e 2,0, não necessitando de mais uma etapa de purificação. Já as amostras que apresentaram valores inferiores a 1,7 foram utilizadas nas mesmas condições para verificar a capacidade da plataforma *TaqMan[®] OpenArray*[™] *Genotyping* de realizar as reações com tais níveis.



Figura 17. *Nanodrop® 8000*, utilizado para a análise das purezas das amostras (Retirado do site: <www.nanodrop.com/Productnd8000overview.aspx?AspxAutoDetectCookieSupport=1>).

3.2.3.2.2. Verificação da concentração através do Qubit[®] 2.0 Fluoremeter

Todas amostras foram homogeneizadas utilizando um vórtex e 1µL de cada foi transferida, em triplicata, para tubos de 0,5µL da Axygen[®] PCR-05-C (VWR, part no. 10011-830). Em seguida, foi adicionado 199µL de *Working Solution* do *Qubit[®] Assay Kit dsDNA Broad Range Assay* (Invitrogen). Esta solução (*Working Solution*) é composta de uma diluição de 1:200 do reagente *Qubit[®]* no tampão *Qubit[®]*, ambos presentes no *kit*. Além das

amostras, foram feitos 2 controles padrões. Para isso, dois novos tubos de 0,5µL da Axygen[®] PCR-05-C foram separados e identificados, um para o Padrão 1 (menor concentração detectada pelo *kit*) e outro para o Padrão 2 (maior concentração detectável pelo *kit*). Em cada tubo, foi adicionado 190µL de *Working Solution*, mais 10µL do reagente Padrão 1 para um tubo e 10µL do reagente Padrão 2 para outro tubo. Após o preparo dos padrões e das amostras, todos tubos apresentavam 200µL de volume final.

Em seguida, todos os tubos foram homogeneizados e incubados por 2 minutos à temperatura ambiente e protegidos da luz natural e/ou artificial. Para a quantificação das amostras, foram primeiramente mensurados os valores dos padrões e em seguida foi realizada a leitura, uma de cada vez, de todas as amostras em triplicatas. Os valores, já calculados pelo próprio *Qubit[®] 2.0 Fluoremeter* (Figura 18), foram dados na concentração de *ng/µL*.



Figura 18. *Qubit[®] 2.0 Fluoremeter*, utilizado para a análise da concentração das amostras (Retirado do site: <www.invitrogen.com/site/us/en/home/brands/Product-Brand/Qubit/qubit/qubitfluorometer.html>).

3.2.3.3. Diluições das amostras

Todas amostras apresentaram valores de concentração superior a 50ng/ μ L, sendo necessário a realização de simples diluições. O volume final das diluições foi de 20 μ L. Para cálculos, foi utilizada a fórmula de simples diluições C₁.V₁=C₂.V₂, onde C₁ e V₁ são as concentrações e volumes iniciais, respectivamente. As variáveis C₂ e V₂ refere-se às concentrações e volumes finais, que obedeceram os valores de 50ng/ μ L e 20 μ L, respectivamente.

Após os cálculos, o volume inicial (V₁) calculado foi transferido para tubos de 0,2 μ L da empresa Axygen[®] PCR-02-C, sendo completado até o volume final de 20 μ L com TE 1X. Sendo assim, todas amostras foram uniformemente quantificadas e diluídas a 50ng/ μ L.

3.2.3.4. Realização dos experimentos utilizando o a plataforma TaqMan[®] OpenArray™ Genotyping

3.2.3.4.1. Preparo de amostras

Em uma placa de 384 poços, foram misturados, manualmente, 2µL da amostra devidamente quantificados e diluídos e 2µL do *TaqMan[®] OpenArray™ Master Mix* em cada poço previamente identificado de acordo com o estipulado pela empresa (Figura 19). Em seguida, a placa foi selada com o adesivo de selagem da Thermo Scientific[®] para evitar evaporação da mistura Amostra/*Master Mix*.



Figura 19. **Esquema de distribuição das amostras na placa de 384 poços.** O quadrante 1 (cor azul) referese às primeiras 48 amostras que serão distribuídas na placa de *OpenArray*[™] (*Load* 1). O quadrante de número 2 (cor laranja) refere-se ao *Load* 2, distribuindo as 46 amostras restantes na metade inferior dos *subarrays*.

3.2.3.4.2. Pipetagem e distribuição das amostras nas placas de OpenArray™

Foi utilizado um robô pipetador, o *OpenArray*[™] *AccuFill*[®] *System* (Applied Biosistems), para a distribuição das amostras contidas na placa de 384 poços nas placas de *OpenArray*[™]. No interior do *OpenArray*[™] *AccuFill*[®] (Imagem 20) foi inserida a caixa de ponteiras específicas e a placa de 384 poços já contendo a mistura do *Master Mix* e das amostras. Em seguida, foi adicionada um placa de *OpenArray*[™] para ser carregada com o material contido na placa de 384 poços. Todas as operações realizadas neste equipamento pipetador foram coordenadas utilizando o *software OpenArray*[™] *AccuFill*[®], presente em um computador interligado ao aparelho.



Figura 20. *OpenArray*[™] *AccuFill*® *System*. (a) Imagem do equipamento com a tampa frontal aberta. (b) Imagem do interior do *OpenArray*[™] *AccuFill*® *System*. 1: Descarte de ponteiras; 2: Ponteiras específicas para o equipamento; 3: Placa de 384 poços contendo as amostras com o *Master Mix*; 4: *Plate Holder*, local onde são inseridas as placas de *OpenArray*[™] para serem carregadas automaticamente (Modificado de: Applied BioSystems, 2012).

3.2.3.4.3. Inserção da placa de OpenArray[™] na case

Enquanto a placa de *OpenArray*^M estava sendo carregada com as amostras, a *case* de vidro, usada para envolver a placa de *OpenArray*^M, foi preparada. Para isso, adicionou-se

o líquido de imersão o suficiente para cobrir a placa de *OpenArray*[™] quando inserida na *case*, estabilizando as reações na placa e criando o ambiente ideal para a reação de amplificação, ligação e clivagem das sondas. A inserção da placa na *case* levou no máximo 2 minutos, pois tempo superior a este poderia acarretar em problemas de evaporação das amostras, contaminação, etc. Após a inserção da placa na *case* (Figura 21) contendo o líquido de imersão, realizou-se a etapa de selagem da *case*.



Figura 21. Ilustração da inserção da placa de OpenArray™ na case de vidro preenchida com líquido de imersão.

3.2.3.4.4. Selagem das cases

Após o posicionamento da placa de *OpenArray*[™] dentro da *case*, adicionou-se a goma fotossensível na extremidade da mesma iniciando pelas duas extremidades e depois pelo meio da case, evitando o aparecimento de bolhas (Figura 22). Este *slide* (Placa de *OpenArray*[™] devidamente selada na case de vidro) preparado foi levado para a estação de selagem, onde a goma foi exposta por 2 minutos sobre ação de luz Ultra-Violeta, solidificando-a. Após esta etapa, a placa estava pronta para a ciclagem no termociclador e posterior visualização dos resultados.



Figura 22. Esquematização da adição da goma fotossensível para fechar a case de vidro com a placa de *OpenArray*™ já posicionada no seu interior.

3.2.3.4.5. Termociclagem

Os *slides* foram posicionadas no local demarcado no termociclador, realizando a termociclagem destes na máquina *Dual Flat Block GeneAmp[®] PCR System 9700* da *Applied BioSystems* (Figura 23).



Figura 23. (a) Foto do termociclador *Dual Flat Block GeneAmp[®] PCR System 9700* da Applied BioSystems. (b) Interior do termociclador utilizado.

A termociclagem dos slides compreendia 50 ciclos a 95°C por 45 segundos para a desnaturação do DNA, seguido da temperatura de 94°C por 13 segundos para o anelamento dos *primers* e das sondas. Por último houve a queda da temperatura para 53°C por 2 minutos e 14 segundos, ocorrendo a extensão das novas fitas e a hidrólise das sondas *TaqMan*[®]. O tempo total foi de quatro horas, dez minutos e quarenta e seis segundos (Figura 24).



Figura 24. Termociclagem utilizada nas placas de *OpenArray*[™] com máquina *Dual Flat Block GeneAmp*[®] *PCR System 9700* da Applied BioSystems.

3.2.3.4.6. Captura das fluorescências e Análise dos resultados

Para obtenção dos resultados, utilizou-se o *OpenArray*[™] *NT Cycler* (*Biotrove, Inc.*). Este equipamento é responsável pela captura da fluorescência das sondas hidrolisadas. O aparato é coordenado por um computador interligado, utilizando o *software OpenArray*[™] *SNP Genotyping Analisys* (Applied BioSystems) – Figura 25. Um conjunto de câmeras *CCD* (*Charge-coupled Device*) posicionadas no interior do *Cycler* capturaram, em apenas 15 minutos, a fluorescência emitida nos ensaios e estas foram transformada em números de acordo com seu comprimento de onda, que varia de acordo com o *repórter* detectado (*VIC*[®] ou *FAM*[®]) e sua intensidade. No *software*, estes números passam por algoritmos não revelados pela empresa e são convertidos em novos valores e em *clusters*, separando os

indivíduos em 3 *clusters* diferentes, os homozigotos normais, os heterozigotos e os homozigotos mutantes. Os indivíduos homozigotos normais são representados pelo *cluster* de cor vermelho, indicando que ambos alelos do indivíduo tiveram a sonda contendo o reporter $VIC^{@}$ pareada e hidrolisada. O *cluster* de cor verde representa os indivíduos heterozigotos, que apresentaram um alelo normal e outro com a sequência mutante, tendo as sondas $VIC^{@}$ e $FAM^{@}$, respectivamente, aneladas e hidrolisadas. Já o último *cluster*, de cor azul, apresenta os indivíduos com ambos alelos mutantes, contendo apenas a hidrólise da sonda $FAM^{@}$ no ensaio.



Figura 25. Imagem do software OpenArray[™] SNP Genotyping Analisys após a captura da fluorescência de uma placa de OpenArray[™].

Para melhor análise, os arquivos gerados *OpenArray*[™] *NT Cycler* foram salvos e importados em outro *software* com mais ferramentas e opções para análise, o *TaqMan*[®] *Genotyper*, também da Applied BioSystems (Figura 26). Este obedecia os mesmos padrões de visualização dos *clusters*, apresentando mais recursos para a análise, como a

porcentagem dos ensaios que deram certo, o excesso de algum tipo de fluorescência, várias opções de gráfico cartesiano (*Standard Diploid Genotypes*, *Rare VIC Allele*, *Rare FAM Allele*, *Extremely Rare VIC Allele* e *Extremely FAM Allele*), o desenho das placa do *layout*, etc.



Figura 26. Visão geral do *software TaqMan[®] Genotyper* utilizando o padrão *Standard Diploid Genotypes* para análise.

3.2.3.5. Validação do layout escolhido por demais técnicas pré-estabelecidas

Após a realização dos experimentos das 4 placas de *OpenArray*[™] em duplicata, todos resultados foram analisados e anotados em uma planilha desenvolvida para este trabalho utilizando o *software Microsoft[®] Office Excel[®]* (Figura 27). A planilha, com 43 colunas e 96 linhas, continha os seguintes campos para ser preenchido: ID do indivíduo, posição na placa de *OpenArray*[™], valor da quantificação (em ng/µL), valor da razão A_{260/280} para análise da pureza, dados do paciente (local de origem, numeração específica, nome, parentesco) e as alterações presentes no ensaio de genotipagem.

		Occeptification	Al (mente mare)	Oursetidada														OpenA	may Accay				
úmero	ID	Quantificação	Aliquota para	do TE 1V	AL	Local	Número	Situação	Nome	2EdalG	167.dolT	226.delC	MOENA	C1120	L4026	10249	E147V	NORE	E 120V	1/271	1 900	D10414	D1045
1	A1	354.00	unuiças em topic	84	1 190		33			South	Horder I	23JUEIL	Normal	Normal	Normal	W24XIN	Normal	N2065/N	Normal	Neumal	Morrial	Normal	Norma
2	A2	56.00	3.21	6.7	1 1 11 1		33M	Mie		Normal	filmmal	Normal	Newmal	Normal	Normal	Normal	Normal	N2065/N	Neumal	Normal	Técercal	Nerral	Norma
-	43	474.00	105	8.9	100		310	Pal		Montral	Received	Nerral	Neumal	Normal	Normal	Newsyl	Normal	Fibrary ad	Normal	Neemal	Education	Normal.	Norma
-	44	540.00	0.32	9.6	100	-	35			Normal	Normal	Normal	Neumal	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal	Norma
-	45	1900.00	0.26	9.7/	1 1 1 1		435			Normal	Page and	More al	Margan ad	Advenue of	News	River of	Aloneal	Manager	Mound	Mound	1.900/M	Filmen of	How
	46	1400.00	0.36	9.6	1 1 1 1	-	430	Pal		Normal	Farmal	Normal	Barumal	Normal	Normal	Normal	Normal	Filtertual	Normal	Normal	1.900/1	Newsol	Norm
-	47	\$0.00	1.11	0.63	1.70	-	75			Montal	Financial	Pagement.	Balance and	Mound	Newman	1/245/04	Normal	Filmental	Mountal	Alcomat	River al	Normal N	New
	40	238.00	2 10	7.9		-	710	D.V.		Riccase and	Planet of	Month of	Alcomal	Manual of	Mount of	ALC TOTAL	Aloneal	Filmen of	Mannal	Alcome al	Filmen of	Falcon of	- Name
-	40	E7.00	0.77	1.2	171	H	72			Manual	Figure	Margari	Alternal	Normal	Normal	River of	Mannal	Education	Mannal	Newsol	Repercent of	Filement of	14000
0	410	1000.00	0,11	2.0	CT I	- H	74			2544000	Figure al	Normal	Patron of	Normal	Normal	Montal	Normal	Newsal	Normal	Monmal	Normal	Normal	Non
-	A11	1000,00	0,30	9.7		-	74			3544023544W	Factorial	TWORTS IN	Number	Numer	Normal	PROFILE North A	Normal	Tworress.	Normal	Alconed	Num	Normal	Non
-	ATT	1960.00	0,20	3,74		H	00	0.1		35dellar J5della	Pacettual	recentar.	Allertiat	Received	PROFITLA	Persentage	Peocenal	Peterman	PROVIDUAL	Normal	Tworms.	Pagernial.	Picen.
6	A 16	556,50	0.04	0.4		-	00	Pa Mir		254-10-14	Facement	rearma	Pageman.	ALC: NO.	Normal	Permanan Annual	Promisi	Tworman.	Normal	Alexand	recentar	Twoman .	Horns
	DI	666,00	0,15	3.23		-	000	1044		JORN	recenter	reament	recenter	received.	PROFILIES.	NOTES	recensel	TROOTER	recenter	NOTES	recenter	recenter	TNO(The
-	02	45,00	0.20	-1,1		+		-		a survey of the	ALC: NO. OF CALL	restricted	Part Print	No.	ALC: NO.	North Market	Alignment	Prodettaat.	TROUTLAS	APR TRANK	PROFILIA.	function of	HOW
	83	1/60,00	0,28	3.74	100	-	91	147.		recentral	to relative	realityal	rectman	Alternal	TRUCTION OF	PROFILIA	rectinal	rectinue	recorrial	V arun	reama	rectmat	riom
	1 04	878,00	0,57	3.4.		-	314	mäe		THE R. HOLENER & HOLEN	Receivel17/N	realmal	recental	recentral	recontrued	PROFILIA!	rectinual	reoma	recental	PROTING.	reornal	repinal	riom
	05	330,00	1,40	0.54	2 1.01	-	34			35delGr35dell5	Peoritial	TROUTLAN	Normal	Norma	TROUTING!	Normal	PRODUCES	reomal	reormal	Normal	reormal	Peortrial.	NOT
	00	230,00	2,10	7,8.	101	-	3,02	Pa		JodefulN	Teore-al	Teormal	Normal	Normal	Peormal.	Normal	Normal	PROFFME	Peormal	Normal	reormal	Normal.	Nom
_	87	210,00	2,38	7.64	1.00	-	924	Mão		35dells/N	Tépenial	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal	Nom
	00	42,40	11,73	-1/3	1000	-	33			JodeflorN	Teornal	Teormae	Patrimal	repend	PROVINSI	Normal	reconstal	Feortoal	PROVINA	VJ/IIN	recentral	reprinal	TROPIN
	83	200,00	2,50	7.50		-				JodefulN	Peore-al	Normal	Normal	Normal	Romal	Normal	Noteval	PROTITUAL	Normal	V37MN	reormal	Pilormal.	Nom
	810	472,00	1.06	8.9	183		35			Normal	Teormal	Normal	Normal	Normal	Normal	Nomai	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal	Norm
	811	\$400.00	0,36	3.64	1.50		36			Normal	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal	Feormal	Normal	Norm
	812	188.00	2,66	7,3	1.80		98M	Mão		Normal	Normal	Normai	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal	Pépensai	Normal	Non
5	C1	11.30	44,25	-34.25	175					35delG/N	Normal	Normal	V95M/N	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal	North
5	C2	124,00	4,03	5,97	2.13			kmä		35delG/N	Normal	Normal	V95M/N	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal	Nomal	Normal	Norm
	C3	146,00	3,42	6,51	1.86		99P	Pai		Normal	Normal	Normal	VSSMIN	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal	Norm
3	C4	644.00	0,78	9.23	1.07		99M	Mão		35delG/N	Normal	Normal	Normal	Nomal	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal	Norm
3	C5	55,20	9,06	0.94	1		100	1.000		Normal	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal	Nom
)	C6	128,00	3,91	6.05	9 1.91		100M	Mão		Normal	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal	Norm
1	C7	26,40	18,94	-8,94	1.81		103		***************************************	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal	Nomial	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal	Norm
2	C8	111.00	4,50	5,50	0	PM	103	im.i		35delG/N	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal	Norm
3	C9	158,00	2,66	7,3	1.5.5		103P	Pai		Normal	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal	Nomial	Normal	Normal	Normal	Normal	Norm
1	C10		15,15	-5,1	5 183		103M	Mãe		Nostual	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal	Norm
5	C11	76,40	6,54	3.46	1.1		105			35delG/35delG	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal	Nomal	Nom
3	C12	304,00	1,64	0.3	1.02		105P	Pai	******	35delG/N	Normal	Normai	Normal	Normal	Normal	Normal	Notecal	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal	Norm
	D1	458.00	1,00	5.00	0 1.90		105M	Mão		35delG/N	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal	Norm
3	02	708,00	0,71	9.25	9 185		113			35delG/N	167delT/N	Normal	Normal	Normal	Normal	Nomal	Normal	Normal	Normal	Normal	Nomal	Normal	Norm
3	D3	342,00	1,45	8.54	1.86		115			Normal	Normal	Normai	Normal	Normal	Normal	Normal	Norecal	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal	Norm
1	D4	248,00	2,02	7,9	8 1.85		115M	Mão		Normal	Normal	Nomal	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal	Nomal	Normal	Normal	Normal	Normal	Norm
1	05	124,00	4,03	5.9	7 1.30		122			Normal	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal	Norm
2	D6	290,00	1,72	8.20	8 1.90		123			Normal	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal	Nomal	Normal	Normal	Normal	Nomal	Norm
3	D7	578,00	0,87	9,1	3 1.86		126			Normal	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal	Norms
	DS	1450,00	0.34	3.66	5 1.84		127		*****	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal	Norm
	D9	20.80	24.04	-14.04	175		129			Normal	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal		Normal	Normal	Normal	Normal	Norm
1	D10	620.00	0.81	9.1	1.85	1	133P	Pai		Normal	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal	Norma
	D11	146,00	3,42	6.50	1.94		135			Normal	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal	Nom
3	D12	1160.00	0.43	9.57	1.88		137			35delG/N	167delT/N	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal	Nom
1	AT3	290.00	1.72	8.2	1.001		137M	Mão	********	35delG/W	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal	Norm
1	A14	111.00	4.50	5.50	1.50		137P	Pai		Normal	167delT/N	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal	Nom
1	ATS	T1 10	45.05	-35.05			138			35delG/N	Normal	Normal	Normal	Nomal	Nomal	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal	Norm
2	ATS	314.00	159	84	1	-	1300	Pai		35delGIN	Thremal	Morrial	Neumal	Normal	Nermal	Neumal	Normal	Normal	Normal	Normal	Técenul	Normal	Nor
2	A17	560.00	0.85	91	1 1 8 7	-	1364	Mile		354el(18)	Patronial	Normal .	Normal	Mountail	Newman	Mound	Neemal	Filmental	Mournal	Neumal	Newman	Fahren al	How
	1			0,1		-		89			1000	Constitute -	10000000	170 100	Concernant of the local division of the loca	and the second second	100000	1 WORTH ME	1000011000	100000000	Constitute of	(and it is	

Figura 27. Visão geral da planilha criada para organização, análise e comparação dos resultados.

Para a validação do *layout* e ensaios escolhidos, foram utilizadas, de acordo com o gene a ser estudado, três técnicas moleculares diferentes previamente padronizadas: Sequenciamento Direto, *Multiplex PCR* e *RFLP-PCR* (Tabela 12).

Gene	Mutações Analisadas	Técnica utilizada para rastreamento
GJB2	p.N206S; p.E147K; p.W24X, c.167delT; c.235delC; p.V95M; p.S113R; p.M93I; p.E129K; p.V37I; p.L90P; p.R184P; p.W172X; p.R75Q; p.M34T; p. V153I; p.K168R; c.35delG; p.R184W	Sequenciamento direto
GJB6	c.6013G>T	PCR Multiplex
miR96/183	c.13G>A; c.14C>A	Sequenciamento direto
A1555G	m.1555A>G	RFLP-PCR
C1494T	m.1494C>T	RFLP-PCR
A7445G	m.7445A>G	RFLP-PCR
SLC26A4	p.G149R; p.Q413R; p.V609G	Sequenciamento direto
OTOF	p.Q829X	RFLP-PCR
TMC1	p.S647P	Sequenciamento direto
CRYL1	c.1622T>C	Sequenciamento direto

Tabela 12. Técnicas utilizadas para a validação dos ensaios testados na placa de OpenArray[™].

3.2.3.5.1. Validação através do sequenciamento direto dos genes estudados

Foram realizados os sequenciamentos para validar os ensaios dos genes *GJB2*, *miR96/183*, *SLC26A4*, *TMC1* e *CRYL1* utilizando o sequenciador automático *ABI PRISM 3700 DNA Analyzer* e o *kit ABI PRISM BigDye TM Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit* (Applied Biosystem). Para o preparo das reações foram utilizados: 40 a 80ng de DNA, 3µL do *mix BigDye*[™] (2µL de Tampão + 1µL de *Big Dye*), 1µL do *primer* direto ou reverso (5 pmol/µL) e 5µL de água deionizada, completando o volume para 10µL em cada reação. Todas reações foram realizadas em microplacas de *PCR* de 96 poços da marca *Axygen*[®] *Scientific Inc.* (PCR-96-C). A termociclagem das reações está especificada na Figura 28.



Figura 28. Termociclagem utilizado nas reações de sequenciamento dos genes *GJB2*, *miR96/183*, *SLC26A4*, *TMC1* e *CRYL1*. A termociclagem compreendeu 26 ciclos a 95°C por 20 segundos (desnaturação do DNA), seguido da temperatura de 50°C por 20 segundos(anelamento dos *primers*) e o aumento da temperatura para 60°C por 4 minutos (ocorrendo a extensão das novas fitas).

Após aproximadamente 2 horas de termociclagem, as reações de sequenciamento foram purificadas. Primeiramente, foram adicionados 25µL de etanol 100% e 2,5µL de EDTA 125mM em cada reação. Em seguida, a placa foi selada com um selante de borracha próprio para placas de 96 poços e esta foi invertida 4 vezes, sendo então armazenada, por 10 minutos, protegida da luz. Após o repouso, a placa foi centrifugada por 35 minutos a

4000rpm. Ao término, a placa foi invertida e os demais materiais foram descartados, mantendo apenas os *amplicons* das reações aderidos às paredes dos poços. Um *spin* de 250rpm com a placa invertida foi dado para retirar qualquer líquido presente no interior dos poços. Dando sequência à purificação, foi adicionado 30µL de etanol 70% gelado em cada reação e uma nova centrifugação, por 10 minutos, a 4000rpm foi feita, descartando o etanol 70% ao término. Um novo *spin* invertido de 250rpm foi realizado para secar a placa, que ficou *over-night* secando protegida da luz natural e artificial. O protocolo seguido para o sequenciamento dos fragmentos dos genes foi igual para todos, variando apenas com relação dos *primers* utilizados (Tabela 13).

Gene	Ensaios	Primers utilizado
	p.N206S; p.E147K; p.W24X. c.167deIT:	Primer 1F – 5' – CTC CCT GTT CTG TCC TAG C – 3'
	c.235delC; p.V95M; p.S113B: p.M93I:	<i>Primer 1R</i> - 5' – GAC ACG AAG ATC AGC TGC – 3'
GJB2	p.E129K; p.V37I; p.L90P;	
	p.R184P; p.W172X; p.B75Q: p.M34T: p.V1531:	Primer 2F - 5' – GCT ACG ATC ACT ACT TCC C - 3'
	p.K168R; c.35delG; p.R184W	Primer 2R - 5' – GGT TGC CTC ATC CCT C – 3'
miR96	c13G>A; c.14C>A	Primer F - 5' – CAC AGC AGC TGA GCC AGA TG - 3'
		<i>Primer R</i> - 5' – GCA TGT GGA TCT TGT GAA GAG - 3'
SLC26A4	p.G149R	Primer F - 5'- CCT ATG CAG ACA CAT TGA ACA TTT G-3'
		Primer R - 5'-ACC TGT ATA ATT CCA ACC AGC A-3'
	p.Q413R	Primer F - 5'-AAA TAC TCA GCG AAG GTC TTG C-3'
		Primer R - 5'-CGA GCC TTC CTC TGT TGC-3'
	p.V609G	Primer F - 5'-TCT TCG TTT AGA ATG GCA TCA-3'
		Primer R - 5'-CCC ATG TAT TTG CCC TGT TGC-3'
TMC1	p.S647P	Primer F - 5' – GTC AAA TAA ACA GGT GCA GTG – 3'
		<i>Primer R</i> - 5' – GAA AGA ACA CGA TGC CTG AG – 3'
CRVI 1	c.1622T>C	Primer F - 5' – CCG TTA ATT TCA GAT GCT A - 3'
CHILI		Primer R - 5' – CAT CGG TAC TAG ATA CGC TC - 3'

|--|

F= Primer Foward (Primer Sense); R= Primer Reverse (Primer Anti-Sense)

As placas foram enviadas para o departamento do Centro de Biologia Molecular e Engenharia Genética que dispõe do sequenciador automático para que fossem feitas as leituras das sequências. Estas foram analisadas e comparadas com as sequências normais dos genes com o auxílio dos programas *Chromas Lite[®]* (http://www.technelysium.com.au/ch romas_lite.html), para a visualização dos eletroferogramas e *CLC Sequence Viewer 6.5.1* (CLC bio A/S), para a alinhamento e comparação das sequências.

Posteriormente, os resultados foram comparados com os obtidos com a plataforma *TaqMan[®] OpenArray*[™] *Genotyping*, validando os ensaios.

3.2.3.5.2. Validação através do RFLP-PCR

Para validação das mutações estudados nos genes OTOF, 12S rRNA e MT-TS1 foi utilizado a técnica de RFLP-PCR (Restriction Fragment Length Polymorfism-Polimerase Chain Reaction). Todos estes resultados foram verificados em gel de agarose 2,0% corado com Brometo de Etídeo (Sigma), comparando com os resultados do TaqMan[®] OpenArray[™] Genotyping.

3.2.3.5.2.1. Triagem da alteração p.Q829X no gene nuclear OTOF

Para rastreamento da mutação *p.Q892X* foi utilizado o par de *primers* OTOF22 – F (5' – TGA CAC CCC CTC TTC GC - 3') e OTOF22 – R (5'- CCC GAC CCC TTG GGC CG-3'). Foram utilizados 1µL de DNA genômico, 5µL de desoxinucleotídeo trifosfato (dNTP), 5µL Tampão de PCR 10X (Tris-HCl 10mM pH 8,8), 1,5µL de Cloreto de Magnésio (MgCl₂), 1µL de cada *primer* citado acima e 0,3µL de *Taq DNA polimerase* (Invitrogen), completando para o volume de 50µL com água ultrapura. As reações foram feitas em tubos de 0,2µL da empresa *Axygen*[®] (PCR-02-C) e levados para o termocliclador *Veriti*[®] 96-Well Thermal Cycler (Applied BioSystems), onde ocorreram todas reações de amplificação.

Foram então realizados 30 ciclos de aquecimento a 95°C por 30 segundos para a desnaturação do DNA, seguido da temperatura de 60°C por mais 30 segundos para o anelamento dos primers, e então mais 30 segundos a 72°C para a extensão das novas fitas, com 157 pb de comprimento. As condições da PCR estão resumidas na Figura 29.





Ao término da amplificação, o produto de PCR foi verificado em gel de agarose 2% e este foi corado com Brometo de Etídio (Sigma). As reações que apresentaram o padrão de fragmentos esperado foram então digeridos através da reação de digestão contendo 17,5µL de produto de PCR, 0,5µL da enzima Bfa I (sítio de restrição: 5'...C\TAG...3') e 2µL de Tampão (este garantindo 100% de atividade da 4 enzima) [http://www.neb.com/nebecomm/products/productr0568.asp]. A reação de digestão foi realizada com o termocliclador Veriti[®] 96-Well Thermal Cycler (Applied BioSystems) por 4 horas a 37ºC. Na presença da sequência normal, não haverá digestão do fragmento. Com a seguência mutante, o fragmento de 157 pb será digerido em 2 fragmentos menores, um com 98 pb e outro com 59 pb.

3.2.3.5.2.2. Triagem das alterações m.1555A>G e m.1494C>T no gene mitocondrial 12S rRNA

• Triagem da alteração m.1555A>G

O rastreamento da mutação m.1555A>G utilizou as condições previamente reportadas por Friedman *et al.* (1999) e Iwasaki *et al.* (2000), fazendo uso do par de *primers*

MIT-F (5' – ATA TCT GAA CAC ACA ATA GC – 3') e MIT-R (5' – GAA ACC GAC CTG GAT TAC TC – 3').

Para um volume de 50 μ L de reação, foram utilizados: 200 a 500 ng de DNA, 200 μ M de cada desoxinucleotídeos trifosfato (dATP, dCTP, dGTP e dTTP), 20 pmol de cada primer (direto e inverso), 2,5 U de Taq DNA polimerase em tampão de *PCR* 10X (Tris-HCl 10mM pH 8,8), 25 mM de MgCl₂, completando com água ultrapura até o volume final.

As amplificações foram realizadas em aparelho termociclador *Veriti[®] 96-Well Thermal Cycler*. A ciclagem compreendeu 30 ciclos de aquecimento a 94ºC por 30 segundos para a desnaturação do DNA, seguido da temperatura de 54°C por 2 minutos para o anelamento dos *primers*, e então 1 minutos a 65ºC para a extensão das novas fitas (Figura 30).



Figura 30. Termociclagem para a triagem da alteração mitocondrial m.1555A>G.

Após a amplificação, foram gerados fragmentos de DNA mitocondrial de 2060 pb. Os *amplicons* foram submetidos à análise de restrição utilizando a enzima *BsmA* I (Invitrogen), por 2 horas a 55°C. Para a digestão, utilizou-se: 17,5µl do produto de *PCR*, 2,0µL de Tampão 3 e 0,5µL da enzima.

A análise da digestão foi realizada em gel de agarose 2,0% corado com Brometo de Etídio. Em indivíduos que sem a mutação m.1555A>G foram gerados 3 fragmentos: um de 1100, 516 e 444 pb. Já em indivíduos portadores da mutação, houve a presença de apenas um sítio de restrição, gerando um fragmento de 1616 pb e outro de 444 pb.

Triagem da alteração m.1494C>T

Para a triagem da alteração mitocondrial m.1494C>T, foi utilizado o par de *primers* Supri-C1494T-F (5' – GTC GAA GGT GGA TTT AGC AG - 3') e Supri-C1494T-R (5' – GCA GAA GGT ATA GGG GTT AG - 3'). A reação de amplificação do fragmento de 441 pb continha: 1µL de DNA genômico, 5µL de desoxinucleotídeo trifosfato (dNTP), 5µL Tampão de PCR 10X (Tris-HCl 10mM pH 8,8), 1,5µL de Cloreto de Magnésio (MgCl₂), 1µL dos primers citados acima e 0,3µL de Taq DNA polimerase (Invitrogen), completando para o volume de 50µL com água ultrapura. Todas reações foram feitas em tubos de 0,2µL da empresa *Axygen[®]* (PCR-02-C) e ciclados no termocliclador *Veriti[®] 96-Well Thermal Cycler*, utilizando a ciclagem descrita na figura 31.



Figura 31. **Termociclagem para a triagem da alteração mitocondrial m.1494C>T.** A amplificação se deu através do aumento da temperatura para 94°C por 30 segundos (desnaturação da dupla fita), seguida da queda da temperatura para 54°C por 2 minutos (anelamento dos *primers*) e para finalizar, houve o elongamento das fitas à 65°C por 1 minuto.

Ao término, as amostras foram verificadas em gel de agarose 2,0% (na concentração final 0,5µg/mL), e todas amostras que apresentaram a banda de 441 pb foram digeridos. A reação de digestão levou o tempo de 4 horas à 37°C, utilizando 17,5µL de produto de *PCR*, 0,5µL da enzima *HpH* I (Sítio de restrição: 5'- GGTGAN/ -3') e 2µL de Tampão 4. Sendo assim, indivíduos que apresentarem a sequência normal apresentaram o fragmento de 441

pb clivado em dois pedaços menores, um de 71 pb e outro de 370 pb. Já os indivíduos com a sequência mutante apresentaram o padrão de uma só banda de 441 pb.

3.2.3.5.2.3. Triagem das alterações m.7445A>G no gene mitocondrial MT-TS1

A reação de triagem obedeceu os mesmos parâmetros para as triagens anteriores. Foi utilizado um par de *primers*, um para a fita *Sense* e outro para a *Anti-Sense*. As sequências e nomes dos inicializadores estão contidas na tabela 14.

Tabela 14. Primers utilizados para a triagem da mutação mitocondrial m.7445A>G.

Nome dos <i>primers</i>	Sequência dos <i>primers</i>	Tamanho do fragmento (pb)
A7445G – F (<i>Sense</i>)	5' – CCCCGATGCATACACCAC – 3'	406
A7445G – R (Anti-Sense)	5' – CTATGATAGGGGAAGTAGCGTC - 3'	

A reação de amplificação tinha volume final de 50μ L, contendo (como nas demais reações) 1μ L de DNA genômico, 5μ L Tampão de PCR 10X (Tris-HCl 10mM pH 8,8), 5μ L de desoxinucleotídeo trifosfato (dNTP), $1,5\mu$ L de Cloreto de Magnésio (MgCl₂), 1μ L de cada *primer* mencionado acima e $0,3\mu$ L de Taq DNA polimerase (Invitrogen), completando para o volume final com água ultrapura.

A amplificação se deu através da desnaturação inicial a 95°C por 5 minutos e 35 ciclos de desnaturação (95°C por 1 minuto), anelamento dos *primers* (55°C por 1 minuto) e extensão das fitas (72°C por 1 minuto), seguido da extensão final a 72°C por 7 minutos.

Após a reação, os *amplicons* foram corrido em gel de agarose 2,0% preparado com TBE 1X (Tampão Tris/Borate/EDTA). Os indivíduos com padrão de banda de 406 pb foram digeridos através da reação utilizando 17,5µL de amplicon, 0,5µL da enzima *XbA* I (Sítio de restrição: 5' – T\CTAGA – 3') e 2µL de Tampão 2 por 4 horas à 37°C. Apenas os indivíduos com a sequência normal tiveram os fragmentos clivados, gerando 2 bandas menores, uma de 209 pb e outra de 197 pb. Já os indivíduos com a alteração m.7445A>G perderam o sítio de restrição da enzima *XbA* I, não sendo fragmentado em dois pedaços.

3.2.3.5.3. Rastreamento das deleções del(GJB6-D13S1830) e del(GJB6-D13S1854) no gene nuclear GJB6

A análise adotada para validar os dois *SNP*s que verificaram a presença ou não das deleções na placa de *OpenArray*[™] foi descrita, previamente, por del Castillo e colaboradores (2005). Esta análise consiste em um *PCR Multiplex* capaz de detectar as 2 deleções simultaneamente (Figura 32).



Figura 32. Esquema das 2 grandes deleções confirmadas e estudadas presentes no gene *GJB6* e dos *primers* utilizados para detectar as mesmas.

Foram utilizados 3 pares de *primers* (Tabela 15) para amplificar os segmentos que contêm a junção do ponto de quebra de cada uma das deleções *del(GJB6-D13S1830)* e *del(GJB6-D13S1854)*, sendo um deles um par de *primers* para amplificar um segmento controle dentro do éxon 1 para checar a eficiência da reação de *PCR*. Para realizar a reação, foram utilizados 2µL de DNA genômico, 5µL de desoxinucleotídeo trifosfato (dNTP), 3µL Tampão de PCR 10X (Tris-HCl 10mM pH 8,8), 1,5µL de Cloreto de Magnésio (MgCl₂), 2µL de cada *primer* abaixo acima e 1µL de *Taq DNA polimerase* (Invitrogen), completando para o volume de 40µL com água ultrapura. As ciclagens foram feitas utilizando o termocliclador *Veriti*[®] 96-Well Thermal Cycler (Applied BioSystems).

Nome dos <i>primers</i>	Sequência dos <i>primers</i>	
DelBK1	5' – TCA TAG TGA AGA ACT CGA TGC TGT TT–	
DelBK2	5' – CAG CGG CTA CCC TAG TTG TGG T- 3'	
BKR1	5' – CAC CAT GCG TAG CCT TAA CCA TTT T – 3	

Tabela 15. Primers utilizados para a validação das deleções no gene GJB6.

GJB6-1R	5' – TTT AGG GCA TGA TTG GGG TGA TTT – 3'
Cx30Ex1A	5' – CGT CTT TGG GGG TGT TGC TT – 3'
Cx30Ex1B	5' – CAT GAA GAG GGC GTA CAA GTT AGA – 3'

Este *mix* foi capaz de distinguir os alelos heterozigotos e homozigotos para qualquer uma das duas deleções. Após amplificação, o padrão de bandas visualizado em gel de agarose 2,0% corado com Brometo de Etídeo (Sigma) foi de três fragmentos de diferentes tamanhos: um de 333 pb, referente controle; e outros de 460 pb ou 564 pb, relacionados as deleções *del(GJB6-D13S1830)* e *del(GJB6-D13S1854)*, respectivamente.
RESULTADOS

4.1. Resultados Gerais

Após a escolha do *layout* da placa de *OpenArray*[™], foi realizado o levantamento de algumas das 32 principais mutações relacionadas à perda auditiva presente na população brasileira (Tabela 8). Porém o ensaio da mutação m.827A>G, presente no gene *12S rRNA* apresentou problemas na customização pela empresa e não foi adicionado à placa de *OpenArray*[™] requerida para o estudo, fazendo o mesmo conter 31 ensaios por placa de *OpenArray*[™].

Ao total, foram estudados 376 pacientes, sendo 282 indivíduos com perda auditiva e 94 controles ouvintes. Todos foram analisados em duplicata, verificando a presença das mutações previamente selecionadas. Do total, 367 amostras apresentavam bom nível de pureza (A_{260/280} entre 1,70 e 2,00) e concentração de 50ng/µL, sendo utilizado o *NanoDrop[®] 8000* para verificação da pureza e o *Qubit[®] Fluorometer*, juntamente com o *Qubit[®] Assay Kit dsDNA BR Assay* para verificar a quantificação.

Deste grupo de 282 indivíduos estudados, 86 deles já apresentavam mutações previamente identificadas no gene *GJB2* e/ou deleções do gene *GJB6* e/ou a mutação m.1555A>G, estudada no gene *12S rRNA*. Estes resultados permitiram testar todas as sondas (marcadas com o fluorocromo $VIC^{(B)}$ e *FAM*^(B)) utilizadas para todos os ensaios da placa customizada. Para os demais indivíduos sem os resultados prévios, foram utilizadas as técnicas descritas na tabela 12 para o rastreamento das mutações e posterior validação dos ensaios contidos na placa de *OpenArray*^(M).

O número de pacientes estudados é correspondente a 4 placas de *OpenArray*[™] com o *layout* 32 ensaios em 96 pacientes (94 pacientes e dois controles brancos). Ao total, foram utilizadas 8 placas (Tabela 16) devido todos os estudos terem sido feitos em duplicata para verificar se haveria alguma divergência nos resultados das placas, o que não foi constatado, pois os resultados foram idênticos entre as duplicatas. Isso demonstrou a grande reprodutibilidade da plataforma *TaqMan[®] OpenArray[™] Genotyping*.

Nome do experimento de	Quantidade de	ID da Placa de <i>OpenArray</i> [™]
OpenArray	Individuos estudados	(Duas placas por experimento-duplicada)
New Plate 01	94	HKM 74
		HKM 77
New Plate 02	94	HKM 75
		HKM 78
New Plate 03	94	HKM 76
		HKM 79
New Plate 04	94	HKM 82
		HKM 83

Tabela 16. Identificação dos experimentos e placas de OpenArray[™] utilizados para a otimização da plataforma TaqMan[®] OpenArray[™] Genotyping.

Por placa de *OpenArray*[™], foram realizados 2.914 reações de genotipagem, totalizando 11.656 reações em duplicata para realizar a genotipagem dos 376 indivíduos nas 4 placas. Apenas nove indivíduos não puderam ser analisados, totalizando 279 reações (2,39%). Fato explicado pelas amostras estarem degradadas, com pureza inferior que a recomendada (A_{260/280} abaixo de 1,7), além de apresentar concentração inferior à 50ng/µL, não contendo as 250 cópias haplóides do DNA mínimas exigidas para o experimento. Outras 32 reações (0,27%) apresentaram resultados divergentes quando comparados com os resultados das técnicas pré-estabelecidas que foram utilizadas para a validação das placas. Os ensaios que apresentaram problemas durante a realização, sendo considerado inválidos ou que não tenham tido os fragmentos amplificados para o pareamento da sonda corresponderam a 42 reações (0,36%).

As placas de *OpenArray*[™] obtiveram rendimento médio bruto de 98,85% de genotipagens, sendo que para o experimento *New Plate 01* obteve-se 99,9% de resultados e 98,6%, 98,5% e 98,4% de genotipagens para os experimentos *New Plate 02, New Plate 03* e *New Plate 04*, respectivamente. O rendimento das genotipagens dos indivíduos utilizando as placas variou entre 80,65% a 100%, sendo que foi possível genotipar por completo 339 indivíduos (90,16% de todos indivíduos estudados) (Tabela 17).

Exporimonto	Quantidade de	Rendimento das genotipagens	0/
Experimento	Indivíduos	(Genotipagens realizadas/Número de ensaios)	70
New Plate 01	91	31/31	100%
	2	30/31	96,8%
New Plate 02	81	31/31	100%
	5	30/31	96,8%
	2	29/31	93,5%
New Plate 03	83	31/31	100%
	7	30/31	96,8%
	2	29/31	93,5%
	1	27/31	87,1%
New Plate 04	84	31/31	100%
	6	30/31	96,8%
	2	29/31	93,5%
	1	25/31	80,65%

Tabela 17. Rendimento de genotipagens dos indivíduos por placa de OpenArray[™].

Desconsiderando as reações com resultados divergentes e falhos (353 reações – 3,03% do total de ensaios), obteve-se a reprodutibilidade e acurácia de, aproximadamente, 96,97% das reações, o equivalente a 11.303 reações.

A utilização da plataforma *TaqMan[®] OpenArray*[™] *Genotyping* auxiliou na genotipagem das mutações selecionadas de 196 indivíduos (52,13% dos indivíduos analisados) sem nenhum resultados genético pré-estabelecido.

4.2. Análise dos resultados de genotipagem utilizando a Plataforma *TaqMan[®] OpenArray[™] Genotyping*

A análise dos resultados das placas de *OpenArray*[™] baseou-se na fluorescência das sondas emitida durante a hidrólise, o que gerou dois ou três conjuntos de clusters calculados através de algorítmo presente no *software TaqMan[®] Genotyper*. Para melhor entendimento e organização, as análises das placas de *OpenArray*[™] foram feitas em 5 etapas (Fluxograma 2).



Fluxograma 2. Esquema utilizado para análise as placas de OpenArray[™].

4.2.1. Verificação dos *clusters* gerados pelo *OpenArray*[™] *NT Cycler*[®] utilizando o *software OpenArray*[™] *SNP Genotyping Analysis*

Ao término da captura dos sinais da fluorescência pelo equipamento $OpenArray^{\mathbb{M}} NT$ $Cycler^{\mathbb{B}}$, houve a caracterização dos níveis de fluorescência coletados pelo software $OpenArray^{\mathbb{M}} SNP$ Genotyping Analysis. Por se tratar de um software relativamente simples, houve apenas a separação em *clusters* vermelho (indivíduos homozigotos para $VIC^{\mathbb{B}}$), verde (heterozigotos) e azul (indivíduos homozigotos para $FAM^{\mathbb{B}}$) (Figura 33). Assim sendo, os resultados foram exportados e armazenados em um CD novo, para posteriores análises.



Figura 33. **Visão geral do software OpenArray**[™] **SNP Genotyping Analysis.** Representação dos 3 *clusters* possíveis na análise das placas de *OpenArray*[™], sendo o vermelho para indivíduos homozigotos para a sonda *VIC*[®] (homozigoto normal), o verde para heterozigotos (presença de uma sonda *VIC*[®] e uma sonda *FAM*[®]) e o azul para indivíduos homozigotos para a sonda *FAM*[®] (homozigoto mutante).

4.2.2. Verificação das imagens da placa e da fluorescência emitida pelos fluoróforos *VIC*[®], *FAM*[®] e *ROX*[®]

A leitura da placa pelo *OpenArray*^m *NT Cycler*[®] gerou vários documentos, dentre eles, um arquivo com a extensão *.spd* (*SNP Plate Dates*), contendo os valores da fluorescência de *VIC*[®], *FAM*[®] e *ROX*[®] de cada ensaio. Além do arquivo *.spd*, gerou as imagens (Figura 34) com extensão *.tiff* (*Tagged Image File Format*) do interior do *OpenArray*^m *NT Cycler*[®], onde cada arquivo continha dados da fluorescência de cada um dos fluoróforos utilizados, sendo eles:

 TSpotFind.tiff: Imagem que mostra o posicionamento da placa dentro do OpenArray[™] NT Cycler[®], para a verificação se a mesma está no local correto para a captura da fluorescência;

- DarkImage.tiff: Imagem da câmera do interior do equipamento, verificando se há a entrada de algum tipo de luminosidade externa no interior do OpenArray[™] NT Cycler[®];
- TROX.tiff: Imagem gerada para a confirmação de que os ensaios foram depositados pela empresa na placa de OpenArray[™];
- TVIC.tiff: imagem que mostra a fluorescência VIC[®] emitida e capturada pela leitura;
- TFAM.tiff: imagem que mostra a fluorescência *FAM[®]* emitida e capturada pela leitura.

Estas imagens foram capturadas por câmeras *CCD* (*Charge-coupled Device*). Em seguida, foram visualizadas no *software ImageJ* 1.47g, comprovando o posicionamento correto das placas e a fluorescência emitida dos ensaios e fluoróforos.



Figura 34. Imagens da placa de *OpenArray*[™] e seus fluoróforos capturados pelo *OpenArray*[™] *NT Cycler*[®]. (a) Negativo da Placa, indicando que a placa foi posicionada na posição correta para a posterior captura de fluorescência. (b) Visualização do fluoróforo passivo ROX^{\oplus} , indicando que os ensaios foram depositados pela empresa na placa de *OpenArray*[™]. (c) Captura da fluorescência do fluoróforo VIC^{\oplus} , indicando o anelamento da sonda com este fluoróforo em sequências normais. (d) Captura da fluorescência do fluoróforo FAM^{\oplus} , indicando a presença de alelos mutantes.

4.2.3. Importação dos dados gerados para o *software TaqMan[®] Genotyper v1.2*

Os resultados gerados pelo *OpenArray*[™] *NT Cycler*[®] foram importados para o *software TaqMan*[®] *Genotyper v1.2* (Applied BioSystems) (Figura 35). Este *software* apresenta maior poder para as análises de genotipagem das placas de *OpenArray*[™], além de apresentar interface de fácil entendimento. Este é gratuito, estando disponível para *download* na página da Applied BioSystems. (https://products.appliedbios8ystems.com/ab/en/US/adire ct/ab;jsessionid=qJFyQ7WTLBxkpWnMSwVQIcP0MW8v4Lz35H9GCmJyy5HyJZTP8HrP!-1301563104?cmd=catNavigate2 &catID=607267).



Figura 35. Visão geral do software TaqMan[®] Genotyper v1.2. Em destaque, a reação m.1555A>G.

Neste software, foi possível fazer a análise dos ensaios através de três formas diferentes, sendo elas:

• **Dos indivíduos:** mostrando todos os resultados individuais de cada paciente (analisando os 31 ensaios de cada paciente por vez) (Figura 36);

Flag Summa	ry Assays	Experime	nts	5	amples																
	Sample II	6			1 Sa	mple C	al Rat	e 💱	P.O		NTO	NTC	٩. T		6		8				
10	11.01				-		TUU	778	_	U		0 0		0	0	U	0	7			
16	12 UNI				-		100	1%	-	U		0 0		0	0	0	0	3			
17	122				-		100	7%	-	0		0 0	-	0	0	0	0	1			
18	123				-		100	176	-	0		0 0		0	0	0	0	2			
20	120				-		100	196	-	0		0 0		0	0	0	0	2			
20	120				-		100	175	-	0		0 0		0	0	0	0	-			
22	1339				-		100	144		0		0 0		0	0	0	0				
	1357				-							-					-				
tesults																					
View	Group t	iy - 🏹 Bo	ookma	ark •	۰.	, Tag -	•	Change Ca	-												
	Assay ID		UCK .	TC I	TC	OT 6	3 6) (B) Cal	м	anual	Well	Experiment I	lame			Task	C	omment		 	
1	V95M				-	-	-	VIC/	/IC	-	010a1	HKM74.sod				Unknos	m				
2	S1138		+	-	-		-	VIC	/1C	-6	010a2	HKM74.sod				Unknos	m		-		
3	M931		-	-	-	-	-	VIC	/1C	-	010a3	HKM74.sod				Unknow	m		-		
4	W24X		-	-	-	-	+	VIC/	/IC	- 6	01094	HKM74 sod				Unknow	m		-		
5	E147K		-	-			-	VIC/	/1C	6	010a5	HKM74.sod				Unknow	m		-		
6	N2065		-	-	-	-	-	VIC/	/1C	0	01026	HKM74.spd				Unknos	m		-		
7	E129K						-	VIC	/1C	-	010a7	HKM74.sod				Unknow	m		-		
8	V37I						-	VIC/	/1C	E	010a8	HKM74.spd				Unknow	m		-		
9	L90P						-	VIC/	/1C	0	010b1	HKM74.sod				Unknos	m		-		
10	R184W					-		VIC/	/1C	2	010b2	HKM74.spd				Unknow	m		-		
11	R184P							VIC/	/1C	1	D10b3	HKM74.spd				Unknos	m		-		
12	W172X							VIC/	/IC	5	010b4	HKM74.spd				Unknos	in:				
13	R75Q							VIC/	/1C	0	010b5	HKM74.spd				Unknow	m				
14	M34T							VIC/	/1C	E	D10b6	HKM74.spd				Unknos	m				
15	V153I					2		VIC/	/1C	C	D10b7	HKM74.spd				Unknow	m				
16	K168R							VIC/	/1C	0	D10b8	HKM74.spd				Unknow	m				
17	Q829X							VIC/	/1C	0	D10c1	HKM74.spd				Unknow	m				
18	MR96-13							VIC/	/1C	1	010c2	HKM74.spd				Unknow	m				
19	MR96-14							VIC/	/1C	0	010c3	HKM74.spd				Unknos	m				
20	A1555G		_	_		-		VIC/	/1C	0	D10c4	HKM74.spd				Unknow	m				
21	C1494T			_		1	-	VIC/	/1C	6	D10c6	HKM74.spd				Unknow	m				
22	A7445G		_	_	_	_	_	VIC/	/IC	6	D10c7	HKM74.spd				Unknow	m				
23	G149R		-	-	-	1	-	VIC/	/1C	0	D10c8	HKM74.spd				Unknow	m				
24	Q413R		_	_	-	-	-	VIC/	/1C	0	D10d1	HKM74.spd				Unknos	m				
25	V609G		_	_	_	-	-	VIC/	/1C	2	010d2	HKM74.spd				Unknow	m		_		
26	35delG		-	-		1	-	VIC/	/IC	1	010d3	HKM74.spd				Unknow	m		-		
27	167delT		-	-	-	-	-	VIC/	/IC	-	D10d4	HKM74.spd				Unknow	m				
28	235delC		-	-	-	-	-	VIC/	110	-	prod5	HKM/4.spd				Unknos	m				
					_			1 0/10/0	110		310d6	IMKM/4.sod				LUNKNOS	m l				

Figura 36. Visualização da genotipagem de acordo com o indivíduo pelo software TaqMan[®] Genotyper v1.2.

 Das chamadas: todos resultados foram mostrados em três grupos diferentes, de acordo com a chamada (genotipagem) detectada pelo *OpenArray[™] NT Cycler[®]* nos ensaios (Figura 37).



Figura 37. Visualização de todos resultados no ensaio de acordo com as chamadas geradas pelo *software TaqMan[®] Genotyper v1.2.* A imagem é dividida em indivíduos *VIC[®]/VIC[®]* (homozigoto normal/cor vermelho), *VIC[®]/FAM[®]* (heterozigotos/cor verde) e *FAM[®]/FAM[®]* (homozigoto mutante/cor azul).

• **Dos ensaios:** visualização dos resultados de acordo com o ensaio (analisando um ensaio para os 94 indivíduos de uma só vez). Este é o modo padrão de se realizar as análises das placas de *OpenArray*[™], sendo gerado um gráfico cartesiano contendo 3 *clusters* diferentes (Figura 38) que ficam dispostos de acordo com a fluorescência emitida. Os indivíduos com ambos alelos normais foram representados pela cor vermelha, indicando que apenas a sonda *VIC*[®] anelou à sequência normal. O *cluster* de cor verde representou os indivíduos presentes no *cluster* azul representaram os homozigotos mutantes, apresentando os dois alelos mutantes e a ligação da sonda marcada com o fluoróforo *FAM*[®]. Os *NTCs* (*No Template Control*), que são controles negativos (quadrado azul-claro), ficaram na região sinalizada pela cor amarela.





4.3. Análise dos resultados utilizando o *Software TaqMan[®] Genotyper* e tabulação dos resultados gerados

Dentre as 31 mutações analisadas nos 376 indivíduos, foram detectados 179 alterações utilizando a plataforma *TaqMan[®] OpenArray[™] Genotyping*, porém a validação de todos os resultados apresentou apenas 159 alterações, tendo uma discrepância de 20 alterações (Tabela 18).

Tabela 18. Alterações presentes nas placas de *OpenArray*[™] analisadas e validações das mutações detectadas.

Gene	Alteração	Casos OpenArrav [™]	Casos Validados	Gene	Alteração	Casos OpenArrav [™]	Casos Validados
GJB2	c.35delG/N	40	34	GJB2	c.35delG/N + p.V37l/N	2	2
	c.35delG/ c.35delG	34	31		c.35delG/N + p.R184P/N	2	2
	p.M34T/N	14	11		c.35delG/N + p.W24X/N	2	2
	p.M34T/ p.M34T	2	2		c.35delG/N + c.167delT/N	2	2
	p.K168R/N	6	6		c.35delG/N + p.V153I/N	1	1
	p.V37I/N	4	3		c.35delG/N + p.L90P/N	1	1
	p.L90P/N	6	6		p.V37I/N + p.V95M/N	2	2
	c.167delT/N	3	3		p.V37I/N + c.167deIT/N	1	1
	p.R143W/N	2	2		p.M34T/N + p.N206S/N	1	1
	p.V153I p./V153I	1	1		p.M34T/N + p.R184W/N	1	1
	p.V153I/N	2	1		p.V609G/N + p.E129K/N	1	1
	p.E147K/N	2	2		p.V609G/N + p.K168R/N	1	1
	p.R184P/N	4	4	GJB6	del(GJB6- D13S1830)/N	0	3

p.R184W/N	2	2		del(GJB6- D13S1854)/N	0	1
p.E129K/N	2	1	12S rRNA	m.A1555G	6	6
p.W172X/ p.W172X	1	1	MT-TS1	m.A7445G	1	1
p.N206S/N	2	2	SLC26A4	p.V609G/ p.V609G	3	1
p.V95M/N	0	1		p.V609G/N	16	10
p.W24X/N	3	2		p.G149R/N	3	1
c.35delG/N + p.V95M/N	3	3		p.Q413R/N	0	1

4.3.1. Análises das mutações no gene nuclear GJB2

Foram analisadas algumas das principais alterações descritas na nossa população no gene *GJB2* utilizando a plataforma *OpenArray*[™]. Além de apresentar o maior número de ensaios utilizados, este gene apresentou o maior número de mutações detectadas pela plataforma, totalizando 150 mutações de ponto ou deleções de uma única base (Tabela 18). Todos os ensaios foram analisados utilizando o gráfico cartesiano padrão (*Standard Diploid Genotypes*) do *TaqMan[®] Genotyper Software v1.2*. Este gráfico divide as frequências de cada alelo de forma igualitária, sem considerar maior frequência de algum deles (Figura 39).



Figura 39. Gráfico gerado pelo *software TaqMan[®] Genotyper* utilizando o padrão *Standard Diploid Genotypes.* Visualização do ensaio p.R184P indicando a presença de 2 indivíduos heterozigotos p.R184P/N e 92 indivíduos normais.

As validações dos ensaios realizados deste gene foram feitas por sequenciamento direto, utilizando o sequenciador automático *ABI PRISM 3700 DNA Analyzer* e o *kit ABI PRISM BigDye TM Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit* (Applied Biosystems). Com posse da sequência de referência deste gene (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/2706), retirada do banco de dados do site do *NCBI* (*National Center for Biotechnology Information*) os resultados foram então pareados utilizando o *software CLC Sequence Viewer 6.5.1* (Figura 40) para detectar qualquer alteração nas amostras sequenciadas. Para verificar se não houve algum equívoco do *software* no momento do pareamento das bases, o eletroferograma de todas as sequências foi analisado individualmente utilizando o *software Chromas Lite 2.01* (Figura 41). O resultado das validações no gene *GJB2* detectou a presença de 135 alterações (deleções e mutações de ponto), 15 a menos da genotipagem realizada pelas placas de *OpenArray*[™], implicando na presença de ensaios da placa de *OpenArray*[™] com falsos positivos (c.35delG, p.M34T, p.V37I, p.V153I, p.E129K, p.W24X) e um falso negativo (p.V95M).



Figura 40. Visão geral do software CLC Sequence Viewer 6.5.1 utilizado para pareamento das sequências.



Figura 41. Visão geral do software Chromas Lite 2.01 utilizado para verificação dos eletroferogramas.

4.3.1.1. Alteração G>A na posição 283

Esta alteração foi encontrada em 6 indivíduos e causou a substituição do aminoácido valina por uma metionina no códon 95 (p.V95M). Relatada em 1998 por Kelley e colaboradores, esta troca foi detectada, utilizando as placas de *OpenArray*[™] (Figura 42a) em 5 indivíduos heterozigotos compostos, sendo 3 deles heterozigotos para a alteração c.283G>A e c.35delG, e os outros dois heterozigotos para c.283G>A e c.109G>A (p.V37I). Não foi possível detectar a heterozigose de um indivíduo para a p.V95M, resultado que foi confirmado durante a validação pelo sequênciamento direto (Figura 42b).



Figura 42. Detecção da alteração c.283G>A (p.V95M). (a) Gráfico TaqMan® software gerado no Genotyper. Indivíduos heterozigotos para a alteração c.283G>A estão representados no Os demais cluster verde. indivíduos, com genotipo normal, estão localizados no cluster vermelho. (b) Sequenciamento direto do gene GJB2 confirmando indivíduos heterozigotos (p.V95M/N) (seta vermelha).

4.3.1.2. Alteração G>A na posição 71

Alteração que resulta na substituição de um aminoácido triptofano na posição 24 por um *stop códon*, formando um peptídeo truncado de apenas 24 aminoácidos. Foram detectados 5 casos em heterozigose utilizando o *OpenArray*[™] (Figura 43a), sendo 4 deles validados (Figura 43b), indicando a presença de falso positivo. Dois dos resultados validados eram hererozigotos apenas para esta alteração (p.W24X). Os outros dois apresentavam tanto esta alteração quanto a c.35delG em heterozigose.



43. Detecção Figura da alteração c.71G>A (p.W24X). (a) Gráfico gerado no software TaqMan® Genotyper. Três indivíduos heterozigotos para a alteração c.71G>A estão representados no *cluster* verde. Os demais indivíduos, com genotipo estão normal, localizados no cluster vermelho.



(b) Sequenciamento direto do gene GJB2 confirmando indivíduo heterozigoto para W24X, indicado pela seta vermelha.

4.3.1.3. Alteração G>A na posição 439

Encontrada em heterozigose e validada (Figura 44) em 2 indivíduos, a alteração c.439G>A causa a troca de um aminoácido glutamato por uma lisina no códon 147.



Figura 44. Detecção da alteração c.439G>A (p.E147K). Gráfico gerado no *software TaqMan[®] Genotyper*. Na imagem, um indivíduo heterozigoto para a alteração c.439G>A está representado no *cluster* verde, estando os demais indivíduos no *cluster* vermelho, indicando a ausência da alteração.

4.3.1.4. Alteração A>G na posição 617

Alteração constatada em três indivíduos, sendo 2 casos de heterozigose para esta alteração (Figura 45) e mais um indivíduo heterozigoto composto, apresentando também a p.M34T. A troca de uma adenina por uma guanina na posição 617 do gene *GJB2* causa a troca do aminoácido asparagina por uma serina no códon 206 (Kenna *et al.*, 2001).



Figura 45. Detecção da alteração c.617A>G (p.N206S). (a) Gráfico software TagMan® gerado no Genotyper. Indivíduo heterozigoto alteração c.617A>G para а é representado no *cluster* verde. Os demais indivíduos, com genotipo normal, estão localizados no cluster vermelho. (b) Sequenciamento direto do gene GJB2 confirmando indivíduo (p.N206S/N) heterozigoto (seta vermelha).

4.3.1.5. Alteração G>A na posição 385

Esta alteração foi encontrada em 3 indivíduos e causou a substituição do aminoácido glutamato por uma lisina no códon 129 (p.E129K). Relatada em 2001 por Kenna e colaboradores, esta troca foi detectada, utilizando as placas de *OpenArray*[™] (Figura 46) em 1 indivíduo heterozigoto digênico, apresentando juntamente a alteração p.V609G em heterozigose no gene *SLC26A4*. Além disso, foi detectada em heterozigose em 2 indivíduos, porém a validação constatou apenas 1 deles com a alteração.



Figura 46. Detecção da alteração c.385G>A (p.E129K). Indivíduo heterozigoto para a alteração c.386G>A é representado no *cluster* verde.

4.3.1.6. Alteração G>A na posição 109

Esta alteração (Figura 47b), que causa a troca de uma valina por uma isoleucina no 37° *códon*, foi detectada em 9 indivíduos utilizando as placas de genotipagem *OpenArray*TM, todos estes em heterozigose, composta ou não. Ao todo, foram validados 8 alterações, como pode ser observado na tabela 18 (Kelley *et al.*, 1998).



Figura 47. Detecção da alteração c.109G>A (p.V37I). (a) Gráfico gerado no software TaqMan® Genotyper. Dois indivíduos heterozigotos para a alteração c.109G>A estão representados no cluster verde. Os demais indivíduos, com genotipo estão normal. localizados no cluster vermelho. (b) Sequenciamento direto do gene GJB2 confirmando indivíduo heterozigoto para p.V37I, indicado pela seta vermelha.

4.3.1.7. Alteração T>C na posição 269

A alteração c.269T>C é responsável pela mudança na estrutura proteíca no códon 90, ocorrendo a troca de uma leucina por uma prolina. Foi relatada por Murgia e colaboradores (1999), e esteve presente no devido trabalho apenas em heterozigose (Figura 48) em 7 indivíduos, sendo um deles heterozigoto composto, apresentando também deleção a c.35delG.



Figura 48. **Detecção da alteração c.269T>C (p.L90P).** Na imagem, um indivíduo heterozigoto para a alteração c.269T>C está representado no *cluster* verde, estando os demais indivíduos no *cluster* vermelho, indicando a ausência da alteração.

4.3.1.8. Alteração C>G na posição 550

A troca de uma arginina por um triptofano na posição 184 da conexina 26 (p.R184W) é causada pela alteração c.550C>G, esta que foi detectada em heterozigose (Figura 49) em 3 indivíduos do estudo, sendo um caso de heterozigose composta (p.R184W/N + p.M34T/N) (Wilcox *et al.*, 2000).



Figura 49. Detecção da alteração p.R184W no gene *GJB2*. Gráfico gerado no *software TaqMan[®] Genotyper*. Indivíduo heterozigoto para a alteração c.550C>G é representado no *cluster* verde. Os demais indivíduos, com genotipo normal, estão localizados no *cluster* vermelho.

4.3.1.9. Alteração G>C na posição 551

A troca de uma guanina por uma citosina na posição 551 do gene *GJB2* é o causador da alteração p.R184P. A substituição de uma arginina por uma prolina na posição 184 foi descrita por Denoyelle e colaboradores (1997). Nas placas de *OpenArray*[™], foram detectados 6 heterozigotos para a mutação (Tabela 18).



Figura 50. **Detecção da alteração c.551G>C (p.R184P).** Gráfico gerado no *software TaqMan[®] Genotyper*. Indivíduos heterozigotos para a alteração c.551G>C são representados no *cluster* verde. Os demais indivíduos, com genotipo normal, estão localizados no *cluster* vermelho.

4.3.1.10. Alteração T>C na posição 101

A alteração c.101T>C é a responsável pela troca da metionina no códon 34 por uma treonina (p.M34T). Esta alteração foi detectada nas placas de *OpenArray*[™] em homozigose, heterozigose e heterozigose composta (Figura 51), estando presente em 18 indivíduos. Dos 14 heterozigotos apenas para esta alteração, apenas 11 foram validados, apresentando falso positivo no ensaio desenhado.



Figura 51. **Detecção da alteração c.101T>C (p.M34T).** No plano cartesiano gerado, dois indivíduos homozigotos mutantes foram detectados e representados pelo *cluster* azul. Já seis indivíduos heterozigotos para a alteração c.101T>C foram detectados e representados pelo *cluster* verde, estando os demais indivíduos no *cluster* vermelho, indicando a ausência da alteração.

4.3.1.11. Alteração A>G na posição 503

A mutação p.K168R consiste na troca de um aminoácido lisina por uma arginina no códon 168 da proteína conexina 26. Esta foi detectada em heterozigose em 7 indivíduos utlizando as placas de *OpenArray*[™] (Figura 52), sendo um deles um caso de heterozigose digênica, onde o indivíduo apresentava a alteração p.K168R em heterozigose, juntamente com a alteração p.V609G no gene *SLC26A4*.



Figura 52. **Detecção da alteração c.503A>G (p.K168R).** No gráfico gerado, quatro indivíduos heterozigotos foram detectados e representados pelo *cluster* verde, estando os demais indivíduos no *cluster* vermelho, indicando a ausência da alteração.

4.3.1.12. Deleção c.167delT

A deleção de uma timina na posição 167 do gene *GJB2* é a principal causa de perda auditiva de origem genética entre os judeus. A deleção causa a troca no quadro de leitura da tradução (*frameshift*), resultando em um *stop códon* prematuro e uma proteína não funcional (Zelante *et al.*, 1997). No estudo, foram detectados 6 casos em heterozigose, sendo 2 deles em indivíduos que já apresentavam outra deleção, a c.35delG, e outro caso em um indivíduo que já apresentava p.V37I em heterozigose (Figura 53).



Figura 53. Detecção da deleção c.167delT. O *cluster* vermelho representa os indivíduos normais, sem a deleção, enquanto o *cluster* verde indica os 5 casos heterozigotos para a deleção.

4.3.1.13. Deleção c.35delG

A deleção de uma guanina na 35^ª posição do gene *GJB2* é a principal causadora de perda auditiva de origem genética entre os caucasianos. Esta é a principal alteração relacionada a perda auditiva. A deleção gera a troca no quadro de leitura dos códons, causando um término prematuro da proteína, que acaba truncada. Nos ensaios realizados, 50 indivíduos apresentaram a deleção em heterozigose. Em alguns casos, os indivíduos heterozigotos também apresentavam outras alterações estudadas no gene *GJB2*, como pode ser visto na tabela 18. Outros 34 indivíduos apresentaram a deleção em ambos alelos (homozigotos), sendo detectados apenas o anelamento da sonda desenhada para deleção. Todos os resultados foram validados através do sequenciamento direto, apresentando alguns casos de falso positivo.



Figura 54. **Detecção da deleção c.35delG.** Indivíduos homozigotos para a deleção são representados pelo *cluster* azul. O verdes representam os heterozigotos e os vermelhos os indivíduos que não apresentam a deleção em nenhum dos alelos.

4.3.1.14. Demais resultados

A utilização da técnica *TaqMan[®] OpenArray*[™] *Genotyping* permitiu a detecção da mutação c.167delT em heterozigose presente em um indivíduo heterozigoto também para a mutação c.35delG. Este rastreamento é difícil de ser visualizado utilizando o sequenciamento

direto, uma vez que o eletroferograma fica desalinhado com a presença da mutação c.35delG em heterozigose (Figura 55).



Figura 55. Análise dos resultados de um invidíduo heterozigoto para a mutação c.35delG e c.167delT no gene *GJB2*. (a) Visualização do eletroferograma pelo *software Chromas Lite[®]* do invidíduo contendo a mutação c.35delG em heterozigose (indicado pela seta). (b) Visualização do eletroferograma pelo software Chromas Lite[®] do mesmo indivíduo heterozigoto também para a deleção c.167delT (indicado pela seta). (c) Alinhamento e análise das sequências das fitas sense e anti-sense pelo *software CLC Sequence Viewer 6.5.1*, indicando o local das deleções pelas setas.

Outras mutações também foram detectadas durante a análise do sequenciamento automático do gene *GJB2*, porém o ensaio destas não estava presente na placa a ser validada. Dos 376 indivíduos, dois apresentaram o genótipo p.R143W/N para a mutação no gene *GJB2* (Figura 56).



Figura 56. Detecção da mutação p.R143W em heterozigose por sequenciamento direto do gene *GJB2*. (a) Eletroferograma do sequenciamento visualizado pelo *software Chromas Lite*[®], indicando a presença da mutação c.427C>T pela seta vermelha. (b) Análise do alinhamento das sequências utilizando o *software CLC Sequence Viewer 6.5.1* (seta vermelha indica a mutação).

4.3.2. Análises das mutações no gene nuclear GJB6

Foram selecionados 2 *SNP*s, o rs11843171 (c.6013G>T no gene *GJB6*) e o rs144457142 (c.1622T>C no gene *CRYL1*). Ambos não apresentaram nenhuma alteração quando utilizada a plataforma *OpenArray*TM, mesmo havendo indivíduos que apresentavam as deleções *del(GJB6-D13S1830)* ou *del(GJB6-D13S1854)*, validados através da técnica de *PCR-Multiplex* e gel de agarose 1,5% (Figura 57). Isso permite-nos dizer que estes ensaios acabaram sendo pouco informativos para a utilização no diagnóstico, uma vez que só será possível a genotipagem de indivíduos normais quando estes forem heterozigotos, confirmando a presença de 2 alelos e nenhuma das deleções.



Figura 57. Gel de agarose dos resultados do *PCR-Multiplex* para a análise das deleções no gene *GJB6*. L: Marcador de peso molecular *1Kb Plus DNA Ladder* (Invitrogen); **1**: Controle normal; **2**: Controle heterozigoto *del(GJB6-D13S1830)*; **3**: Controle homozigoto *del(GJB6-D13S1830)*; **4**: Controle heterozigoto para a *del(GJB6-D13S1854)*.

4.3.3. Análises das mutações no gene miR96-183

Utilizaram-se dois ensaios para detectar as alterações descritas por Mencía *et al.* (2009). Estes foram validados através do sequenciamento direto, sendo os fragmentos de 590 pb analisados através do pareamento da sequência de referência, retirada do *NCBI* (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/407053), com os *softwares CLC Sequence Viewer 6.5.1* e *Chromas Lite 2.01*. A única alteração detectada no gene *miR96-183* foi o polimorfismo rs73159662 em heterozigose (uma troca de uma guanina por uma adenina em um dos alelos do gene *mir96*) em dois indivíduos durante a validação (Figura 58).



Figura 58. Detecção do polimorfismo rs73159662 no gene *miR96-183* em heterozigose por sequenciamento direto. (a) Eletroferograma do sequenciamento visualizado pelo software *Chromas Lite[®] 2.01*, indicando a presença do polimorfismo pela seta vermelha. (b) Análise do alinhamento das sequências utilizando o *software CLC Sequence Viewer 6.5.1* (seta vermelha indica o *SNP*).

4.3.4. Análises das mutações no gene mitocondrial 12S rRNA (MT-RNR1)

4.3.4.1. Alteração m.1555A>G

A validação e comprovação dos seis indivíduos detectados pelo ensaio no *OpenArray*[™] deu-se através da técnica *RFLP-PCR* (*Restriction Fragment Length Polymorfism-Polimerase Chain Reaction*) utilizando a enzima *BsmA* I. O tamanho do fragmento amplificado foi de 2.060 pb. Durante a reação enzimática, indivíduos normais foram clivados em 3 fragmentos, um de 1.100 pb, outro de 516 pb e outro com 444 pb no gel de agarose 2%, enquanto os indivíduos mutantes foram clivados em apenas 2 fragmentos menores, um de 1.616 pb e outro com 444 pb (Figura 59).



Figura 59. Gel de agarose 2% contendo os fragmentos gerados após a restrição enzimática para análise da mutação m.1555A>G. L: Marcador de peso molecular *1Kb Plus DNA Ladder* (Invitrogen); **1:** Controle sem digerir; **2**: Controle sem a mutação; **3:** Controle com a mutação.

Para análise dos indivíduos com a alteração m.1555A>G, o tipo de gráfico utilizado foi "*Rara Fam Allele*", indicado para estudos de alterações mitocondriais utilizando o *software TaqMan*[®] *Genotyper* (Figura 60).



Figura 60. Detecção da alteração mitocondrial m.1555A>G utilizando o gráfico do tipo "Rare Fam Allele".

4.3.4.2. Alteração m.1494C>T

Nenhum indivíduo contendo esta alteração foi detectado tanto no ensaio de *OpenArray*[™] quanto na validação através da técnica de *RFLP-PCR* com a endonuclease *HpH* I. Nesta reação de validação, o fragmento amplificado apresentou 441 pb e ao realizar a restrição enzimática, todos indivíduos apresentaram o sítio de restrição, clivando a sequência em dois fragmentos menores, um de 71 pb e outro de 370 pb (Figura 61).



Figura 61. Gel de agarose 2% com os fragmentos gerados após a restrição enzimática para análise da **mutação m.1494C>T. L:** Marcador de peso molecular *1Kb Plus DNA Ladder* (Invitrogen); **1:** Controle sem digerir; **2:** Controle sem a mutação; **3:** Controle com a mutação.

4.3.5. Análises das mutações no gene mitocondrial MT-TS1

4.3.5.1. Alteração m.7445A>G

Dos 376 indivíduos analisados nas 4 placas de *OpenArray*[™], apenas um apresentou a mutação mitocondrial *m.7445A>G*. Esta foi validada pelo método de restrição enzimática, utilizando a enzima *XbA* I para digerir o fragmento de 406 pb. Nos casos dos indivíduos normais, visualizaram-se dois fragmentos, um de 209 pb e outro de 197 pb. Já nos casos mutantes, o fragmento ficou inalterado (Figura 62).



Figura 62. Visualização dos fragmentos gerados após a restrição enzimática para análise da mutação m.7445A>G em gel de agarose 2%. L: Marcador de peso molecular *1Kb Plus DNA Ladder* (Invitrogen); 1: Controle sem digerir; 2: Controle sem a mutação; 3: Controle com a mutação.

4.3.6. Análises das mutações no gene nuclear SLC26A4

As alterações p.G149R, p.Q413R e p.V609G foram analisadas por *OpenArray*[™] e validadas por sequenciamento direto. O ensaio p.Q413R apresentou resultado falso negativo, diferentemente dos ensaios p.G149R e p.V609G, que apresentaram resultados falso positivos. Para a alteração p.Q413R, o *OpenArray*[™] não conseguiu detectar o controle positivo para a mutação, previamente validado por sequenciamento direto, gerando um resultado falso negativo. Para o ensaio p.G149R foi detectado 3 indivíduos heterozigotos utilizando as placas de *OpenArray*[™], porém após a validação só foi constatado um indivíduo heterozigoto, o controle positivo utilizado. Já o ensaio *p.V609G*, genotipou 16 indivíduos heterozigotos (Figura 63) e outros 3 homozigotos mutantes, porém na validação, apenas 10 eram heterozigotos e 1 apresentava o alelo mutante em homozigose (falsos positivos).



Figura 63. Detecção da mutação p.V609G no gene *SLC26A4* em heterozigose por sequenciamento direto. (a) Eletroferograma do sequenciamento visualizado pelo software *Chromas Lite[®] 2.01*, indicando a presença da mutação pela seta vermelha. (b) Análise do alinhamento das sequências utilizando o *software CLC Sequence Viewer 6.5.1* (seta vermelha indica a alteração).

A visualização dos resultados dos ensaio p.V609G do gene *SLC26A4* utilizando o *software TaqMan[®] Genotyper* apresentou, em alguns dos experimentos, os três cluster, indicando indivíduos homozigotos com a alteração, heterozigotos e homozigotos normais (Figura 64).



Figura 64. Visualização do resultado do ensaio p.V609G utilizando o *software TaqMan[®] Genotyper*. Indivíduos homozigotos para a alteração são representados pelo *cluster* azul. O verdes representam os heterozigotos e os vermelhos os indivíduos que não apresentam a alteração em nenhum dos alelos.

4.3.7. Análises das mutações nos genes nucleares OTOF e TMC1

Nenhum indivíduo apresentou as alterações *p.Q829X*, no gene *OTOF* e *p.S647P*, no gene *TMC1*, quando verificados pela plataforma $TaqMan^{\ensuremath{\mathbb{P}}}$ *OpenArray*TM *Genotyping*. Estes resultados foram validados posteriormente por sequenciamento direto e confirmaram os resultados gerados pela genotipagem utilizando as placas de *OpenArray*TM.

4.4. Custo dos exames moleculares para a triagem da perda auditiva

Para o rastreamento das principais mutações associadas à perda auditiva na nossa população, o custo é de, aproximadamente, R\$ 1.000,00. Este rastreamento inclui o sequenciamento do gene *GJB2*, a triagem das deleções *del(GJB6-D13S1830)* e *del(GJB6-D13S1854)* no gene *GJB6* e a detecção da mutação *m.1555A>G* no gene *12S rRNA*. Ao todo, são analisadas mutações em 3 genes diferentes nesta triagem.

Por sua vez, o custo de um *set* de placas, contendo 10 placas de genotipagem da plataforma *TaqMan[®] OpenArray[™] Genotyping* é de, aproximadamente, \$6.000,00 (valor dado em dólares americanos devido a necessidade de importação do *set*). Este *set* é completo, contendo *kits* e reagentes para a realização completa de 10 placas de genotipagem. Assim, o

custo por placa, no *layout* 32 *SNP*s por 96 amostras é de \$600,00. Considerando que é possível realizar, por placa, 3.008 reações, cada uma delas tem custo de, aproximadamente, \$0,20. Logo, para realizar a genotipagem no *layout* selecionado, o custo é de \$6,40 por indivíduo analisado. Convertendo os valores de dólares americanos (USD) para reais (R\$) de acordo com o Banco Central do Brasil (www4.bcb.gov.br/pec/conversao/conversao.asp), na data 14 de dezembro de 2012, o valor aproximado seria de R\$14,00 para a detecção das 32 mutações por indivíduo. Ao todo, foram analisados mutações em 9 genes diferentes utilizando esta plataforma e *layout* de genotipagem.

Os valores citados acima são referentes apenas aos *kits* para a genotipagem. Os demais gastos, como valor dos equipamentos, gastos com mão-de-obra especializada, demais reagentes, etc. não foram inclusos nos cálculos.

DISCUSSÃO

5. DISCUSSÃO

O *layout* escolhido para a genotipagem utilizando a plataforma *TaqMan[®] OpenArray*[™] *Genotyping* foi montado contendo as 32 alterações. A empresa *Applied BioSystems* não conseguiu customizar apenas um dos ensaios, o da alteração m.827A>G no gene *12S rRNA*. Logo, a placa de genotipagem seguiu com apenas as 31 alterações. Destas, foram testadas as sondas dos ensaios para verificar se estes funcionariam. Algumas das alterações escolhidas apresentaram problemas, sendo eles falsos positivos, falsos negativos e ensaios não muito informativos.

Os resultados gerados pela genotipagem das placas de *OpenArray*[™] tiveram alto rendimento, apresentando uma média de 98,85%, porém estes resultados eram os resultados brutos, sem desconsiderar os ensaios que não foram devidamente genotipados. Um exemplo a ser desconsiderado do resultado bruto é o caso dos nove indivíduos que foram excluídos dos ensaios, por apresentarem baixa pureza e concentração. Estes apresentaram mutação em heterozigose em todos os 31 ensaios durante a realização do experimento. O *software TaqMan[®] Genotyper* considerou como genotipagens válidas, mas na verdade, este resultados foram excluídos, pois os indivíduos (2,39%), o rendimento médio das placas de *OpenArray*[™] ficou em 97,61%. Somando os resultados que falharam (42 falharam e 32 diferentes da validação), houve uma queda de mais 0,65% do rendimento, apresentando o rendimento médio final de 96,97%.

Verificou-se que o alto rendimento e reprodutibilidade da técnica está intimamente ligado a integridade (bandas íntegras em gel de agarose), pureza (A_{260/280} entre 1,7 e 2,0) e concentração das amostras (50ng/µL), onde todos devem respeitar os parâmetros ideias, garantindo as 250 cópias haplóides de DNA necessárias, de acordo com o corpo técnico da empresa, para o experimento. As amostras que não apresentaram, no mínimo, dois destes parâmetros, não puderam ser genotipadas. Este foi o caso das nove amostras que apresentaram mutações em heterozigose para todos ensaios, indicando a falha no experimento por parte da má qualidade da amostra.

Foram detectados oito ensaios com falsos positivos (Tabela 19), sendo eles: c.35delG, p.M34T, p.V37I, p.V153I, p.E129K, p.W24X no gene *GJB2* e os ensaios p.V609G e p.G149R no gene *SLC26A4*.

Ensaio	Resultados da placa de <i>OpenArray</i> [™]	Resultados das validações (sequenciamento direto)
c.35delG/N	40	34
c.35delG/c.35delG	34	31
p.M34T/N	14	11
p.V37I/N	4	3
p.V153I/N	2	1
p.E129K/N	2	1

3

3

16

3

2

1

10

1

Tabela 19. Ensaios que apresentaram falsos positivos utilizando a plataforma TaqMan[®] OpenArray[™] Genotyping.

Todos os ensaios citados acima foram validados pelo seguenciamento direto, técnica padrão e pré-estabelecida para análise nos genes GJB2 e SLC26A4 no Laboratório de Genética Molecular Humana do CBMEG/UNICAMP. Estes ensaios não foram excluídos do layout selecionado, mas precisarão, nas novas genotipagens, serem validados por outras técnicas, no caso, por seguenciamento direto. Sem dúvidas, haverá a redução de tempo e custo na detecção destas alterações, uma vez que, ao invés de seguenciar todos os pacientes para detectar das alterações, seguenciam-se apenas os que apresentaram as mutações inicialmente triadas nas placas de OpenArray[™], verificando quais são ou não mutantes. Em um exemplo hipotético para melhor entendimento, utilizando a plataforma OpenArray[™], foram selecionados 100 pacientes para a detecção da alteração c.35delG. Como resultado, houve a presença de 6 pacientes heterozigotos para a deleção de uma única base. Assim sendo, é feito o sequenciamento direto apenas destes seis indivíduos, para verificar se estes realmente são heterozigotos. Como o ensaio não apresentou resultados falso negativos, os demais 94 pacientes são normais para a c.35delG. Visualizando o exemplo acima, claramente o gasto e o tempo (requisitos importantes para a utilização de qualquer técnica para diagnóstico) para a triagem diminuirá, pois não será

p.W24X/N

p.V609G/N

p.G149R/N

p.V609G/p.V609G
necessário sequenciar todos os 100 pacientes atrás da deleção, sequenciando apenas os 6 que apresentaram a alteração nas placas de *OpenArray*[™].

No o caso dos ensaios que apresentaram falso negativos estão presentes as alterações p.V95M no gene *GJB2* e p.Q413R no gene *SLC26A4*. A primeira delas não apresentou, utilizando a placa de *OpenArray*[™], a alteração em heterozigose, resultado presente no sequenciamento. Porém, foram detectadas dois indivíduos heterozigotos compostos para a alteração p.V37I e p.V95M que tiveram seus resultados validados pelo sequenciamento direto. Este último resultado não exclui o caso do falso negativo, logo o ensaio deverá ser desenhado de alguma outra forma pela empresa ou será excluído do *layout* escolhido, sendo substituída por outra a ser selecionada. Considerando o caso da alteração p.Q413R, nem o controle para a mutação foi detectado. O *cluster* do controle positivo ficou junto com os *clusters* dos indivíduos normais, indicando que o ensaio não funcionou para a detecção desta alteração. Sendo assim, haverá o contato com a empresa responsável para verificar as possibilidades de alteração das sondas e *primers* deste ensaio, visando a otimização na triagem desta alteração. No insucesso desta padronização, a mesma será excluída do *layout* selecionado e substituída por outra a ser escolhida seguindo os mesmos parâmetros de escolhas utilizados para a escolha dos ensaios.

Tantos os resultados falsos positivos quanto os falsos negativos só estiveram presentes em indivíduos que não apresentavam nenhuma outra alteração. Nos indivíduos que apresentavam outras alterações concomitantemente aos ensaios que apresentaram falsos resultados, a genotipagem foi realizada de forma correta pelo *OpenArray*[™], levando em consideração o nível de pureza (A_{260/280} entre 1,8 e 2,0) e concentração correta. Em busca de explicações para os resultados discrepantes citados acima, e-mails foram enviados para o suporte da empresa Applie BioSystems solicitando soluções para otimização dos ensaios, porém nenhuma resposta esclarescedora para tais resultados foi obtida.

Quanto aos ensaios rs11843171 (c.6013G>T no gene *GJB6*) e rs144457142 (c.1622T>C no gene *CRYL1*) apresentaram-se pouco informativos. Ambos *SNP*s foram selecionados para detectar as deleções *del(GJB6-D13S1830)* ou *del(GJB6-D13S1854)* no gene *GJB6*. Porém estes ensaios não conseguiram detectar os 4 casos de deleção selecionados [3 casos da deleção del(*GJB6*-D13S1830) e 1 da del(*GJB6*-D13S1854)], podendo assim ser considerados falso negativos. Porém, estes *SNP*s foram considerados

pouco informativos pois a única suposição que poderia ser levantada com este ensaio seria com a presença de um indivíduo heterozigoto para um destes *SNP*s, indicando que as 2 sondas diferentes anelaram no local onde estariam as deleções. Logo, o indivíduo seria normal, não apresentando nenhuma das grandes deleções no gene *GJB6*. No caso de indivíduos heterozigotos para algumas das deleções, o *cluster* iria estar localizado de acordo com a sonda que anelou no alelo que não teria a deleção, considerando o indivíduos homozigoto normal ou mutante, não sendo possível distiguir heterozigotos dos indivíduos normais. Já os casos de indivíduos homozigotos para as deleções para as deleções não foram testados, mas pelo princípio da técnica, nenhuma sonda iria anelar e o resultado na placa de *OpenArray*[™] seria "*No amplification*", indicando a não amplificação do fragmento, que poderia ser confirmada por *PCR multiplex*.

O custo médio para o rastreamento das principais mutações é de R\$1.000,00. Este envolve o sequenciamento do gene GJB2, a detecção da mutação mitocondrial m.1555A>G no gene 12S rRNA e das deleções del(GJB6-D13S1830) e del(GJB6-D13S1854) no gene GJB6. Ao todo, são verificadas alterações em três genes diferentes. Utilizando a plataforma *TaqMan[®] OpenArray[™] Genotyping* e o layout escolhido de 32 ensaios por 96 indivíduos, foi possível analizar alterações em nove genes diferentes simultaneamente. Considerando que o set de placas de OpenArray[™] neste layout só é vendido no conjunto de 10 placas ao custo de, aproximadamente, \$6.000,00 (USD - dólares americanos), cada placa tem o valor de \$600,00 (já incluindo os reagentes e acessórios para a montagem de um *slide* completo). Assim, neste *layout*, cada alteração teria o custo de, aproximadamente, \$0,20. Para avaliar um indivíduo, o custo foi de R\$6,40. Pelo fato das placas serem customizadas nos Estados Unidos da América, elas tiveram que ser importadas e o custo delas não teve adição de impostos, uma vez que estas eram destinadas à pesquisa. Convertendo os valores de dólares americanos (USD) para reais (R\$) de acordo com o Banco Central do Brasil (http://www4.bcb.gov.br/pec/conversao/conversao.asp), na data de 14 de dezembro de 2012, o valor aproximado seria de R\$14,00 para a detecção das 32 mutações por indivíduo. Este valor desconsidera os demais gastos, como mão-de-obra, eletricidade, demais reagentes, gastos com outros kits, como o utilizado para quantificação, plásticos utilizados e o custo das plataformas. Estima-se que, com a adição destes gastos, o custo individual máximo para a genotipagem de 32 alterações seria R\$500,00.

A utilização da plataforma *high-throughput TaqMan[®] OpenArray*[™] *Genotyping* para diagnósticos seria de grande valia para implementação da triagem inicial da perda auditiva de origem genética, pois nela estariam algumas das principais alterações a serem avaliadas, gerando um número superior de resultados (simultâneos) em um tempo extremamente inferior quando comparado a mesma triagem utilizando as técnicas convencionais e com custos inferiores. Isto torna a plataforma uma ótima ferramenta para diagnósticos, uma vez que, após padronizada, a acurácia da técnica é superior a 95%, tendendo a aumentar, pois haverá a troca dos ensaios que não funcionaram corretamente. Logicamente que, devido a grande heterogeneidade genética da perda auditiva, o ideal seria utilizar um *layout* com um número superior de ensaios (256 ensaios por 12 pacientes), porém os gastos com este *layout* passariam de \$6,40 para, aproximadamente, \$100,00. Mesmo assim, a sua utilização ainda continuaria sendo vantajosa, uma vez que a triagem simultânea das 256 alterações iria apresentar um número superior de resultados, em tempo e custo inferior às técnicas convencionais.

Como reportado na literatura, a perda auditiva é clinicamente e geneticamente heterogênea. Suas causas podem ser divididas em ambientais e genéticas. Esta última representa mais de 60% dos casos de perda auditiva congênita. Mais de 103 genes estão relacionados a esta causa e a estimativa é que existam mais de 300 genes relacionados ao complexo processo da audição (Nance, 2003). O principal gene relacionado à perda auditiva neurossensorial é o GJB2, que codifica a conexina 26, tendo mais de 302 alterações relacionadas a este gene segundo o site Human Gene Mutation Database (http://www.hgmd.cf.ac.uk/ac/index.php, 2012). A principal mutação relacionada à perda auditiva é a c.35delG, a deleção de uma guanina na posição 35 do gene GJB2, sendo responsável por mais de 70% de todos os casos de perda auditiva com padrão de herança autossômica recessiva. No estudo, foi detectada a prevalência dos casos de c.35delG, seja em heterozigose, em homozigose ou em associação com outras alterações relacionadas a perda auditiva, comprovando a prevalência. Com tal heterogeneidade, a busca por ferramentas e tecnologias que consigam fazer o screening das principais mutações da perda auditiva na nossa população está se intensificando. A utilização das plataformas highthroughput são os principais soluções para as triagens simultâneas, pois conseguem em um tempo muito inferior, quando comparada às técnicas moleculares convencionais utilizadas,

fazer a varredura de um número superior de alterações, podendo variar de uma alteração até milhares de alterações com as plataformas *Illumina* e *Affymetrix*.

Logicamente que algumas plataformas apresentam o workflow mais demorado e/ou mais complexo, o que não viabiliza a técnica para diagnósticos. Sendo assim, cabe conciliar o poder da tecnologia high-throughput com a simplicidade, alta reprodutibilidade e acurária, o que foi notado na plataforma $TagMan^{\otimes}$ OpenArrayTM Genotyping. Embora esta tenha apresentado alguns ensaios falso negativos e positivos durante a validação, ela apresentou aproximadamente 97% de acurácia, representando 11.303 reações com resultados confirmados por outra técnica. Alguns dos pontos importantes: as placas já apresentam os ensaios em seus nano-poços, necessitando apenas a adição da amostra de DNA devidamente quantificada; o manuseio e distribuição das amostras na placa de OpenArrav[™] é realizada por um auto-pipetador (AccuFill), o que diminui erros de precisão e pipetagem; é possivel realizar, de acordo com o workflow da empresa, aproximadamente 99 mil genotipagens. Logicamente que esta escala não é recomendada, pois há o risco de evaporação e troca de amostras, etc. Outro ponto importante para o uso da plataforma é em relação ao custo, que quando comparada a técnicas convencionais de genotipagem (que permitem a realização de um ensaio por vez), apresenta custo relativamente inferior, tanto de reagentes quanto de mão-de-obra. A placa tem o custo de aproximadamente 600 dólares americanos, porém este valor é dividido por 94, correspondente ao número de indivíduos, tornando o custo da genotipagem, por indivíduo, de \$6,40.

O ideal para o rastreamento das mutações envolvidas, como dito acima, seria a utilização de uma plataforma que consiga realizar a genotipagem de um número maior de indivíduos e alterações, porém os custos variariam. Outros pontos a serem levantados seriam a necessidade de um estudo na nossa população para se ter conhecimento das principais mutações relacionadas encontradas nesta e o que cada alteração representa, fenotipicamente falando, assim como estudos de associação.

Cabe lembrar que, resultados negativos no ensaios selecionados não excluem o pacientes de ter sua causa de origem genética. Isto pois os avanços na pesquisa de novos genes e alterações relacionadas a perda auditiva são constantes, fazendo a descoberta de novas alterações que possam estar relacionadas a perda auditiva a cada dia.

CONCLUSÃO

123

✓ A plataforma *TaqMan[®] OpenArray[™] Genotyping* se mostrou muito eficaz para a genotipagem das amostras relacionadas à perda auditiva, tendo acurácia de 96,97%, o equivalente a 11.303 das 11.656 reações.

✓ O tempo necessário para fazer o *screening* das 31 mutações foi muito inferior quando comparado a detecção das mesmas pelas técnicas convencionais.

✓ As placas de OpenArray[™] se mostraram ótimas ferramentas para diagnósticos e fácil reprodutibilidade, uma vez que é necessário apenas a adição das amostras na placa.
 Porém é necessária a escolha correta e padronização dos ensaios.

✓ O custo para a verificação das mutações é inferior, tornando a plataforma e o *layout* uma aplicação possível para a área de diagnósticos não só da perda auditiva, mas de outras patologias que apresentem origem ou fatores genéticos.

✓ O *layout* escolhido apresentou dois ensaios falsos negativos (p.V95M no gene GJB2 e p.Q413R no gene SLC26A4), sendo estes descartados da utilização com diagnóstico. Soluções foram buscadas para otimização destes ensaios a empresa, porém nenhuma resposta foi obtida.

✓ O layout utilizado apresentou oito ensaios falsos positivos, sendo eles: c.35delG, p.M34T, p.V37I, p.V153I, p.E129K, p.W24X no gene *GJB2* e os ensaios p.V609G e p.G149R no gene *SLC26A4*. Estes não foram descartados por serem ensaios fundamentais para a triagem, porém será necessário a utilização de outra técnica para validar apenas os indivíduos que apresentaram alterações para estes ensaios. ✓ Os ensaios rs11843171 (c.6013G>T no gene *GJB6*) e o rs144457142
 (c.1622T>C no gene *CRYL1*), selecionados para estudar as deleções *del(GJB6-D13S1830*)
 e *del(GJB6-D13S1854*) do gene *GJB6*, apresentaram-se pouco informativos. A única informação proveniente do ensaio seria a presença de indivíduos normais caso estes sejam heterozigotos para algum dos ensaios. A presença dos dois alelos diferentes (normal e mutante) indicaria a não presença de qualquer uma das grandes deleções do gene *GJB6*.
 Porém, nenhum indivíduo heterozigoto para rs11843171 ou rs144457142 foi detectado.

✓ Foi confirmada a alta prevalência de mutações no gene *GJB2*, especialmente da mutação c.35delG.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abdelhak S, Kalatzis V, Heilig R, Compain S, Samson D, Vincent C, Weil D, Cruaud C, Sahly I, Leibovici M, Bitner-Glindzicz M, Francis M, Lacombe D, Vigneron J, Charachon R, Boven K, Bedbeder P, Van Regemorter N, Weissenbach J, Petit C. A human homologue of the Drosophila eyes absent gene underlies branchio-oto-renal (BOR) syndrome and identifies a novel gene family. *Nature Genetics*, v. 15, n. 2, p. 157-64, 1997.
- Abe S, Katagiri T, Saito-Hisaminato A, Usami S, Inoue Y, Tsunoda T, Nakamura Y. Identification of CRYM as a candidate responsible for nonsyndromic deafness, through cDNA microarray analysis of human cochlear and vestibular tissues. *American Journal of Human Genetics*, v. 72, n. 1, p. 73-82, 2003.
- Abreu-Silva RS; Lezirovitz K; Braga MC; Spinelli M; Pirana S; Della-Rosa VA; Otto PA; Mingroni-Netto RC. Prevalence of the A1555G (*12S rRNA*) and tRNASer(UCN) mitochondrial mutations in hearing impaired Brazilian patients. *Brazilian Journal of Medical Biolgical Research*, v. 39, n. 2, p. 219-226, 2006.
- Ahmad J, Khan SN, Khan SY, Ramzan K, Riazuddin S, Ahmed ZM, Wilcox ER, Friedman TB, Riazuddin S. DFNB48, a new nonsyndromic recessive deafness locus, maps to chromosome 15q23-q25.1. *Human Genetics*, v. 116, n. 5, p. 407-12, 2005.
- Ahmad NN, Ala-Kokko L, Knowlton RG, Jimenez SA, Weaver EJ, Maguire JI, Tasman W, Prockop DJ. Stop codon in the procollagen II gene (*COL2A1*) in a family with the Stickler syndrome (arthro-ophthalmopathy). *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 88, n. 15, p. 6624-7, 1991.
- Ahmed ZM, Masmoudi S, Kalay E, Belyantseva IA, Mosrati MA, Collin RW, Riazuddin S, Hmani-Aifa M, Venselaar H, Kawar MN, Tlili A, van der Zwaag B, Khan SY, Ayadi L, Riazuddin SA, Morell RJ, Griffith AJ, Charfedine I, Caylan R, Oostrik J, Karaguzel A, Ghorbel A, Riazuddin S, Friedman TB, Ayadi H, Kremer H. Mutations of LRTOMT, a fusion gene with alternative reading frames, cause nonsyndromic deafness in humans. *Nature Genetics*, v. 40, n. 11, p. 1335-40, 2008.
- Ahmed ZM, Morell RJ, Riazuddin S, Gropman A, Shaukat S, Ahmad MM, Mohiddin SA, Fananapazir L, Caruso RC, Husnain T, Khan SN, Riazuddin S, Griffith AJ, Friedman TB,

Wilcox ER. Mutations of MYO6 are associated with recessive deafness, DFNB37. *American Journal of Human Genetics*, v. 72, n. 5, p. 1315-22, 2003.

- Ahmed ZM, Riazuddin S, Ahmad J, Bernstein SL, Guo Y, Sabar MF, Sieving P, Riazuddin S, Griffith AJ, Friedman TB, Belyantseva IA, Wilcox ER. PCDH15 is expressed in the neurosensory epithelium of the eye and ear and mutant alleles are responsible for both USH1F and DFNB23. *Human Molecular Genetics*, v. 12, n. 24, p. 3215-23, 2003.
- Ahmed ZM, Riazuddin S, Bernstein SL, Ahmed Z, Khan S, Griffith AJ, Morell RJ, Friedman TB, Riazuddin S, Wilcox ER. Mutations of the protocadherin gene *PCDH15* cause Usher syndrome type 1F. *American Journal of Human Genetics*, v. 69, n. 1, p. 25-34, 2001.
- Ahmed ZM, Riazuddin S, Khan SN, Friedman PL, Riazuddin S, Friedman TB. USH1H, a novel locus for type I Usher syndrome, maps to chromosome 15q22-23. *Clinical Genetics*, v. 75, n. 1, p. 86-91, 2009.
- Ahmed ZM, Smith TN, Riazuddin S, Makishima T, Ghosh M, Bokhari S, Menon PS, Deshmukh D, Griffith AJ, Riazuddin S, Friedman TB, Wilcox ER. Nonsyndromic recessive deafness DFNB18 and Usher syndrome type IC are allelic mutations of USHIC. Human Genetics, v. 110, n. 6, p. 527-31, 2002.
- Ahmed ZM, Yousaf R, Lee BC, Khan SN, Lee S, Lee K, Husnain T, Rehman AU, Bonneux S, Ansar M, Ahmad W, Leal SM, Gladyshev VN, Belyantseva IA, Van Camp G, Riazuddin S, Friedman TB, Riazuddin S. Functional null mutations of *MSRB3* encoding methionine sulfoxide reductase are associated with human deafness DFNB74. *American Journal of Human Genetics*, v. 88, n. 1, p. 19-29, 2011.
- Ain Q, Nazli S, Riazuddin S, Jaleel AU, Riazuddin SA, Zafar AU, Khan SN, Husnain T, Griffith AJ, Ahmed ZM, Friedman TB, Riazuddin S. The autosomal recessive nonsyndromic deafness locus DFNB72 is located on chromosome 19p13.3. *Human Genetics*, v. 122, n. 5, p. 445-50, 2007.
- Alagramam KN, Yuan H, Kuehn MH, Murcia CL, Wayne S, Srisailpathy CR, Lowry RB, Knaus R, Van Laer L, Bernier FP, Schwartz S, Lee C, Morton CC, Mullins RF, Ramesh A, Van Camp G, Hageman GS, Woychik RP, Smith RJ. Mutations in the novel protocadherin

PCDH15 cause Usher syndrome type 1F. *Human Molecular Genetics*, v. 10, n. 16, p. 1709-18, 2001.

- Alberts B, Bray D, Lewis J, Raff M, Roberts K, Watson JD. *Molecular biology of the cell.* Barcelona: Ediciones Omega S.A., 1989.
- Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. *Molecular Biology of the Cell*. New York: Garland Science, 2002.
- Ali G, Santos RL, John P, Wambangco MA, Lee K, Ahmad W, Leal S. The mapping of DFNB62, a new locus for autosomal recessive non-syndromic hearing impairment, to chromosome 12p13.2-p11.23. *Clinical Genetics*, v. 69, n. 5, p. 429-33, 2006.
- Angeli S, Lin X, Liu XZ. Genetics of hearing and deafness. *Anatomical Record*, v. 295, n. 11, p. 1812-29, 2012.
- Ansar M, Chahrour MH, Amin Ud Din M, Arshad M, Haque S, Pham TL, Yan K, Ahmad W, Leal SM. DFNB44, a novel autosomal recessive non-syndromic hearing impairment locus, maps to chromosome 7p14.1-q11.22. *Human Hereditary*, v. 57, n. 4, p. 195-9, 2004.
- Ansar M, Din MA, Arshad M, Sohail M, Faiyaz-UI-Haque M, Haque S, Ahmad W, Leal SM. A novel autosomal recessive non-syndromic deafness locus (DFNB35) maps to 14q24.1-14q24.3 in large consanguineous kindred from Pakistan. *European Journal of Human Genetics,* v. 11, n. 1, p. 77-80, 2003.
- Ansar M, Ramzan M, Pham TL, Yan K, Jamal SM, Haque S, Ahmad W, Leal SM. Localization of a novel autosomal recessive non-syndromic hearing impairment locus (DFNB38) to 6q26-q27 in a consanguineous kindred from Pakistan. *Human Hereditary*, v. 55, n. 1, p. 71-4, 2003.

Applied BioSystems. TaqMan® OpenArray™ Genotyping System – User Guide, 2011.

Ardle BM, Bitner-Glindzicz M. Investigation of the child with permanent hearing impairment. Arch Dis Child Educ Pract Ed, v. 95, p. 14-23, 2010.

- Arunima Chatterjee, Rajeev Jalvi, Nishtha Pandey, R. Rangasayee, Anuranjan Anand. A novel locus DFNA59 for autosomal dominant nonsyndromic hearing loss maps at chromosome 11p14.2–q12.3. *Human Genetics*, v. 124, n. 6, p. 669-675, 2009.
- Aslam M, Wajid M, Chahrour MH, Ansar M, Haque S, Pham TL, Santos RP, Yan K, Ahmad W, Leal SM. A novel autosomal recessive nonsyndromic hearing impairment locus (DFNB42) maps to chromosome 3q13.31-q22.3. *American Journal of Medical Genetics*, v. 133A, n. 1, p. 18-22, 2005.
- Attié T, Till M, Pelet A, Amiel J, Edery P, Boutrand L, Munnich A, Lyonnet S. Mutation of the endothelin-receptor B gene in Waardenburg-Hirschsprung disease. *Human Molecular Genetics*, v. 4, n. 12, p. 2407-9, 1995.
- Bacino C, Prezant TR, Bu X, Fournier P, Fischel-Ghodsian N. Susceptibility mutations in the mitochondrial small ribosomal RNA gene in aminoglycoside induced deafness. *Pharmacogenetics*, v. 5, n. 3, p. 165-172, 1995.
- Baker S, Booth C, Fillman C, Shapiro M, Blair MP, Hyland JC, Ala-Kokko L. A loss of function mutation in the COL9A2 gene causes autosomal recessive Stickler syndrome. American Journal of Medical Genetics, v. 155A, n. 7, p. 1668-72, 2011.
- Bamiou DE, Phelps P, Sirimanna T. Temporal bone computed tomography findings in bilateral sensorineural hearing loss. *Archives of Disease in Childhood*, v. 82, n. 3, p. 257–260, 2000.
- Barker DF, Hostikka SL, Zhou J, Chow LT, Oliphant AR, Gerken SC, Gregory MC, Skolnick MH, Atkin CL, Tryggvason K. Identification of mutations in the *COL4A5* collagen gene in Alport syndrome. *Science*, v. 248, n. 4960, p. 1224-7, 1990.
- Berger W, Meindl A, van de Pol TJ, Cremers FP, Ropers HH, Döerner C, Monaco A, Bergen AA, Lebo R, Warburg M. Isolation of a candidate gene for Norrie disease by positional cloning. *Nature Genetics*, v. 1, n. 3, p. 199-203, 1992.
- Bespalova IN, Van Camp G, Bom SJ, Brown DJ, Cryns K, DeWan AT, Erson AE, Flothmann K, Kunst HP, Kurnool P, Sivakumaran TA, Cremers CW, Leal SM, Burmeister M, Lesperance MM. Mutations in the Wolfram syndrome 1 gene (*WFS1*) are a common

cause of low frequency sensorineural hearing loss. *Human Molecular Genetics*, v. 10, n. 22, p. 2501-8, 2001.

- Bhatti A, Lee K, McDonald ML, Hassan MJ, Gutala R, Ansar M, Ahmad W, Leal SM. Mapping of a new autosomal recessive non-syndromic hearing impairment locus (DFNB45) to chromosome 1q43-q44. *Clinical Genetics*, v. 73, n. 4, p. 395-8, 2008.
- Bitner-Glindzicz M. Hereditary deafness and phenotyping in humans. *British Medical Bulletin*, v. 63, p. 73-94, 2002.
- Bitner-Glindzicz M, Lindley KJ, Rutland P, Blaydon D, Smith VV, Milla PJ, Hussain K, Furth-Lavi J, Cosgrove KE, Shepherd RM, Barnes PD, O'Brien RE, Farndon PA, Sowden J, Liu XZ, Scanlan MJ, Malcolm S, Dunne MJ, Aynsley-Green A, Glaser B. A recessive contiguous gene deletion causing infantile hyperinsulinism, enteropathy and deafness identifies the Usher type 1C gene. *Nature Genetics*, v. 26, n. 1, p. 56-60, 2000.
- Blanton SH, Liang CY, Cai MW, Pandya A, Du LL, Landa B, Mummalanni S, Li KS, Chen ZY, Qin XN, Liu YF, Balkany T, Nance WE, Liu XZ. A novel locus for autosomal dominant non-syndromic deafness (DFNA41) maps to chromosome 12q24-qter. *Journal of Medical Genetics*, v. 39, n. 8, p. 567-70, 2002.
- Bogar M, Bento RF, Tsuji RK. Estudo anatômico da cóclea para confecção de instrumental para a cirurgia de implante coclear com 2 feixes de eletrodos em cócleas ossificadas. *Revista Brasileira de Otorrinolaringologia*, v. 74, n. 2, p. 194-199, 2008.
- Bolz H, von Brederlow B, Ramírez A, Bryda EC, Kutsche K, Nothwang HG, Seeliger M, del C-Salcedó Cabrera M, Vila MC, Molina OP, Gal A, Kubisch C. Mutation of *CDH23*, encoding a new member of the cadherin gene family, causes Usher syndrome type 1D. *Nature Genetics*, v. 27, n. 1, p. 108-12, 2001.
- Bonné-Tamir B, DeStefano AL, Briggs CE, Adair R, Franklyn B, Weiss S, Korostishevsky M, Frydman M, Baldwin CT, Farrer LA. Linkage of congenital recessive deafness (gene DFNB10) to chromosome 21q22.3. *American Journal of Human Genetics*, v. 58, n. 6, p. 1254-9, 1996.
- Bönsch D, Scheer P, Neumann C, Lang-Roth R, Seifert E, Storch P, Weiller C, Lamprecht-Dinnesen A, Deufel T. A novel locus for autosomal dominant, non-syndromic hearing

impairment (DFNA18) maps to chromosome 3q22 immediately adjacent to the DM2 *locus. European Journal of Human Genetics*, v. 9, n. 3, p. 165-70, 2001.

- Bönsch D, Schmidt CM, Scheer P, Bohlender J, Neumann C, Am Zehnhoff-Dinnesen A, Deufel T. A new gene locus for an autosomal-dominant non-syndromic hearing impairment (DFNA 33) is situated on chromosome 13q34-qter. *HNO*, v. 57, n. 4, p. 371-6, 2009.
- Borck G, Ur Rehman A, Lee K, Pogoda HM, Kakar N, von Ameln S, Grillet N, Hildebrand MS, Ahmed ZM, Nürnberg G, Ansar M, Basit S, Javed Q, Morell RJ, Nasreen N, Shearer AE, Ahmad A, Kahrizi K, Shaikh RS, Ali RA, Khan SN, Goebel I, Meyer NC, Kimberling WJ, Webster JA, Stephan DA, Schiller MR, Bahlo M, Najmabadi H, Gillespie PG, Nürnberg P, Wollnik B, Riazuddin S, Smith RJ, Ahmad W, Müller U, Hammerschmidt M, Friedman TB, Riazuddin S, Leal SM, Ahmad J, Kubisch C. Loss-of-function mutations of ILDR1 cause autosomal-recessive hearing impairment DFNB42. *American Journal of Human Genetics*, v. 88, n. 2, p. 27-37, 2011.
- Bork JM, Peters LM, Riazuddin S, Bernstein SL, Ahmed ZM, Ness SL, Polomeno R, Ramesh A, Schloss M, Srisailpathy CR, Wayne S, Bellman S, Desmukh D, Ahmed Z, Khan SN, Kaloustian VM, Li XC, Lalwani A, Riazuddin S, Bitner-Glindzicz M, Nance WE, Liu XZ, Wistow G, Smith RJ, Griffith AJ, Wilcox ER, Friedman TB, Morell RJ. Usher syndrome 1D and nonsyndromic autosomal recessive deafness DFNB12 are caused by allelic mutations of the novel cadherin-like gene *CDH23*. *American Journal of Human Genetics*, v. 68, n. 1, p. 26-37, 2001.
- Brianti MT. Estudo da frequencia de mutações mitocondriais em brasileiros portadores de deficiência auditiva neurossensorial não-sindrômica de etiologia não esclarecida. Campinas, SP: [s.n.], 2003.
- Brown MR, Tomek MS, Van Laer L, Smith S, Kenyon JB, Van Camp G, Smith RJ. A novel locus for autosomal dominant nonsyndromic hearing loss, DFNA13, maps to chromosome 6p. *American Journal of Human Genetics*, v. 61, n. 4, p. 924-7, 1997.
- Brownstein Z, Friedman LM, Shahin H, Oron-Karni V, Kol N, Abu Rayyan A, Parzefall T, Lev D, Shalev S, Frydman M, Davidov B, Shohat M, Rahile M, Lieberman S, Levy-Lahad E, Lee MK, Shomron N, King MC, Walsh T, Kanaan M, Avraham KB. Targeted genomic

capture and massively parallel sequencing to identify genes for hereditary hearing loss in Middle Eastern families. *Genome Biology*, v. 12, n. 9, p. 89, 2011.

- Casanova JP. Manual de Fonoaudiologia. Porto Alegre: Editora Artes Médicas, 2ª Edição, 1997.
- Carvalho MFP, Ribeiro FAQ. As deficiências auditivas relacionadas às alterações do DNA mitocondrial. *Revista Brasileira de Otorrinolaringologia*, v. 68, n. 2, p. 268-275, 2002.
- Chaïb H, Kaplan J, Gerber S, Vincent C, Ayadi H, Slim R, Munnich A, Weissenbach J, Petit C. A newly identified *locus* for Usher syndrome type I, *USH1E*, maps to chromosome 21q21. *Human Molecular Genetics*, v. 6, n. 1, p. 27-31, 1997.
- Chaïb H, Lina-Granade G, Guilford P, Plauchu H, Levilliers J, Morgon A, Petit C. A gene responsible for a dominant form of neurosensory non-syndromic deafness maps to the NSRD1 recessive deafness gene interval. *Human Molecular Genetics*, v.3, n. 12, p. 2219-22, 1994.
- Chaïb H, Place C, Salem N, Chardenoux S, Vincent C, Weissenbach J, El-Zir E, Loiselet J, Petit C. A gene responsible for a sensorineural nonsyndromic recessive deafness maps to chromosome 2p22-23. *Human Molecular Genetics*, v. 5, n. 1, p. 155-8, 1996.
- Chaib H, Place C, Salem N, Dodé C, Chardenoux S, Weissenbach J, el Zir E, Loiselet J, Petit
 C. Mapping of DFNB12, a gene for a non-syndromal autosomal recessive deafness, to chromosome 10q21-22. *Human Molecular Genetics*, v. 5, n. 7, p. 1061-4, 1996.
- Charizopoulou N, Lelli A, Schraders M, Ray K, Hildebrand MS, Ramesh A, Srisailapathy CR, Oostrik J, Admiraal RJ, Neely HR, Latoche JR, Smith RJ, Northup JK, Kremer H, Holt JR, Noben-Trauth K. *Gipc3* mutations associated with audiogenic seizures and sensorineural hearing loss in mouse and human. *Nature Communications*, v. 15, n. 2, p. 201, 2011.
- Chen A, Wayne S, Bell A, Ramesh A, Srisailapathy CR, Scott DA, Sheffield VC, Van Hauwe P, Zbar RI, Ashley J, Lovett M, Van Camp G, Smith RJ. New gene for autosomal recessive non-syndromic hearing loss maps to either chromosome 3q or 19p. *American Journal of Medical Genetics*, v. 71, n. 4, p. 467-71, 1997.

- Chen AH, Ni L, Fukushima K, Marietta J, O'Neill M, Coucke P, Willems P, Smith RJ. Linkage of a gene for dominant non-syndromic deafness to chromosome 19. *Human Molecular Genetics*, v. 4, n. 6, p. 1073-6, 1995.
- Chen W, Kahrizi K, Meyer NC, Riazalhosseini Y, Van Camp G, Najmabadi H, Smith RJ. Mutation of *COL11A2* causes autosomal recessive non-syndromic hearing loss at the DFNB53 locus. *Journal of Medical Genetics*, v. 42, n.10, p. e61, 2005.
- Chen ZY, Hendriks RW, Jobling MA, Powell JF, Breakefield XO, Sims KB, Craig IW. Isolation and characterization of a candidate gene for Norrie disease. *Nature Genetics*, v. 1, n. 3, p. 204-8, 1992.
- Cheng J, Zhu Y, He S, Lu Y, Chen J, Han B, Petrillo M, Wrzeszczynski KO, Yang S, Dai P, Zhai S, Han D, Zhang MQ, Li W, Liu X, Li H, Chen ZY, Yuan H.Functional mutation of SMAC/DIABLO, encoding a mitochondrial proapoptotic protein, causes human progressive hearing loss DFNA64. *American Journal of Human Genetics*, v. 89, n. 1, p. 56-66, 2011.
- Chishti MS, Lee K, McDonald ML, Hassan MJ, Ansar M, Ahmad W, Leal SM. Novel autosomal recessive non-syndromic hearing impairment locus (DFNB71) maps to chromosome 8p22-21.3. *Journal of Human Genetics*, v. 54, n. 3, p. 141-4, 2009.
- Collin RW, Kalay E, Tariq M, Peters T, van der Zwaag B, Venselaar H, Oostrik J, Lee K, Ahmed ZM, Caylan R, Li Y, Spierenburg HA, Eyupoglu E, Heister A, Riazuddin S, Bahat E, Ansar M, Arslan S, Wollnik B, Brunner HG, Cremers CW, Karaguzel A, Ahmad W, Cremers FP, Vriend G, Friedman TB, Riazuddin S, Leal SM, Kremer H. Mutations of ESRRB encoding estrogen-related receptor beta cause autosomal-recessive nonsyndromic hearing impairment DFNB35. *American Journal of Human Genetics*, v. 82, n. 1, p. 125-38, 2008.
- Connors BW, Long MA. Electrical synapses in the mammalian brain. *Annual Review of Neuroscience*, v. 27, p. 393-418, 2004.
- Cooper DN, Ball EV, Stenson PD, Phillips AD, Shaw K, Mort ME. *Human Gene Mutation Database*. Disponível em: <www.hgmd.org>. Acesso em: novembro de 2012.

- Coucke P, Van Camp G, Djoyodiharjo B, Smith SD, Frants RR, Padberg GW, Darby JK, Huizing EH, Cremers CW, Kimberling WJ, et al. Linkage of autosomal dominant hearing loss to the short arm of chromosome 1 in two families. *New England Journal of Medicine*, v. 331, n. 7, p. 425-31, 1994.
- Crimi M, Galbiati S, Perini MP, Bordoni A, Malferrari G, Sciacco M, Biunno I, Strazzer S, Moggio M, Bresolin N, Comi GP. A mitochondrial tRNA(His) gene mutation causing pigmentary retinopathy and neurosensorial deafness. *Neurology*, v. 60, n. 7, p. 1200-1203, 2003.
- Cryns K, Van Camp G. Deafness genes and their diagnostic applications. *Audiol Neurootol Journal*, v. 9, n. 1, p. 2-22, 2004.
- D'Adamo P, Donaudy F, D'Eustacchio A, Di Iorio E, Melchionda S, Gasparini P. A new locus (DFNA47) for autosomal dominant non-syndromic inherited hearing loss maps to 9p21-22 in a large Italian family. *European Journal of Human Genetics*, v. 11, n. 2, p. 121-4, 2003.
- D'Adamo P, Pinna M, Capobianco S, Cesarani A, D'Eustacchio A, Fogu P, Carella M, Seri M, Gasparini P. A novel autosomal dominant non-syndromic deafness locus (DFNA48) maps to 12q13-q14 in a large Italian family. *Human Genetics*, v. 112, n. 3, p. 319-20, 2003.
- Dahl G, Werner R, Levine E, Rabadan-Diehl C. Mutational analysis of gap junction formation. *Biophysics Journal*, v. 62, p. 172-180, 1992.
- D'Andrea P, Veronesi V, Bicego M, Melchionda S, Zelante L, Di Iorio E, et al. Hearing loss: frequency and functional studies of the most common connexin 26 alleles. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, v. 296, p. 685-691, 2002.
- de Kok YJ, van der Maarel SM, Bitner-Glindzicz M, Huber I, Monaco AP, Malcolm S, Pembrey ME, Ropers HH, Cremers FP. Association between X-linked mixed deafness and mutations in the POU domain gene POU3F4. *Science*, v. 267, n. 5198, p. 685-8, 1995.
- del Castillo FJ, Rodríguez-Ballasteros M, Alvares A, Hutchin T, Leonardi E, de Oliveira CA, Azaiez H, Brownstein Z, Avenarius MR, Marlin S, Pandya A, Shahin H, Siemering KR,

Weil D, Wuyts W, Aguirre LA, Martín Y, Moreno-Pelayo MA, Villamar M, Avraham KB, Dahl HH, Kanann M, Nance WE, Petit C, Smith RJ, Van Camp G, Sartorato EL, Murgia A, Moreno F, Del Castillo I. A novel deletion involving the connexin 30 gene del(GJB6-D13S1854), found in trans with mutations in the *GJB2* gene (connexin 26) in subjects with DFNB1 nonsyndromic hearing impairment. *Journal of Medical Genetics*, v. 42, n. 7, p. 588-94, 2005.

- del Castillo I, Villamar M, Moreno-Pelayo MA, Del Castillo FJ, Alvarez A, Tellería D, Menéndes I, Moreno F. A deletion involving the connexin 30 gene in nonsyndromic hearing impairment. *New England Journal of Medicine*, v. 346, n. 4, p. 243-249, 2002.
- del Castillo I, Villamar M, Sarduy M, Romero L, Herraiz C, Hernández FJ, Rodríguez M, Borrás I, Montero A, Bellón J, Tapia MC, Moreno F. A novel locus for non-syndromic sensorineural deafness (DFN6) maps to chromosome Xp22. *Human Molecular Genetics*, v. 5, n. 9, p. 1383-7, 1996.
- Delmaghani S, Aghaie A, Compain-Nouaille S, Ataie A, Lemainque A, Zeinali S, Lathrop M, Weil D, Petit C. DFNB40, a recessive form of sensorineural hearing loss, maps to chromosome 22q11.21-12.1. *European Journal of Human Genetics*, v. 11, n. 10, p. 816-8, 2003.
- Delmaghani S, del Castillo FJ, Michel V, Leibovici M, Aghaie A, Ron U, Van Laer L, Ben-Tal N, Van Camp G, Weil D, Langa F, Lathrop M, Avan P, Petit C. Mutations in the gene encoding pejvakin, a newly identified protein of the afferent auditory pathway, cause DFNB59 auditory neuropathy. *Nature Genetics*, v. 38, n. 7, p. 770-8, 2006.
- de Moraes VC, Dos Santos NZ, Ramos PZ, Svidnicki MC, Castilho AM, Sartorato EL.Molecular analysis of *SLC26A4* gene in patients with nonsyndromic hearing loss and EVA: Identification of two novel mutations in Brazilian patients. *International Journal of Pediatric Otorhinolaryngoology.*
- Denoyelle F, Lina-Granade G, Plauchu H, Bruzzone R, Chaïb H, Lévi-Acobas F, Weil D, Petit C. Connexin 26 gene linked to a dominant deafness. *Nature*, v. 393, n. 6683, p. 319-20, 1998.

- Denoyelle F, Weil D, Maw MA, Wilcox SA, Lench NJ, Allen-Powell DR, Osborn AH, Dahl HH, Middleton A, Houseman MJ, Dodé C, Marlin S, Boulila-ElGaïed A, Grati M, Ayadi H, BenArab S, Bitoun P, Lina-Granade G, Godet J, Mustapha M, Loiselet J, El-Zir E, Aubois A, Joannard A, Petit C, et al. Prelingual deafness: high prevalence of a 30delG mutation in the connexin 26 gene. *Human Molecular Genetics*, v. 6, n. 12, p. 2173-7, 1997.
- Dixons *et al.* Positional cloning of a gene involved in the pathogenesis of Treacher Collins syndrome. The Treacher Collins Syndrome Collaborative Group. *Nature Genetics*, v. 12, n. 2, p. 130-6, 1996.
- Donaudy F, Ferrara A, Esposito L, Hertzano R, Ben-David O, Bell RE, Melchionda S, Zelante L, Avraham KB, Gasparini P. Multiple mutations of *MYO1A*, a cochlear-expressed gene, in sensorineural hearing loss. *American Journal of Human Genetics*, v. 72, n. 6, p. 1571-7, 2003.
- Donaudy F, Snoeckx R, Pfister M, Zenner HP, Blin N, Di Stazio M, Ferrara A, Lanzara C, Ficarella R, Declau F, Pusch CM, Nürnberg P, Melchionda S, Zelante L, Ballana E, Estivill X, Van Camp G, Gasparini P, Savoia A. Nonmuscle myosin heavy-chain gene *MYH14* is expressed in cochlea and mutated in patients affected by autosomal dominant hearing impairment (DFNA4). *American Journal of Human Genetics*, v. 74, n. 4, p. 770-6, 2004.
- Dossena S, Bizhanova A, Nofziger C, Bernardinelli E, Ramsauer J, Kopp P, Paulmichl M.Identification of allelic variants of pendrin (*SLC26A4*) with loss and gain of function. *Cellular Physiology and Biochemistry*, v. 28, n. 3, 467-76, 2011.
- Dror AA, Avraham KB. Hearing Loss: Mechanisms Revealed by Genetics and Cell Biology. Annual Review of Genetics, v. 43, p. 411-437, 2009.
- Du X, Schwander M, Moresco EM, Viviani P, Haller C, Hildebrand MS, Pak K, Tarantino L, Roberts A, Richardson H, Koob G, Najmabadi H, Ryan AF, Smith RJ, Müller U, Beutler B. A catechol-O-methyltransferase that is essential for auditory function in mice and humans. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 105, n. 38, p. 14609-14, 2008.

- Dulon D, Safieddine S, Jones SM, Petit C. Otoferlin is critical for a highly sensitive and linear calcium-dependent exocytosis at vestibular hair cell ribbon synapses. *The Neuroscience Journal*, v. 29, n. 34, p. 10474-87, 2009.
- Ebermann I, Scholl HP, Charbel Issa P, Becirovic E, Lamprecht J, Jurklies B, Millán JM, Aller E, Mitter D, Bolz H. A novel gene for Usher syndrome type 2: mutations in the long isoform of whirlin are associated with retinitis pigmentosa and sensorineural hearing loss. *Human Genetics*, v. 121, n. 2, p. 203-11, 2007.
- Ebermann I, Phillips JB, Liebau MC, Koenekoop RK, Schermer B, Lopez I, Schäfer E, Roux AF, Dafinger C, Bernd A, Zrenner E, Claustres M, Blanco B, Nürnberg G, Nürnberg P, Ruland R, Westerfield M, Benzing T, Bolz HJ. *PDZD7* is a modifier of retinal disease and a contributor to digenic Usher syndrome. *Journal of Clinical Investigation*, v. 120, n. 6, p. 1812-23, 2010.
- Edery P, Attié T, Amiel J, Pelet A, Eng C, Hofstra RM, Martelli H, Bidaud C, Munnich A, Lyonnet S. Mutation of the endothelin-3 gene in the Waardenburg-Hirschsprung disease (Shah-Waardenburg syndrome). *Nature Genetics*, v. 12, n. 4, p. 442-4, 1996.
- Eudy JD, Weston MD, Yao S, Hoover DM, Rehm HL, Ma-Edmonds M, Yan D, Ahmad I, Cheng JJ, Ayuso C, Cremers C, Davenport S, Moller C, Talmadge CB, Beisel KW, Tamayo M, Morton CC, Swaroop A, Kimberling WJ, Sumegi J. Mutation of a gene encoding a protein with extracellular matrix motifs in Usher syndrome type IIa. *Science*, v. 280, n. 5370, p. 1753-7, 1998.
- Everett LA, Glaser B, Beck JC, Idol JR, Buchs A, Heyman M, Adawi F, Hazani E, Nassir E, Baxevanis AD, Sheffield VC, Green ED. Pendred syndrome is caused by mutations in a putative sulphate transporter gene (*PDS*). *Nature Genetics*, v. 17, n. 4, p. 411-22, 1997.
- Fagerheim T, Nilssen O, Raeymaekers P, Brox V, Moum T, Elverland HH, Teig E, Omland HH, Fostad GK, Tranebjaerg L. Identification of a new *locus* for autosomal dominant non-syndromic hearing impairment (DFNA7) in a large Norwegian family. *Human Molecular Genetics*, v. 5, n. 8, p. 1187-91, 1996.
- Feldmann D, Denoyelle F, Loundon N, Weil D, Garabedian EN, Couderc R, Joannard A, Schmerber S, Delobel B, Leman J, Journel H, Catros H, Ferrec C, Drouin-Garraud V,

Obstoy MF, Moati L, Petit C, Marlin S. Clinical evidence of the nonpathogenic nature of the M34T variant in the connexin 26 gene. *European Journal of Human Genetics*, v. 12,n. 4, 279-84, 2004.

Feldmann D, Le Maréchal C, Jonard L, Thierry P, Czajka C, Couderc R, Ferec C, Denoyelle
F, Marlin S, Fellmann F. A new large deletion in the DFNB1 locus causes nonsyndromic hearing loss. European Journal of Medical Genetics, v. 52, n. 4, p. 195-200, 2009.

Filho OL. Tratado de Fonoaudiologia. São Paulo: Editora ROCA, 1ª Edição, 1997.

- Fishel-Ghodsian N, Prezant TR, Bu X, Oztas S. Mitochondrial ribosomal RNA gene mutation in a patient with sporadic aminoglycoside ototoxicity. *American Journal of Otolaryngology*, v. 14, p. 339-403, 1993.
- Fischel-Ghodsian N, Prezant TR, Fournier P, Stewart IA, Maw M. Mitochondrial mutation associated with nonsyndromic deafness. *American Journal of Otolaryngology*, v. 16, n. 6, p. 403-8, 1995.
- Flex E, Mangino M, Mazzoli M, Martini A, Migliosi V, Colosimo A, Mingarelli R, Pizzuti A, Dallapiccola B. Mapping of a new autosomal dominant non-syndromic hearing loss locus (DFNA43) to chromosome 2p12. *Journal of Medical Genetics*, v. 40, n. 4, p. 278-81, 2003.
- Friedman LM, Dror AA, Mor E, Tenne T, Toren G, Satoh T, Biesemeier DJ, Shomron N, Fekete DM, Hornstein E, Avraham KB. MicroRNAs are essential for development and function of inner ear hair cells in vertebrates. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 106, n. 19, p. 7915-20, 2009.
- Friedman TB, Liang Y, Weber JL, Hinnant JT, Barber TD, Winata S, Arhya IN, Asher JH Jr. A gene for congenital, recessive deafness DFNB3 maps to the pericentromeric region of chromosome 17. *Nature Genetics*, v. 9, n. 1, p. 86-91, 1995.
- Fukushima K, Kasai N, Ueki Y, Nishizaki K, Sugata K, Hirakawa S, Masuda A, Gunduz M, Ninomiya Y, Masuda Y, Sato M, McGuirt WT, Coucke P, Van Camp G, Smith RJ. A gene for fluctuating, progressive autosomal dominant nonsyndromic hearing loss, DFNA16, maps to chromosome 2q23-24.3. *American Journal of Human Genetics*, v. 65, n. 1, p. 141-50, 1999.

- Gardner P, Oitmaa E, Messner A, Hoefsloot L, Metspalu A, Schrijver I. Simultaneous multigene mutation detection in patients with sensorineural hearing loss through a novel diagnostic microarray: a new approach for newborn screening follow-up. *Pediatrics*, v. 118, n. 3, p. 985-94, 2006.
- Gasparini P, Rabionet R, Barbujani G, Melçhionda S, Petersen M, Brondum-Nielsen K, Metspalu A, Oitmma E, Pisano M, Fortina P, Zelante L, Estivill X. High carrier frequency of the 35delG deafness mutation in European populations. Genetic Analysis Consortium of *GJB2* 35delG. *European Journal of Human Genetics*, v. 8, p. 19-23, 2000.
- GenBank. Disponível em: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/. Acesso em: dezembro de 2012.
- Godinho R, Keogh I, Eavey R. Perda auditiva genética. *Revista Brasileira de Otorrinolaringologia*, v. 69, n. 1, p. 100-104, 2003.
- Gorlin RJ, Toriello HV, Cohen MM. *Hereditary hearing loss and its syndromes*. Reino Unido: Editora Oxford Univesity, 1995.
- Green et al. Abstract 107 The Molecular Biology of Hearing and Deafness meeting Bethesda, October 8-11, 1998.
- Green et al. Abstract 108 The Molecular Biology of Hearing and Deafness meeting Bethesda, October 8-11, 1998.
- Greene CC, McMillan PM, Barker SE, Kurnool P, Lomax MI, Burmeister M, Lesperance MM. DFNA25, a novel *locus* for dominant nonsyndromic hereditary hearing impairment, maps to 12q21-24. *American Journal of Human Genetics,* v. 68, n. 1, p. 254-60, 2001.
- Greinwald JH Jr, Wayne S, Chen AH, Scott DA, Zbar RI, Kraft ML, Prasad S, Ramesh A, Coucke P, Srisailapathy CR, Lovett M, Van Camp G, Smith RJ. Localization of a novel gene for nonsyndromic hearing loss (DFNB17) to chromosome region 7q31. *American Journal of Medical Genetics*, v. 78, n. 2, p. 107-13, 1998.
- Grifa A, Wagner CA, D'Ambrosio L, Melchionda S, Bernardi F, Lopez-Bigas N, Rabionet R, Arbones M, Monica MD, Estivill X, Zelante L, Lang F, Gasparini P. Mutations in *GJB6*

cause nonsyndromic autosomal dominant deafness at DFNA3 locus. *Nature Genetics*, v. 23, n. 1, p. 16-8, 1999.

- Grillet N, Schwander M, Hildebrand MS, Sczaniecka A, Kolatkar A, Velasco J, Webster JA, Kahrizi K, Najmabadi H, Kimberling WJ, Stephan D, Bahlo M, Wiltshire T, Tarantino LM, Kuhn P, Smith RJ, Müller U. Mutations in *LOXHD1*, an evolutionarily conserved stereociliary protein, disrupt hair cell function in mice and cause progressive hearing loss in humans. *American Journal of Human Genetics*, v. 85, n. 3, p. 328-37, 2009.
- Guilford P, Ayadi H, Blanchard S, Chaib H, Le Paslier D, Weissenbach J, Drira M, Petit C. A human gene responsible for neurosensory, non-syndromic recessive deafness is a candidate homologue of the mouse sh-1 gene. *Human Molecular Genetics*, v. 3, n. 6, p. 989-93, 1994.
- Guilford P, Ben Arab S, Blanchard S, Levilliers J, Weissenbach J, Belkahia A, Petit C. A nonsyndrome form of neurosensory, recessive deafness maps to the pericentromeric region of chromosome 13q. *Nature Genetics*, v. 6, n. 1, p. 24-8, 1994.
- Gürtler N, Kim Y, Mhatre A, Schlegel C, Mathis A, Lalwani AK. DFNA54, a third locus for lowfrequency hearing loss. *Journal of Molecular Medicine*, v. 82, n. 11, p. 775-80, 2004.
- Guyton AC, Hall JE. *Tratado de fisiologia médica.* Rio de Janeiro: Guanabara Koogans S.A, 1996.
- Häfner FM, Salam AA, Linder TE, Balmer D, Baumer A, Schinzel AA, Spillmann T, Leal SM.
 A novel locus (DFNA24) for prelingual nonprogressive autosomal dominant nonsyndromic hearing loss maps to 4q35-qter in a large Swiss German kindred.
 American Journal of Human Genetics, v. 66, n. 4, p. 1437-42, 2000.
- Hanna MG, Nelson I, Sweeney MG, Cooper JM, Watkins PJ, Morgan-Hughes JA, Harding AE. Congenital encephalomyopathy and adult-onset myopathey and diabetes mellitus: different phenotypic associations of a new heteroplasmic mtDNA tRNA glutamic acid mutation." *American Journal of Human Genetics.* v. 56, n. 5, p. 1026-1033, 1995.
- Hassan MJ, Santos RL, Rafiq MA, Chahrour MH, Pham TL, Wajid M, Hijab N, Wambangco M, Lee K, Ansar M, Yan K, Ahmad W, Leal SM. A novel autosomal recessive non-

syndromic hearing impairment locus (DFNB47) maps to chromosome 2p25.1-p24.3. *Human Genetics*, v. 118, n. 5, p. 605-10, 2006.

- Higashi K. Unique inheritance of streptomycin-induced deafness. *Clinical Genetics*, v. 35, n. 6, p. 433-36, 1989.
- Hilgert N, Smith RJH, Van Camp G. Forty-six genes genes causing nonsyndromic hearing impairment: which ones should be analyzed in DNA diagnostics? *Mutation Research*, n. 681, p. 189-196, 2009a.
- Hmani M, Ghorbel A, Boulila-Elgaied A, Ben Zina Z, Kammoun W, Drira M, Chaabouni M, Petit C, Ayadi H. A novel locus for Usher syndrome type II, USH2B, maps to chromosome 3 at p23-24.2. *European Journal of Human Genetics*, v. 7, n. 3, p. 363-7, 1999.
- Holt JR, Corey DP. Ion channel defects in hereditary hearing loss. *Neuron*, v. 22, n. 2, p. 217–219, 1999.
- Hoskins BE, Cramer CH, Silvius D, Zou D, Raymond RM, Orten DJ, Kimberling WJ, Smith RJ, Weil D, Petit C, Otto EA, Xu PX, Hildebrandt F. Transcription factor SIX5 is mutated in patients with branchio-oto-renal syndrome. *American Journal of Human Genetics*, v. 80, n. 4, p. 800-4, 2007.
- Hoth CF, Milunsky A, Lipsky N, Sheffer R, Clarren SK, Baldwin CT. Mutations in the paired domain of the human *PAX3* gene cause Klein-Waardenburg syndrome (WS-III) as well as Waardenburg syndrome type I (WS-I). *American Journal of Human Genetics*, v. 52, n. 3, p. 455-62, 1993.
- Hutchin T, Haworth I, Higashi K, Fischel-Ghodsian N, Stoneking M, Saha N, Arnos C, Cortopassi G. A molecular basis for human hypersensitivity to aminoglycoside antibiotics. *Nucleic Acids Research*, v. 21, n. 18, p. 4174-4179, 1993.
- Hutchin TP, Parker MJ, Young ID, Davis AC, Pulleyn LJ, Deeble J, Lench NJ, Markham AF, Mueller RF. A novel mutation in the mitochondrial tRNA(Ser(UCN)) gene in a family with non-syndromic sensorineural hearing impairment. *Journal of Medical Genetics*, v. 37, n. 9, p. 692-694, 2000.

- Irshad S, Santos RL, Muhammad D, Lee K, McArthur N, Haque S, Ahmad W, Leal SM. Localization of a novel autosomal recessive non-syndromic hearing impairment locus DFNB55 to chromosome 4q12-q13.2. Clin Genet. 2005 Sep;68(3):262-7, 2005.
- Iwasaki S, Usami S, Abe S, Isoda H, Watanabe T, Hoshino T. Long-term audiological feature in Pendred syndrome caused by *PDS* mutation. *Archives of Otolaryngology – Head and Neck Surgery*, v. 127, n. 6, p. 705-8, 2001.
- Jain PK, Lalwani AK, Li XC, Singleton TL, Smith TN, Chen A, Deshmukh D, Verma IC, Smith RJ, Wilcox ER. A gene for recessive nonsyndromic sensorineural deafness (DFNB18) maps to the chromosomal region 11p14-p15.1 containing the Usher syndrome type 1C gene. *Genomics*, v. 50, n. 2, p. 290-2, 1998.
- Joensuu T, Hämäläinen R, Yuan B, Johnson C, Tegelberg S, Gasparini P, Zelante L, Pirvola U, Pakarinen L, Lehesjoki AE, de la Chapelle A, Sankila EM. Mutations in a novel gene with transmembrane domains underlie Usher syndrome type 3. *American Journal of Human Genetics*, v. 69, n. 4, p. 673-84, 2001.
- Kalay E, Li Y, Uzumcu A, Uyguner O, Collin RW, Caylan R, Ulubil-Emiroglu M, Kersten FF, Hafiz G, van Wijk E, Kayserili H, Rohmann E, Wagenstaller J, Hoefsloot LH, Strom TM, Nürnberg G, Baserer N, den Hollander AI, Cremers FP, Cremers CW, Becker C, Brunner HG, Nürnberg P, Karaguzel A, Basaran S, Kubisch C, Kremer H, Wollnik B. Mutations in the lipoma HMGIC fusion partner-like 5 (*LHFPL5*) gene cause autosomal recessive nonsyndromic hearing loss. *Human Mutations*, v. 27, n. 7, p. 633-9, 2006.
- Kelley PM, Abe S, Askew JW. Human connexin 30 (*GJB6*), a candidate gene for nonsyndromic hearing loss: molecular cloning, tissue-specific expression, and assignment to chromosome 13q12. *Genomics*, v. 62, n. 2, p. 172–176, 1999.
- Kelley PM, Harris DJ, Comer BC, Askew JW, Fowler T, Smith SD, Kimberling WJ.Novel mutations in the connexin 26 gene (*GJB2*) that cause autosomal recessive (DFNB1) hearing loss. *American Journal of Human Genetics*, v. 62, n. 4, p. 792-9, 1998.
- Kelsell DP, Dunlop J, Stevens HP, Lench NJ, Liang JN, Parry G, Mueller RF, Leigh IM. Connexin 26 mutations in hereditary non-syndromic sensorineural deafness. *Nature*, v. 387, n. 6628, p. 80-3, 1997.

- Kemperman MH, Hoefsloot LH, Cremers CW. Hearing loss and connexin 26. *Journal of the Royal Society of Medicine*, v.95, n. 4, p. 171-7, 2002.
- Kenna MA, Wu BL, Cotanche DA, Korf BR, Rehm HL. Connexin 26 studies in patients with sensorineural hearing loss. *Archives of Otolaryngology – Head and Neck Surgery*, v. 127, n. 9, p. 1037-42, 2001.
- Kendall R. Cognitive Psychology of Music. Disponível em: http://www.ethnomusic.ucla.edu/courses/172a/Index.htm. Acesso em: 24 ago 2009.
- Khan SY, Ahmed ZM, Shabbir MI, Kitajiri S, Kalsoom S, Tasneem S, Shayiq S, Ramesh A, Srisailpathy S, Khan SN, Smith RJ, Riazuddin S, Friedman TB, Riazuddin S. Mutations of the *RDX* gene cause nonsyndromic hearing loss at the DFNB24 locus. *Human Mutations*, v. 28, n. 5, p. 417-23, 2007.
- Kierszenbaum AL. *Histologia e biologia celular: uma introdução à patologia*. Rio de Janeiro: Editora Elsevier. p. 264-286, 2004.
- Kimberling WJ, Weston MD, Möller C, Davenport SL, Shugart YY, Priluck IA, Martini A, Milani M, Smith RJ. Localization of Usher syndrome type II to chromosome 1q. *Genomics*, v. 7, n. 2, p. 245-9, 1990.
- Kubisch C, Schroeder BC, Friedrich T, Lütjohann B, El-Amraoui A, Marlin S, Petit C, Jentsch TJ. *KCNQ4*, a novel potassium channel expressed in sensory outer hair cells, is mutated in dominant deafness. *Cell*, v. 96, n. 3, p. 437-46, 1999.
- Kumar NM, Gilula NB. The gap junction communication channel. *Cell*, v. 84, n. 3, p. 381-388, 1996.
- Kumar S, Deffenbacher K, Marres HA, Cremers CW, Kimberling WJ. Genomewide search and genetic localization of a second gene associated with autosomal dominant branchio-oto-renal syndrome: clinical and genetic implications. *American Journal of Human Genetics*, v. 66, n. 5, p. 1715-20, 2000.
- Kunst H, Marres H, Huygen P, van Duijnhoven G, Krebsova A, van der Velde S, Reis A, Cremers F, Cremers C. Non-syndromic autosomal dominant progressive non-specific

mid-frequency sensorineural hearing impairment with childhood to late adolescence onset (DFNA21). *Clinical Otolaryngology*, v. 25, n. 1, p. 45-54, 2000.

- Kurima K, Peters LM, Yang Y, Riazuddin S, Ahmed ZM, Naz S, Arnaud D, Drury S, Mo J, Makishima T, Ghosh M, Menon PS, Deshmukh D, Oddoux C, Ostrer H, Khan S, Riazuddin S, Deininger PL, Hampton LL, Sullivan SL, Battey JF Jr, Keats BJ, Wilcox ER, Friedman TB, Griffith AJ. Dominant and recessive deafness caused by mutations of a novel gene, *TMC1*, required for cochlear hair-cell function. *Nature Genetics*, v. 30, n. 3, p. 277-84, 2002.
- Kurima K, Yang Y, Sorber K. Characterization of the transmembrane channel-like (*TMC*) gene family: functional clues from hearing loss and epidermodysplasia verruciformis. *Genomics*, v. 82, n. 3, p. 300–308, 2003.
- Labay V, Weichert RM, Makishima T, Griffith AJ. Topology of transmembrane channel-like gene 1 protein. *Biochemistry*, v. 49, n. 39, p. 8592-8, 2010.
- Lai K, Duran C, Berkman PJ, Lorenc MT, Stiller J, Manoli S, Hayden MJ, Forrest KL, Fleury D, Baumann U, Zander M, Mason AS, Batley J, Edwards D. Single nucleotide polymorphism discovery from wheat next-generation sequence data. *Plant Biotechnology Journal*, v. 10, n. 6, p. 743-9, 2012.
- Lalani SR, Safiullah AM, Molinari LM, Fernbach SD, Martin DM, Belmont JW. SEMA3E mutation in a patient with CHARGE syndrome. *Journal of Medical Genetics*, v. 41, n. 7, p. e94, 2004.
- Lalwani AK. A new nonsyndromic X-Linked sensorineural hearing impairment linked to Xp21.2. *American Journal of Human Genetics*, v. 55, n. 4, p. 685-694, 1994.
- Lalwani AK, Goldstein JA, Kelley MJ, Luxford W, Castelein CM, Mhatre AN. Human nonsyndromic hereditary deafness DFNA17 is due to a mutation in nonmuscle myosin *MYH9. American Journal of Human Genetics*, v. 67, n. 5, p. 1121-8, 2000.
- Lalwani AK, Luxford WM, Mhatre AN, Attaie A, Wilcox ER, Castelein CM. A new locus for nonsyndromic hereditary hearing impairment, DFNA17, maps to chromosome 22 and represents a gene for cochleosaccular degeneration. *American Journal of Human Genetics*, v. 64, n. 1, p. 318-23, 1999.

- Landau ME, Barner KC. Vestibulocochlear nerve. *Seminars in Neurology*, v. 29, n. 1, p. 66-73, 2009.
- Leon PE, Raventos H, Lynch E, Morrow J, King MC. The gene for an inherited form of deafness maps to chromosome 5q31. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 89, n. 11, p. 5181-5184, 1992.
- Lesperance MM, Hall JW 3rd, Bess FH, Fukushima K, Jain PK, Ploplis B, San Agustin TB, Skarka H, Smith RJ, Wills M, et al. A gene for autosomal dominant nonsyndromic hereditary hearing impairment maps to 4p16.3. *Human Molecular Genetics*, v. 4, n. 10, p. 1967-72, 1995.
- Lezirovitz K, Braga MC, Thiele-Aguiar RS, Auricchio MT, Pearson PL, Otto PA, Mingroni-Netto RC. A novel autosomal dominant deafness locus (DFNA58) maps to 2p12-p21. *Clinical Genetics*, v. 75, n. 5, p. 490-3, 2009.
- Li Z, Li R, Chen J, Liao Z, Zhu Y, Qian Y, Xiong S, Heman-Ackah S, Wu J, Choo DI, Guan MX. Mutational analysis of the mitochondrial *12S rRNA* gene in Chinese pediatric subjects with aminoglycoside-induced and non-syndromic hearing loss. *Human Genetics*, v. 117, n. 1, p. 9-15, 2005.
- Liu X, Han D, Li J, Han B, Ouyang X, Cheng J, Li X, Jin Z, Wang Y, Bitner-Glindzicz M, Kong X, Xu H, Kantardzhieva A, Eavey RD, Seidman CE, Seidman JG, Du LL, Chen ZY, Dai P, Teng M, Yan D, Yuan H. Loss-of-function mutations in the *PRPS1* gene cause a type of nonsyndromic X-linked sensorineural deafness, DFN2. *American Journal of Human Genetics*, v. 86, n. 1, p. 65-71, 2010.
- Liu XZ et al. ARO meeting. Denver, Fev. 2007.
- Liu XZ, Ouyang XM, Xia XJ, Zheng J, Pandya A, Li F, Du LL, Welch KO, Petit C, Smith RJ, Webb BT, Yan D, Arnos KS, Corey D, Dallos P, Nance WE, Chen ZY. Prestin, a cochlear motor protein, is defective in non-syndromic hearing loss. *Human Molecular Genetics*, v. 12, n. 10, p. 1155-62, 2003.
- Liu XZ, Walsh J, Mburu P, Kendrick-Jones J, Cope MJ, Steel KP, Brown SD. Mutations in the myosin VIIA gene cause non-syndromic recessive deafness. *Nature Genetics*, v. 16, n. 2, p. 188-90, 1997.

Liu XZ, Walsh J, Tamagawa Y, Kitamura K, Nishizawa M, Steel KP, Brown SD. Autosomal dominant non-syndromic deafness caused by a mutation in the myosin VIIA gene. *Nature Genetics*, v. 17, n. 3, p. 268-9, 1997.

Ludman H, Wright T. Diseases of the ear. Nova lorque: Editora Oxford University, 1998.

- Lynch ED, Lee MK, Morrow JE, Welcsh PL, León PE, King MC. Nonsyndromic deafness DFNA1 associated with mutation of a human homolog of the Drosophila gene diaphanous. *Science*, v. 278, n. 5341, p. 1315-8, 1997.
- Maeda S, Nakagawa S, Suga M, Yamashita E, Oshima A, Fujiyoshi Y, Tsukihara T. Structure of the connexin 26 gap junction channel at 3.5 A resolution. *Nature*, v. 458, p. 597–602, 2009.
- Mafong DD, Shin EJ, Lalwani AK. Use of laboratory evaluation and radiologic imaging in the diagnostic evaluation of children with sensorineural hearing loss. *Laryngoscope*, v. 112, n. 1, p. 1–7, 2002.
- Mahdieh N, Shirkavand A, Rabbani B, Tekin M, Akbari B, Akbari MT, Zeinali S. Screening of *OTOF* mutations in Iran: a novel mutation and review. *International Journal of Pediatric Otorhinolaryngology*, v. 76, n. 11, p. 1610-5, 2012.
- Mangino M, Flex E, Capon F, Sangiuolo F, Carraro E, Gualandi F, Mazzoli M, Martini A, Novelli G, Dallapiccola B. Mapping of a new autosomal dominant nonsyndromic hearing loss locus (DFNA30) to chromosome 15q25-26. *European Journal of Human Genetics*, v. 9, n. 9, p. 667-71, 2001.
- Manolis EN, Yandavi N, Nadol JB Jr, Eavey RD, McKenna M, Rosenbaum S, Khetarpal U, Halpin C, Merchant SN, Duyk GM, MacRae C, Seidman CE, Seidman JG. A gene for non-syndromic autosomal dominant progressive postlingual sensorineural hearing loss maps to chromosome 14q12-13. *Human Molecular Genetics*, v. 5, n. 7, p. 1047-50, 1996.
- Masmoudi S, Tlili A, Majava M, Ghorbel AM, Chardenoux S, Lemainque A, Zina ZB, Moala J, Männikkö M, Weil D, Lathrop M, Ala-Kokko L, Drira M, Petit C, Ayadi H. Mapping of a new autosomal recessive nonsyndromic hearing loss locus (DFNB32) to chromosome 1p13.3-22.1. *European Journal of Human Genetics*, v. 11, n. 2, p. 185-8, 2003.

- Matthijs G, Claes S, Longo-Mbenza B, Cassiman JJ. Non-syndromic deafness associated with a mutation and a polymorphism in the mitochondrial 12S ribosomal RNA gene in a large Zairean pedigree. *European Journal of Human Genetics*, v. 4, n. 1, p. 46-51, 1996.
- Mburu P, Mustapha M, Varela A, Weil D, El-Amraoui A, Holme RH, Rump A, Hardisty RE, Blanchard S, Coimbra RS, Perfettini I, Parkinson N, Mallon AM, Glenister P, Rogers MJ, Paige AJ, Moir L, Clay J, Rosenthal A, Liu XZ, Blanco G, Steel KP, Petit C, Brown SD. Defects in whirlin, a PDZ domain molecule involved in stereocilia elongation, cause deafness in the whirler mouse and families with DFNB31. *Nature Genetics*, v. 34, n. 4, p. 421-8, 2003.
- McGuirt WT, Prasad SD, Griffith AJ, Kunst HP, Green GE, Shpargel KB, Runge C, Huybrechts C, Mueller RF, Lynch E, King MC, Brunner HG, Cremers CW, Takanosu M, Li SW, Arita M, Mayne R, Prockop DJ, Van Camp G, Smith RJ. Mutations in *COL11A2* cause non-syndromic hearing loss (DFNA13). *Nature Genetics*, v. 23, n. 4, p. 413-9, 1999.
- Medeiros EB. Introdução à Teoria Acústica. Anais do I SEMEA, Belo Horizonte, 2002.
- Medlej-Hashim M, Mustapha M, Chouery E, Weil D, Parronaud J, Salem N, Delague V, Loiselet J, Lathrop M, Petit C, Mégarbané A. Non-syndromic recessive deafness in Jordan: mapping of a new locus to chromosome 9q34.3 and prevalence of DFNB1 mutations. *European Journal of Human Genetics*, v. 10, n. 6, p. 391-4, 2002.
- Melchionda S, Ahituv N, Bisceglia L, Sobe T, Glaser F, Rabionet R, Arbones ML, Notarangelo A, Di Iorio E, Carella M, Zelante L, Estivill X, Avraham KB, Gasparini P. MYO6, the human homologue of the gene responsible for deafness in Snell's waltzer mice, is mutated in autosomal dominant nonsyndromic hearing loss. *American Journal of Human Genetics*, v. 69, n. 3, p. 635-40, 2001.
- Mencía A, Modamio-Høybjør S, Redshaw N, Morín M, Mayo-Merino F, Olavarrieta L, Aguirre LA, del Castillo I, Steel KP, Dalmay T, Moreno F, Moreno-Pelayo MA. Mutations in the seed region of human miR-96 are responsible for nonsyndromic progressive hearing loss. *Nature Genetics*, v. 41, n. 5, p. 609-13, 2009.

- Migliosi V, Modamio-Hoybjor S, Moreno-Pelayo M.A. Q829X, a novel mutation in the gene encoding otoferlin (*OTOF*), is frequently found in Spanish patients with prelingual non-syndromic hearing loss. *Journal of Medical Genetics*, v. 39, n. 7, p. 502–506, 2002.
- Mignon C, Fromaget C, Mattei MG. Assignment of connexin 26 (*GJB2*) and 46 (*GJA3*) genes to human chromosome 13q11-q12 and mouse chromosome 14D1-E1 by in situ hybridization. *Cytogenetics and Cell Genetics*, v. 72, n. 2-3, p. 185–186, 1996.
- Mir A, Ansar M, Chahrour MH, Pham TL, Wajid M, Haque S, Yan K, Ahmad W, Leal SM. Mapping of a novel autosomal recessive nonsyndromic deafness locus (DFNB46) to chromosome 18p11.32-p11.31. *American Journal of Medical Genetics*, v. 133A, n. 1, p. 23-6, 2005.

MirBase. Disponível em: <www.mirbase.org>. Acessado em: 5 dez 2012.

- MitoMap. Disponível em: <http://www.mitomap.org/bin/view.pl/MITOMAP/ClinicalPhenotypesRNA#21>. Acesso em: novembro de 2012.
- Mochizuki T, Lemmink HH, Mariyama M, Antignac C, Gubler MC, Pirson Y, Verellen-Dumoulin C, Chan B, Schröder CH, Smeets HJ. Identification of mutations in the alpha 3(IV) and alpha 4(IV) collagen genes in autosomal recessive Alport syndrome. *Nature Genetics*, v.1, p. 77-81, 1994.
- Modamio-Hoybjor S, Mencia A, Goodyear R, del Castillo I, Richardson G, Moreno F, Moreno-Pelayo MA. A mutation in *CCDC50*, a gene encoding an effector of epidermal growth factor-mediated cell signaling, causes progressive hearing loss. *American Journal of Human Genetics*, v. 80, n. 6, p. 1076-89, 2007.
- Modamio-Høybjør S, Moreno-Pelayo MA, Mencía A, del Castillo I, Chardenoux S, Armenta D, Lathrop M, Petit C, Moreno F. A novel locus for autosomal dominant nonsyndromic hearing loss (DFNA44) maps to chromosome 3q28-29. *Human Genetics*, v. 112, n. 1, p. 24-8, 2003.
- Modamio-Høybjør S, Moreno-Pelayo MA, Mencía A, del Castillo I, Chardenoux S, Morais D, Lathrop M, Petit C, Moreno F. A novel locus for autosomal dominant nonsyndromic

hearing loss, DFNA50, maps to chromosome 7q32 between the DFNB17 and DFNB13 deafness loci. *Journal of Medical Genetics*, v. 41, n. 2, p. e14, 2004.

- Morell RJ, Friderici KH, Wei S, Elfenbein JL, Friedman TB, Fisher RA. A new locus for lateonset, progressive, hereditary hearing loss DFNA20 maps to 17q25. *Genomics*, v. 63, n. 1, p. 1-6, 2000.
- Moreno-Pelayo MA, Modamio-Høybjør S, Mencía A, del Castillo I, Chardenoux S, Fernández-Burriel M, Lathrop M, Petit C, Moreno F. DFNA49, a novel locus for autosomal dominant non-syndromic hearing loss, maps proximal to DFNA7/DFNM1 region on chromosome 1q21-q23. *Journal of Medical Genetics*, v. 40, n. 11, p. 832-6, 2003.
- Morrison T, Hurley J, Garcia J, Yoder K, Katz A, Roberts D, Cho J, Kanigan T, Ilyin SE, Horowitz D, Dixon JM, Brenan CJ. Nanoliter high throughput quantitative PCR. *Nucleic Acids Research*, v. 34, n. 18, p. e123, 2006.
- Morton CC, Nance WE. Newborn hearing screening-a silent revolution. *The New England Journal of Medicine,* a. 18, n. 354(20), p. 2151-64, 2006.
- Moussalle S, Di Nardo P, Steffen N, Stangler S, Reis H. *Guia Prático de Otorrinolaringologia* Anatomia, Fisiologia E Semiologia. Porto Alegre: EDIPUCRS, 1997.
- Moynihan L, Houseman M, Newton V, Mueller R, Lench N. DFNB20: a novel locus for autosomal recessive, non-syndromal sensorineural hearing loss maps to chromosome 11q25-qter. *European Journal of Human Genetics*, v.7, n. 2, p. 243-6, 1999.
- Murgia A, Orzan E, Polli R, Martella M, Vinanzi C, Leonardi E, Arslan E, Zacchello F. Cx26 deafness: mutation analysis and clinical variability. *Journal of Medical Genetics*, v.36, n. 11, p. 829-32, 1999.
- Mustapha M, Chardenoux S, Nieder A, Salem N, Weissenbach J, el-Zir E, Loiselet J, Petit C. A sensorineural progressive autosomal recessive form of isolated deafness, DFNB13, maps to chromosome 7q34-q36. *European Journal of Human Genetics*, v. 6, n. 3, p. 245-50, 1998a.
- Mustapha M, Chouery E, Chardenoux S, Naboulsi M, Paronnaud J, Lemainque A, Mégarbané A, Loiselet J, Weil D, Lathrop M, Petit C. DFNB31, a recessive form of

sensorineural hearing loss, maps to chromosome 9q32-34. *European Journal of Human Genetics*, v. 10, n. 3, p. 210-2, 2002.

- Mustapha M, Chouery E, Torchard-Pagnez D, Nouaille S, Khrais A, Sayegh FN, Mégarbané A, Loiselet J, Lathrop M, Petit C, Weil D. A novel *locus* for Usher syndrome type I, USH1G, maps to chromosome 17q24-25. *Human Genetics*, v. 110, n. 4, p. 348-50, 2002.
- Mustapha M, Salem N, Weil D, el-Zir E, Loiselet J, Petit C. Identification of a locus on chromosome 7q31, DFNB14, responsible for prelingual sensorineural non-syndromic deafness. *European Journal of Human Genetics*, v. 6, n. 6, p. 548-51, 1998b.
- Mustapha M, Weil D, Chardenoux S, Elias S, El-Zir E, Beckmann JS, Loiselet J, Petit C. An alpha-tectorin gene defect causes a newly identified autosomal recessive form of sensorineural pre-lingual non-syndromic deafness, DFNB21. *Human Molecular Genetics*, v. 8, n. 3, p. 409-12, 1999.
- Nance WE. The genetics of deafness. *Mental Retardation and Developmental Disabilities Research Reviews*, v. 9, n. 2, p. 109-119, 2003.
- Naz S, Griffith AJ, Riazuddin S, Hampton LL, Battey JF Jr, Khan SN, Riazuddin S, Wilcox ER, Friedman TB. Mutations of *ESPN* cause autosomal recessive deafness and vestibular dysfunction. *Journal of Medical Genetics*, v. 41, n. 8, p. 591-5, 2004.
- Neurelec . Disponível em: http://www.neurelec.com.br/implantes/sobre-audicao.html. Acessoem: 20 de novembro de 2012.
- Neyroud N, Tesson F, Denjoy I, Leibovici M, Donger C, Barhanin J, Fauré S, Gary F, Coumel P, Petit C, Schwartz K, Guicheney P. A novel mutation in the potassium channel gene *KVLQT1* causes the Jervell and Lange-Nielsen cardioauditory syndrome. *Nature Genetics*, v. 2, p. 186-9, 1997.
- Oliveira P, Castro F, Ribeiro A. Surdez infantil. *Revista Brasileira de Otorrinolaringologia*, v. 68, n. 3, p. 417-423, mai. 2002.
- OMIM. Online Mendelian Inheritance in Man. Disponível em: ">http://www.ncbi.nlm.nih.gov/omim>. Acesso em: Nov 2012.

- Organização Mundial de Saúde. Deafness and Hearing Impairment. 2009. Disponível em: http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs300/en/index.html. Acesso em: Nov 2012.
- O'Neill ME, Marietta J, Nishimura D, Wayne S, Van Camp G, Van Laer L, Negrini C, Wilcox ER, Chen A, Fukushima K, Ni L, Sheffield VC, Smith RJ. A gene for autosomal dominant late-onset progressive non-syndromic hearing loss, DFNA10, maps to chromosome 6. *Human Molecular Genetics*, v. 5, n. 6, p. 853-6, 1996.
- Ouyang XM, Xia XJ, Verpy E, Du LL, Pandya A, Petit C, Balkany T, Nance WE, Liu XZ. Mutations in the alternatively spliced exons of *USH1C* cause non-syndromic recessive deafness. *Human Genetics*, v. 111, n. 1, p. 26-30, 2002.
- Peters LM, Anderson DW, Griffith AJ, Grundfast KM, San Agustin TB, Madeo AC, Friedman TB, Morell RJ. Mutation of a transcription factor, *TFCP2L3*, causes progressive autosomal dominant hearing loss, DFNA28. *Human Molecular Genetics*, v. 11, n. 23, p. 2877-85, 2002.
- Peters LM, Fridell RA, Boger ET, San Agustin TB, Madeo AC, Griffith AJ, Friedman TB, Morell RJ. A locus for autosomal dominant progressive non-syndromic hearing loss, DFNA27, is on chromosome 4q12-13.1. *Clinical Genetics*, v. 73, n. 4, p. 367-72, 2008.
- Petersen MB. Non-syndromic autosomal-dominant deafness. *Clinical Genetics*, v. 62, n. 1, p. 1–13, 2002.
- Petersen MB, Willems PJ. Non-syndromic, autosomal-recessive deafness. Clinical Genetics, v. 69, n. 5, p. 371-392, 2006.
- Petit C. Genes responsible for the human hereditary deafness: symphony of a thousand. *Nature*, v. 14, p. 385-391, 1996.
- Petty RKH, Harding AE, Morgan-Hughes JA. The clinical features of mitochondrial myopathy. *Brain*, v. 109, p. 915-938, 1986.
- Pieke-Dahl S, Möller CG, Kelley PM, Astuto LM, Cremers CW, Gorin MB, Kimberling WJ. Genetic heterogeneity of Usher syndrome type II: localisation to chromosome 5q. *Journal of Medical Genetics*, v. 37, n. 4, p. 256-62, 2000.
- Pfeilsticker LN, Stole G, Sartorato EL, Delfino D, Guerra ATM. A investigação genética na surdez hereditária não-sindrômica. *Revista Brasileira de Otorrinolaringologia*, v. 70, n. 2, p. 182-186, 2004.
- Pingault V, Bondurand N, Kuhlbrodt K, Goerich DE, Préhu MO, Puliti A, Herbarth B, Hermans-Borgmeyer I, Legius E, Matthijs G, Amiel J, Lyonnet S, Ceccherini I, Romeo G, Smith JC, Read AP, Wegner M, Goossens M. SOX10 mutations in patients with Waardenburg-Hirschsprung disease Nature Genetics, v. 18, n. 2, p. 171-3, 1998.
- Prezant TR, Agapian JV, Bohlman MC, Bu X, Oztas S, Qiu WQ, Arnos KS, Cortopassi GA, Jaber L, Rotter JI. Mitochondrial ribosomal RNA mutation associated with both antibioticinduced and non-syndromic deafness. Nature Genetics, v. 4, p. 289-294, 1993.
- Puerves D, Augustine GJ, Fitzpatrick D, Katz LC, LaMantia AS, McNamara JO, Williams SM.
 The auditory system. Neuroscience. Sunderland: Sinauer Associates. 2001. Disponível
 em: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/bookshelf/br.fcgi?book=neurosci. Acesso em: Novembro/2012.
- Pulleyn LJ, Jackson AP, Roberts E, Carridice A, Muxworthy C, Houseman M, Al-Gazali LI, Lench NJ, Markham AF, Mueller RF. A new locus for autosomal recessive nonsyndromal sensorineural hearing impairment (DFNB27) on chromosome 2q23-q31. *European Journal of Human Genetics*, v. 8, n. 12, p. 991-3, 2000.
- Pupo AC, Balieiro CR, Figueiredo RSL. Retrospective study of hearing impaired children anf teenager: characterizing the etiologies and audiologic aspects. *Revista CEFAC*, v. 10, n. 1, p. 84-91, 2008.
- PyMol. Disponível em: < http://www.pymol.org/>. Acesso em: dezembro de 2012.
- Rabionet R, Gasparini P, Estivill X. Molecular genetics of hearing impairment due to mutations in gap junction genes encoding beta connexins. *Human Mutations*, v. 16, n. 3, p. 190-202, 2000.
- Ramzan K, Shaikh RS, Ahmad J, Khan SN, Riazuddin S, Ahmed ZM, Friedman TB, Wilcox ER, Riazuddin S. A new locus for nonsyndromic deafness DFNB49 maps to chromosome 5q12.3-q14.1. *Human Genetics*, v. 116, n. 1, p. 17-22, 2005.

- Reid FM, Vernham GA, Jacobs HT. A novel mitochondrial point mutation in a maternal pedigree with sensorineural deafness. *Human Mutations*, v. 3, n. 3, p. 243-7, 1994.
- Rehman AU, Gul K, Morell RJ, Lee K, Ahmed ZM, Riazuddin S, Ali RA, Shahzad M, Jaleel AU, Andrade PB, Khan SN, Khan S, Brewer CC, Ahmad W, Leal SM, Riazuddin S, Friedman TB. Mutations of *GIPC3* cause nonsyndromic hearing loss DFNB72 but not DFNB81 that also maps to chromosome 19p. *Human Genetics*, v. 130, n. 6, p. 759-65, 2011.
- Rehman AU, Morell RJ, Belyantseva IA, Khan SY, Boger ET, Shahzad M, Ahmed ZM, Riazuddin S, Khan SN, Riazuddin S, Friedman TB. Targeted capture and nextgeneration sequencing identifies C9orf75, encoding taperin, as the mutated gene in nonsyndromic deafness DFNB79. *American Journal of Human Genetics, v.* 86, n. 3, p. 378-88, 2010.
- Riazuddin S, Ahmed ZM, Fanning AS, Lagziel A, Kitajiri S, Ramzan K, Khan SN, Chattaraj P, Friedman PL, Anderson JM, Belyantseva IA, Forge A, Riazuddin S, Friedman TB. Tricellulin is a tight-junction protein necessary for hearing. *American Journal of Human Genetics*, v. 79, n. 6, p. 1040-51, 2006.
- Riazuddin S, Anwar S, Fischer M, Ahmed ZM, Khan SY, Janssen AG, Zafar AU, Scholl U, Husnain T, Belyantseva IA, Friedman PL, Riazuddin S, Friedman TB, Fahlke C.
 Molecular basis of DFNB73: mutations of BSND can cause nonsyndromic deafness or Bartter syndrome. *American Journal of Human Genetics*, v. 85, n. 2, p. 273-80, 2009.
- Riazuddin S, Castelein CM, Ahmed ZM, Lalwani AK, Mastroianni MA, Naz S, Smith TN, Liburd NA, Friedman TB, Griffith AJ, Riazuddin S, Wilcox ER. Dominant modifier DFNM1 suppresses recessive deafness DFNB26. *Nature Genetics*, v. 26, n. 4, p. 431-4, 2000.
- Riazuddin S, Khan SN, Ahmed ZM, Ghosh M, Caution K, Nazli S, Kabra M, Zafar AU, Chen K, Naz S, Antonellis A, Pavan WJ, Green ED, Wilcox ER, Friedman PL, Morell RJ, Riazuddin S, Friedman TB. Mutations in TRIOBP, which encodes a putative cytoskeletal-organizing protein, are associated with nonsyndromic recessive deafness. *American Journal of Human Genetics*, v. 78, n. 1, p. 137-43, 2006.

- Richards AJ, Yates JR, Williams R, Payne SJ, Pope FM, Scott JD, Snead MP. A family with Stickler syndrome type 2 has a mutation in the *COL11A1* gene resulting in the substitution of glycine 97 by valine in alpha 1 (XI) collagen. *Human Molecular Genetics*, v. 5, n. 9, p. 1339-43, 1996.
- Robertson NG, Lu L, Heller S, Merchant SN, Eavey RD, McKenna M, Nadol JB Jr, Miyamoto RT, Linthicum FH Jr, Lubianca Neto JF, Hudspeth AJ, Seidman CE, Morton CC, Seidman JG. Mutations in a novel cochlear gene cause DFNA9, a human nonsyndromic deafness with vestibular dysfunction. *Nature Genetics*, v. 20, n. 3, p. 299-303, 1998.
- Roux AF, Pallares-Ruiz N, Vielle A, Faugère V, Templin C, Leprevost D, Artières F, Lina G, Molinari N, Blanchet P, Mondain M, Claustres M. Molecular epidemiology of DFNB1 deafness in France. *BMC Medical Genetics*, v. 5, n. 5, p. 1-10, 2004.
- Roux I, Safieddine S, Nouvian R, Grati M, Simmler MC, Bahloul A, Perfettini I, Le Gall M, Rostaing P, Hamard G, Triller A, Avan P, Moser T, Petit C. Otoferlin, defective in a human deafness form, is essential for exocytosis at the auditory ribbon synapse. *Cell*, v. 127, n. 2, p. 277-89, 2006.
- Ruel J, Emery S, Nouvian R, Bersot T, Amilhon B, Van Rybroek JM, Rebillard G, Lenoir M, Eybalin M, Delprat B, Sivakumaran TA, Giros B, El Mestikawy S, Moser T, Smith RJ, Lesperance MM, Puel JL. Impairment of *SLC17A8* encoding vesicular glutamate transporter-3, *VGLUT3*, underlies nonsyndromic deafness DFNA25 and inner hair cell dysfunction in null mice. *American Journal of Human Genetics, v.* 83, n. 2, p. 278-92, 2008.
- Ruf RG, Berkman J, Wolf MT, Nurnberg P, Gattas M, Ruf EM, Hyland V, Kromberg J, Glass I, Macmillan J, Otto E, Nurnberg G, Lucke B, Hennies HC, Hildebrandt F. A gene *locus* for branchio-otic syndrome maps to chromosome 14q21.3-q24.3. *Journal of Medical Genetics*, v. 40, n. 7, p. 515-9, 2003.
- Ruf RG, Xu PX, Silvius D, Otto EA, Beekmann F, Muerb UT, Kumar S, Neuhaus TJ, Kemper MJ, Raymond RM Jr, Brophy PD, Berkman J, Gattas M, Hyland V, Ruf EM, Schwartz C, Chang EH, Smith RJ, Stratakis CA, Weil D, Petit C, Hildebrandt F. *SIX1* mutations cause branchio-oto-renal syndrome by disruption of *EYA1-SIX1-DNA* complexes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 101, n. 21, p. 8090-5, 2004.

- Salam AA, Häfner FM, Linder TE, Spillmann T, Schinzel AA, Leal SM. A novel locus (DFNA23) for prelingual autosomal dominant nonsyndromic hearing loss maps to 14q21-q22 in a Swiss German kindred. *American Journal of Human Genetics*, v. 66, n. 6, p. 1984-8, 2000.
- Sánchez-Martín M, Rodríguez-García A, Pérez-Losada J, Sagrera A, Read AP, Sánchez-García I.SLUG (*SNAI2*) deletions in patients with Waardenburg disease. *Human Molecular Genetics*, v. 11, n. 25, p. 3231-6, 2002.
- Sanger F. The Croonian Lecture, 1975: Nucleotide Sequences in DNA, B191. *Proc. London: The Royal Society*, 1975.
- Sankila EM, Pakarinen L, Kääriäinen H, Aittomäki K, Karjalainen S, Sistonen P, de la Chapelle A. Assignment of an Usher syndrome type III (*USH3*) gene to chromosome 3q. *Human Molecular Genetics*, v. 4, n. 1, p. 93-8, 1995.
- Santos RL, Hassan MJ, Sikandar S, Lee K, Ali G, Martin PE Jr, Wambangco MA, Ahmad W, Leal SM. DFNB68, a novel autosomal recessive non-syndromic hearing impairment locus at chromosomal region 19p13.2. *Humans Genetics*, v. 120, n. 1, p. 85-92, 2006.
- Schraders M, Lee K, Oostrik J, Huygen PL, Ali G, Hoefsloot LH, Veltman JA, Cremers FP, Basit S, Ansar M, Cremers CW, Kunst HP, Ahmad W, Admiraal RJ, Leal SM, Kremer H. Homozygosity mapping reveals mutations of *GRXCR1* as a cause of autosomal-recessive nonsyndromic hearing impairment. *American Journal of Human Genetics*, v. 86, n. 2, p. 138-47, 2010.
- Schultz JM, Khan SN, Ahmed ZM, Riazuddin S, Waryah AM, Chhatre D, Starost MF, Ploplis B, Buckley S, Velásquez D, Kabra M, Lee K, Hassan MJ, Ali G, Ansar M, Ghosh M, Wilcox ER, Ahmad W, Merlino G, Leal SM, Riazuddin S, Friedman TB, Morell RJ. Noncoding mutations of *HGF* are associated with nonsyndromic hearing loss, DFNB39. *American Journal of Human Genetics*, v. 85, n. 1, p. 25-39, 2009.
- Schulze-Bahr E, Wang Q, Wedekind H, Haverkamp W, Chen Q, Sun Y, Rubie C, Hördt M, Towbin JA, Borggrefe M, Assmann G, Qu X, Somberg JC, Breithardt G, Oberti C, Funke H. *KCNE1* mutations cause jervell and Lange-Nielsen syndrome. *Nature Genetics*, v. 17, n. 3, p. 267-8, 1997.

- Scott DA, Wang R, Kreman TM, Sheffield VC, Karniski LP. The Pendred syndrome gene encodes a chloride-iodide transport protein. *Nature Genetics*, v. 21, n. 4, p. 440-3, 1999.
- Scott HS, Kudoh J, Wattenhofer M, Shibuya K, Berry A, Chrast R, Guipponi M, Wang J, Kawasaki K, Asakawa S, Minoshima S, Younus F, Mehdi SQ, Radhakrishna U, Papasavvas MP, Gehrig C, Rossier C, Korostishevsky M, Gal A, Shimizu N, Bonne-Tamir B, Antonarakis SE. Insertion of beta-satellite repeats identifies a transmembrane protease causing both congenital and childhood onset autosomal recessive deafness. *Nature Genetics*, v. 27, n. 1, p. 59-63, 2001.
- Selicorni A, Guerneri S, Ratti A, Pizzuti A. Cytogenetic mapping of a novel locus for type II Waardenburg syndrome. *Human Genetics*, v. 110, n. 1, p. 64-7, 2002.
- Sevior KB, Hatamochi A, Stewart IA, Bykhovskaya Y, Allen-Powell DR, Fischel-Ghodsian N, Maw MA. Mitochondrial A7445G mutation in two pedigrees with palmoplantar keratoderma and deafness. *American Journal of Medical Genetics*, v. 75, n. 2, p. 179-85, 1998.
- Shabbir MI, Ahmed ZM, Khan SY, Riazuddin S, Waryah AM, Khan SN, Camps RD, Ghosh M, Kabra M, Belyantseva IA, Friedman TB, Riazuddin S. Mutations of human TMHS cause recessively inherited non-syndromic hearing loss. *Journal of Medical Genetics*, v. 43, n. 8, p. 634-40, 2006.
- Shahin H, Walsh T, Rayyan AA, Lee MK, Higgins J, Dickel D, Lewis K, Thompson J, Baker C, Nord AS, Stray S, Gurwitz D, Avraham KB, King MC, Kanaan M. Five novel loci for inherited hearing loss mapped by SNP-based homozygosity profiles in Palestinian families. *European Journal of Human Genetics*, v. 18, n. 4, p. 407-13, 2010.
- Shahin H, Walsh T, Sobe T, Abu Sa'ed J, Abu Rayan A, Lynch ED, Lee MK, Avraham KB, King MC, Kanaan M. Mutations in a novel isoform of *TRIOBP* that encodes a filamentous-actin binding protein are responsible for DFNB28 recessive nonsyndromic hearing loss. *American Journal of Human Genetics*, v. 78, n. 1, p. 144-52, 2006.

- Shaikh RS, Ramzan K, Nazli S, Sattar S, Khan SN, Riazuddin S, Ahmed ZM, Friedman TB, Riazuddin S. A new locus for nonsyndromic deafness DFNB51 maps to chromosome 11p13-p12. *American Journal of Medical Genetics*, v. 138, n. 4, p. 392-5, 2005.
- Schraders M, Oostrik J, Huygen PL, Strom TM, van Wijk E, Kunst HP, Hoefsloot LH, Cremers CW, Admiraal RJ, Kremer H. Mutations in *PTPRQ* are a cause of autosomal-recessive nonsyndromic hearing impairment DFNB84 and associated with vestibular dysfunction. *American Journal of Human Genetics*, v. 86, n. 4, p. 604-10, 2010.
- Silman S, Silverman CA. *Auditory Diagnosis: Principles and Applications*. SingularPublishing Group, San Diego. Basic Audiology Testing; p. 10-65, 1997.
- Simões AM, Maciel-Guerra AT. A surdez evitável: predominância de fatores ambientais na etiologia da surdez neurossensorial profunda. *Jornal de Pediatria*, v. 68, n. 7-8, p. 254-257, 1992.
- Sirmaci A, Erbek S, Price J, Huang M, Duman D, Cengiz FB, Bademci G, Tokgöz-Yilmaz S, Hismi B, Ozdag H, Oztürk B, Kulaksizoglu S, Yildirim E, Kokotas H, Grigoriadou M, Petersen MB, Shahin H, Kanaan M, King MC, Chen ZY, Blanton SH, Liu XZ, Zuchner S, Akar N, Tekin M. A truncating mutation in *SERPINB6* is associated with autosomalrecessive nonsyndromic sensorineural hearing loss. *American Journal of Human Genetics*, v. 86, n. 5, p. 797-804, 2010.
- Smith RJ, Lee EC, Kimberling WJ, Daiger SP, Pelias MZ, Keats BJ, Jay M, Bird A, Reardon W, Guest M, et al. Localization of two genes for Usher syndrome type I to chromosome 11. *Genomics*, v. 14, n. 4, p. 995-1002, 1992.
- Snoeckx RL, Kremer H, Ensink RJ, Flothmann K, de Brouwer A, Smith RJ, Cremers CW, Van Camp G. A novel locus for autosomal dominant non-syndromic hearing loss, DFNA31, maps to chromosome 6p21.3. *Journal of Medical Genetics*, v. 41, n. 1, p. 11-3, 2004.
- Starkey. Primeiro Simpósio de Estudos Avançados em Audição. Universidade Estadual de Campinas. Campinas. 2009.
- Steel KP. The benefits of recycling. Science, v. 285, p. 1363–1364, 1999.

- Sue CM, Tanji K, Hadjigeorgiou G, Andreu AL, Nishino I, Krishna S, Bruno C, Hirano M, Shanske S, Bonilla E, Fischel-Ghodsian N, DiMauro S, Friedman R. Maternally inherited hearing loss in a large kindred with a novel T7511C mutation in the mitochondrial DNA tRNA(Ser(UCN)) gene. *Neurology*, v. 52, n. 9, p. 1905-1908, 1999.
- Tabatabaiefar MA, Alasti F, Shariati L, Farrokhi E, Fransen E, Nooridaloii MR, Chaleshtori MH, Van Camp G. DFNB93, a novel locus for autosomal recessive moderate-to-severe hearing impairment. *Clinical Genetics*, v. 79, n. 6, p. 594-8, 2011.
- Tamagawa Y, Kitamura K, Ishida T, Ishikawa K, Tanaka H, Tsuji S, Nishizawa M. A gene for a dominant form of non-syndromic sensorineural deafness (DFNA11) maps within the region containing the DFNB2 recessive deafness gene. *Human Molecular Genetics*, v. 5, n. 6, p. 849-52, 1996.
- Tassabehji M, Newton VE, Read AP. Waardenburg syndrome type 2 caused by mutations in the human microphthalmia (*MITF*) gene. *Nature Genetics*, v. 8, n. 3, p. 251-5, 1994.
- Tassabehji M, Read AP, Newton VE, Harris R, Balling R, Gruss P, Strachan T. Waardenburg's syndrome patients have mutations in the human homologue of the *Pax-3* paired box gene. *Nature*, v. 355, n. 6361, p. 635-6, 1992.
- Tessa A, Giannotti A, Tieri L, Vilarinho L, Marotta G, Santorelli FM. Maternally inherited deafness associated with a T1095C mutation in the mDNA. *European Journal of Human Genetics*, v. 9, n. 2, p. 147-149, 2001.
- Tiranti V, Chariot P, Carella F, Toscano A, Soliveri P, Girlanda P, Carrara F, Fratta GM, Reid FM, Mariotti C, Zeviani M. Maternally inherited hearing loss, ataxia and myoclonus associated with a novel point mutation in mitochondrial tRNASer(UCN) gene. *Human Molecular Genetics*, v. 4, n. 8, p. 1421-1427, 1995.
- Tlili A, Männikkö M, Charfedine I, Lahmar I, Benzina Z, Ben Amor M, Driss N, Ala-Kokko L, Drira M, Masmoudi S, Ayadi H. A novel autosomal recessive non-syndromic deafness locus, DFNB66, maps to chromosome 6p21.2-22.3 in a large Tunisian consanguineous family. *Human Herediraty*, v. 60, n. 3, p. 123-8, 2005.

- Tono T, Ushisako Y, Kiyomizu K, Usami S, Abe S, Shinkawa H, Komune S. Cochlear implantation in a patient with profound hearing loss with the A1555G mitochondrial mutation. *American Journal of Otology*, v. 19, n. 6, p. 754-757, 1998.
- Tulinius MH, Houshmand M, Larsson NG, Holme E, Oldfors A, Holmberg E, Wahlstrom J. De novo mutation in the mitochondrial ATP synthase subunit 6 gene (T8993G) with rapid segregation resulting in Leigh syndrome in the offspring. *Human Genetics*, v. 96, n. 3, p. 290-294, 1995.
- Tyson J, Tranebjaerg L, Bellman S, Wren C, Taylor JF, Bathen J, Aslaksen B, Sørland SJ, Lund O, Malcolm S, Pembrey M, Bhattacharya S, Bitner-Glindzicz M. *IsK* and *KvLQT1*: mutation in either of the two subunits of the slow component of the delayed rectifier potassium channel can cause Jervell and Lange-Nielsen syndrome. *Human Molecular Genetics*, v. 6, n. 12, p. 2179-85, 1997.
- Usami S, Abe S, Shinkawa H, Kimberling WJ. Sensorineural hearing loss caused by mitochondrial DNA mutations: special reference to the A1555G mutation. *Journal of Communication Disorders*, v. 31, n. 5, p. 423-435, 1998.
- Vahava O, Morell R, Lynch ED, Weiss S, Kagan ME, Ahituv N, Morrow JE, Lee MK, Skvorak AB, Morton CC, Blumenfeld A, Frydman M, Friedman TB, King MC, Avraham KB. Mutation in transcription factor *POU4F3* associated with inherited progressive hearing loss in humans. *Science*, v. 279, n. 5358, p. 1950-4, 1998.
- Van Camp G, Coucke P, Balemans W, van Velzen D, van de Bilt C, van Laer L, Smith RJ, Fukushima K, Padberg GW, Frants RR. Localization of a gene for non-syndromic hearing loss (DFNA5) to chromosome 7p15. *Human Molecular Genetics*, v. 4, n. 11, p. 2159-63, 1995.
- Van Camp G, Kunst H, Flothmann K, McGuirt W, Wauters J, Marres H, Verstreken M, Bespalova IN, Burmeister M, Van de Heyning PH, Smith RJ, Willems PJ, Cremers CW, Lesperance MM.A gene for autosomal dominant hearing impairment (DFNA14) maps to a region on chromosome 4p16.3 that does not overlap the DFNA6 *locus*. *Journal of Medical Genetics*, v. 36, n. 7, p. 532-6, 1999.

- Van Camp G, Smith RJH. Hereditary Hearing Loss Homepage. Disponível em: < http://hereditaryhearingloss.org/>. Acesso em: 11 nov 2012.
- Van Camp G, Snoeckx RL, Hilgert N, van den Ende J, Fukuoka H, Wagatsuma M, Suzuki H, Smets RM, Vanhoenacker F, Declau F, Van de Heyning P, Usami S. A new autosomal recessive form of Stickler syndrome is caused by a mutation in the *COL9A1* gene. *American Journal of Human Genetics*, v. 79, n. 3, p. 449-57, 2006.
- Van Laer L, Cryns K, Smith RJ, Van Camp G. Nonsyndromic hearing loss. *Ear and Hearing*, v. 24, n. 4, p. 275-88, 2003.
- Van Laer L, Huizing EH, Verstreken M, van Zuijlen D, Wauters JG, Bossuyt PJ, Van de Heyning P, McGuirt WT, Smith RJ, Willems PJ, Legan PK, Richardson GP, Van Camp G. Nonsyndromic hearing impairment is associated with a mutation in DFNA5. *Nature Genetics*, v. 20, n. 2, p. 194-7, 1998.
- Van Wijk E, Krieger E, Kemperman MH, De Leenheer EM, Huygen PL, Cremers CW, Cremers FP, Kremer H. A mutation in the gamma actin 1 (*ACTG1*) gene causes autosomal dominant hearing loss (DFNA20/26). *Journal of Medical Genetics*, v. 40, n. 12, p. 879-84, 2003.
- Verhoeven K, Van Camp G, Govaerts PJ, Balemans W, Schatteman I, Verstreken M, Van Laer L, Smith RJ, Brown MR, Van de Heyning PH, Somers T, Offeciers FE, Willems PJ.
 A gene for autosomal dominant nonsyndromic hearing loss (DFNA12) maps to chromosome 11q22-24. *American Journal of Human Genetics*, v. 60, n. 5, p. 1168-73, 1997.
- Verhoeven K, Van Laer L, Kirschhofer K, Legan PK, Hughes DC, Schatteman I, Verstreken M, Van Hauwe P, Coucke P, Chen A, Smith RJ, Somers T, Offeciers FE, Van de Heyning P, Richardson GP, Wachtler F, Kimberling WJ, Willems PJ, Govaerts PJ, Van Camp G. Mutations in the human alpha-tectorin gene cause autosomal dominant non-syndromic hearing impairment. *Nature Genetics*, v. 19, n. 1, p. 60-2, 1998.
- Verpy E, Leibovici M, Zwaenepoel I, Liu XZ, Gal A, Salem N, Mansour A, Blanchard S, Kobayashi I, Keats BJ, Slim R, Petit C. A defect in harmonin, a *PDZ* domain-containing

protein expressed in the inner ear sensory hair cells, underlies Usher syndrome type 1C. *Nature Genetics*, v. 26, n. 1, p. 51-5, 2000.

- Verpy E, Masmoudi S, Zwaenepoel I, Leibovici M, Hutchin TP, Del Castillo I, Nouaille S, Blanchard S, Lainé S, Popot JL, Moreno F, Mueller RF, Petit C. Mutations in a new gene encoding a protein of the hair bundle cause non-syndromic deafness at the DFNB16 locus. *Nature Genetics*, v. 29, n. 3, p. 345-9, 2001.
- Veske A, Oehlmann R, Younus F, Mohyuddin A, Müller-Myhsok B, Mehdi SQ, Gal A. Autosomal recessive non-syndromic deafness locus (DFNB8) maps on chromosome 21q22 in a large consanguineous kindred from Pakistan. *Human Molecular Genetics*, v. 5, n. 1, p. 165-8, 1996.
- Vikkula M, Mariman EC, Lui VC, Zhidkova NI, Tiller GE, Goldring MB, van Beersum SE, de Waal Malefijt MC, van den Hoogen FH, Ropers HH. Autosomal dominant and recessive osteochondrodysplasias associated with the *COL11A2* locus. *Cell*, v. 80, n.3, p. 431-7, 1995.
- Vissers LE, van Ravenswaaij CM, Admiraal R, Hurst JA, de Vries BB, Janssen IM, van der Vliet WA, Huys EH, de Jong PJ, Hamel BC, Schoenmakers EF, Brunner HG, Veltman JA, van Kessel AG. Mutations in a new member of the chromodomain gene family cause CHARGE syndrome. *Nature Genetics*, v. 36, n. 9, p. 955-7, 2004.
- Wallace DC. Diseases of the mitochondrial DNA. *Annual Review of Biochemistry*, v. 61, p. 1175-1212, 1992.
- Walsh T, Pierce SB, Lenz DR, Brownstein Z, Dagan-Rosenfeld O, Shahin H, Roeb W, McCarthy S, Nord AS, Gordon CR, Ben-Neriah Z, Sebat J, Kanaan M, Lee MK, Frydman M, King MC, Avraham KB. Genomic duplication and overexpression of *TJP2/ZO-2* leads to altered expression of apoptosis genes in progressive nonsyndromic hearing loss DFNA51. *American Journal of Human Genetics*, v. 87, n. 1, p. 101-9, 2010.
- Walsh T, Shahin H, Elkan-Miller T, Lee MK, Thornton AM, Roeb W, Abu Rayyan A, Loulus S, Avraham KB, King MC, Kanaan M. Whole exome sequencing and homozygosity mapping identify mutation in the cell polarity protein *GPSM2* as the cause of

nonsyndromic hearing loss DFNB82. *American Journal of Human Genetics*, v. 87, n. 1, p. 90-4, 2010.

- Walsh T, Walsh V, Vreugde S, Hertzano R, Shahin H, Haika S, Lee MK, Kanaan M, King MC, Avraham KB. From flies' eyes to our ears: mutations in a human class III myosin cause progressive nonsyndromic hearing loss DFNB30. *Proceedings of the National Academy* of Sciences, v. 99, n. 11, p. 7518-23, 2002.
- Wang QJ, Li QZ, Rao SQ, Lee K, Huang XS, Yang WY, Zhai SQ, Guo WW, Guo YF, Yu N, Zhao YL, Yuan H, Guan J, Leal SM, Han DY, Shen Y. AUNX1, a novel locus responsible for X linked recessive auditory and peripheral neuropathy, maps to Xq23-27.3. *Journal of Medical Genetics*, v. 43, n. 7, p. e33, 2006.
- Wang QJ, Lu CY, Li N, Rao SQ, Shi YB, Han DY, Li X, Cao JY, Yu LM, Li QZ, Guan MX, Yang WY, Shen Y. Y-linked inheritance of non-syndromic hearing impairment in a large Chinese family. *Journal of Medical Genetics*, v. 41, n. 6, p. e80, 2004.
- Waryah AM, Rehman A, Ahmed ZM, Bashir ZH, Khan SY, Zafar AU, Riazuddin S, Friedman TB, Riazuddin S. DFNB74, a novel autosomal recessive nonsyndromic hearing impairment locus on chromosome 12q14.2-q15. *Clinical Genetics*, v. 76, n. 3, p. 270-5, 2009.
- Wayne S, Der Kaloustian VM, Schloss M, Polomeno R, Scott DA, Hejtmancik JF, Sheffield VC, Smith RJ. Localization of the Usher syndrome type ID gene (*Ush1D*) to chromosome 10. *Human Molecular Genetics*, v. 5, n. 10, p. 1689-92, 1996.
- Wayne S, Robertson NG, DeClau F, Chen N, Verhoeven K, Prasad S, Tranebjärg L, Morton CC, Ryan AF, Van Camp G, Smith RJ. Mutations in the transcriptional activator *EYA4* cause late-onset deafness at the DFNA10 locus. *Human Molecular Genetics*, v. 10, n. 3, p. 195-200, 2001.
- Weil D, Blanchard S, Kaplan J, Guilford P, Gibson F, Walsh J, Mburu P, Varela A, Levilliers J,
 Weston MD, et al. Defective myosin VIIA gene responsible for Usher syndrome type 1B.
 Nature, v. 374, n. 6517, p. 60-1, 1995.
- Weil D, El-Amraoui A, Masmoudi S, Mustapha M, Kikkawa Y, Lainé S, Delmaghani S, Adato A, Nadifi S, Zina ZB, Hamel C, Gal A, Ayadi H, Yonekawa H, Petit C. Usher syndrome

type I G (*USH1G*) is caused by mutations in the gene encoding SANS, a protein that associates with the USH1C protein, harmonin. *Human Molecuar Genetics*, v. 12, n. 5, p. 463-71, 2003.

- Weil D, Küssel P, Blanchard S, Lévy G, Levi-Acobas F, Drira M, Ayadi H, Petit C. The autosomal recessive isolated deafness, DFNB2, and the Usher 1B syndrome are allelic defects of the myosin-VIIA gene. *Nature Genetics*, v. 16, n. 2, p. 191-3, 1997.
- Weston MD, Luijendijk MW, Humphrey KD, Möller C, Kimberling WJ. Mutations in the VLGR1 gene implicate G-protein signaling in the pathogenesis of Usher syndrome type II. *American Journal of Human Genetics*, v. 74, n. 2, p. 357-66, 2004.
- Weston MD, Pierce ML, Rocha-Sanchez S, Beisel KW, Soukup GA. MicroRNA gene expression in the mouse inner ear. *Brain Research*, v. 1111, n. 1, p.95-104, 2006.
- Wilch E, Azaiez H, Fisher RA, Elfebein J, Murgia A, Birkenhäger R, Bolz H, da Silva-Costa SM, Del Castilho I, Haaf T, Hoefsloot L, Kremer H, Kubisch C, Le Marechal C, Pandya A, Sartorato EL, Schneider E, Van Camp G, Wuyts W, Smith RJ, Friderici KH. A novel DFNB1 deletion allele supports the existence of a distant cis-regulatory region that controls *GJB2* and *GJB6* expression. *Clinical Genetics*, v. 78, n. 3, p. 267-274, 2010.
- Wilcox ER, Burton QL, Naz S, Riazuddin S, Smith TN, Ploplis B, Belyantseva I, Ben-Yosef T,
 Liburd NA, Morell RJ, Kachar B, Wu DK, Griffith AJ, Riazuddin S, Friedman TB.
 Mutations in the gene encoding tight junction claudin-14 cause autosomal recessive deafness DFNB29. *Cell*, v. 104, n. 1, p. 165-72, 2001.
- Wilcox SA, Saunders K, Osborn AH, Arnold A, Wunderlich J, Kelly T, Collins V, Wilcox LJ, McKinlay Gardner RJ, Kamarinos M, Cone-Wesson B, Williamson R, Dahl HH. High frequency hearing loss correlated with mutations in the *GJB2* gene. *Human Genetics*, v. 106, n. 4, p. 399-405, 2000.
- Wu BL, Lindeman N, Lip V, Adams A, Amato RS, Cox G, Irons M, Kenna M, Korf B, Raisen J,
 Platt O. Effectiveness of sequencing connexin 26 (*GJB2*) in cases of familial or sporadic childhood deafness referred for molecular diagnostic testing. *Genetics in Medicine*, v. 4, n. 4, 279-88, 2002.

- Xia J, Deng H, Feng Y, Zhang H, Pan Q, Dai H, Long Z, Tang B, Deng H, Chen Y, Zhang R, Zheng D, He Y, Xia K. A novel locus for autosomal dominant nonsyndromic hearing loss identified at 5q31.1-32 in a Chinese pedigree. *Journal of Human Genetics*, v. 47, n. 12, p. 635-40, 2002.
- Xia JH, Liu CY, Tang BS, Pan Q, Huang L, Dai HP, Zhang BR, Xie W, Hu DX, Zheng D, Shi XL, Wang DA, Xia K, Yu KP, Liao XD, Feng Y, Yang YF, Xiao JY, Xie DH, Huang JZ.
 Mutations in the gene encoding gap junction protein beta-3 associated with autosomal dominant hearing impairment. *Nature Genetics*, v. 20, n. 4, p. 370-3, 1998.
- Xiao S, Yu C, Chou X, Yuan W, Wang Y, Bu L, Fu G, Qian M, Yang J, Shi Y, Hu L, Han B, Wang Z, Huang W, Liu J, Chen Z, Zhao G, Kong X. Dentinogenesis imperfecta 1 with or without progressive hearing loss is associated with distinct mutations in DSPP. *Nature Genetics*, v. 27, n. 2, p. 201-4, 2001.
- Xin Guan M. Molecular Pathogenetic mechanism of maternally inherited deafness. *Annals of the New York Academy of Sciences*, v. 1011, p. 259-71, 2004.
- Xing G, Chen Z, Wei Q, Tian H, Li X, Zhou A, Bu X, Cao X. Maternally inherited nonsyndromic hearing loss associated with mitochondrial *12S rRNA* A827G mutation in a Chinese family. Biochemical and Biophysical Research Communications, v. 344, n. 4, 1253-7, 2006.
- Yan D, Ke X, Blanton SH, Ouyang XM, Pandya A, Du LL, Nance WE, Liu XZ. A novel locus for autosomal dominant non-syndromic deafness, DFNA53, maps to chromosome 14q11.2-q12. *Journal of Medical Genetics*, v. 43, n. 2, p. 170-4, 2006.
- Yang T, Gurrola JG, Wu H, Chiu SM, Wangemann P, Snyder PM, Smith RJ. Mutations of KCNJ10 together with mutations of *SLC26A4* cause digenic nonsyndromic hearing loss associated with enlarged vestibular aqueduct syndrome. *American Journal of Human Genetics*, v. 84, n. 5, p. 651-7, 2009.
- Yang T, Vidarsson H, Rodrigo-Blomqvist S, Rosengren SS, Enerback S, Smith RJ. Transcriptional control of *SLC26A4* is involved in Pendred syndrome and nonsyndromic enlargement of vestibular aqueduct (DFNB4). *American Journal of Human Genetics*, v. 80, n. 6, p. 1055-63, 2007.

- Yasunaga S, Grati M, Chardenoux S. *OTOF* encodes multiple long and short isoforms: genetic evidence that the long ones underlie recessive deafness DFNB9. *American Journal of Human Genetics*, v. 67, n. 3, p. 591–600, 2000.
- Yasunaga S, Grati M, Cohen-Salmon M, El-Amraoui A, Mustapha M, Salem N, El-Zir E, Loiselet J, Petit C. A mutation in *OTOF*, encoding otoferlin, a FER-1-like protein, causes DFNB9, a nonsyndromic form of deafness. *Nature Genetics*, v. 21, n. 4, p. 363-9, 1999.
- Young TL, Ives E, Lynch E, Person R, Snook S, MacLaren L, Cater T, Griffin A, Fernandez B, Lee MK, King MC. Non-syndromic progressive hearing loss DFNA38 is caused by heterozygous missense mutation in the Wolfram syndrome gene WFS1. Human Molecular Genetics, v. 10, n. 22, p. 2509-14, 2001.
- Zeilinger C, Steffens M, Kolb HA. Length of C-terminus of rCx46 influences oligomerization and hemichannel properties. *Biochimica et Biophysica Acta*, v. 1720, p. 35-43, 2005.
- Zelante L, Gasparini P, Estivill X, Melchionda S, D'Agruma L, Govea N, Milá M, Monica MD, Lutfi J, Shohat M, Mansfield E, Delgrosso K, Rappaport E, Surrey S, Fortina P. Connexin26 mutations associated with the most common form of non-syndromic neurosensory autosomal recessive deafness (DFNB1) in Mediterraneans. *Human Molecular Genetics*, v. 6, n. 9, p 1605-9, 1997.
- Zeviani M, Tiranti V, Piantadosi C. Mitochondrial disorders. *Medicine*, v. 77, p. 59-72, 1998.
- Zhao H, Li R, Wang Q, Yan Q, Deng JH, Han D, Bai Y, Young WY, Guan MX. Maternally inherited aminoglycoside-induced and nonsyndromic deafness is associated with the novel C1494T mutation in the mitochondrial *12S rRNA* gene in a large Chinese family. *American Journal of Human Genetics*, v. 74, n. 1, p. 139-152, 2004.
- Zheng J, Miller KK, Yang T, Hildebrand MS, Shearer AE, DeLuca AP, Scheetz TE, Drummond J, Scherer SE, Legan PK, Goodyear RJ, Richardson GP, Cheatham MA, Smith RJ, Dallos P. Carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 16 interacts with alpha-tectorin and is mutated in autosomal dominant hearing loss (DFNA4). *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 108, n. 10, p. 4218-23, 2011.

- Zhu M, Yang T, Wei S, DeWan AT, Morell RJ, Elfenbein JL, Fisher RA, Leal SM, Smith RJ, Friderici KH. Mutations in the gamma-actin gene (*ACTG1*) are associated with dominant progressive deafness (DFNA20/26). *American Journal of Human Genetics*, v. 73, n. 5, p. 1082-91, 2003.
- Zorzetto NL. *Anatomia da orelha. Otorrinolaringologia: princípios e prática*. Porto Alegre: Artes Médicas, p. 01-39, 2006.
- Zwaenepoel I, Mustapha M, Leibovici M, Verpy E, Goodyear R, Liu XZ, Nouaille S, Nance WE, Kanaan M, Avraham KB, Tekaia F, Loiselet J, Lathrop M, Richardson G, Petit C. Otoancorin, an inner ear protein restricted to the interface between the apical surface of sensory epithelia and their overlying acellular gels, is defective in autosomal recessive deafness DFNB22. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 99, n. 9, p. 6240-5, 2002.

ANEXOS



OFÍCIO DE ENCAMINHAMENTO DE DOCUMENTO – ADENDO

Cidade Universitária Zeferino Vaz, 13 de novembro de 2012

Ao Comitê de Ética em Pesquisa Faculdade de Ciências Médicas

Requerimento de adendo referente ao projeto principal número **396/2006**, intitulado **"ESTUDO MOLECULAR DA PERDA AUDITIVA"**, sob responsabilidade da pesquisadora Prof. Dra. Edi Lúcia Sartorato.

Solicitação da inclusão do subprojeto intitulado "OTIMIZAÇÃO DE RASTREAMENTO SIMULTÂNEO DAS PRINCIPAIS MUTAÇÕES ENVOLVIDAS NA SURDEZ NEUROSSENSORIAL SINDRÔMICA E NÃO-SINDRÔMICA UTILIZANDO A PLATAFORMA TAQMAN® OPENARRAYTM GENOTYPING", com a finalidade de mestrado, sob responsabilidade de Fábio Tadeu Arrojo Martins, biotecnólogo, aluno de Mestrado do Programa de Pós Graduação em Genética e Biologia Molecular, do Instituto de Biologia, da UNICAMP.

JUSTIFICATIVA DA INCLUSÃO: Apesar dos avanços na descoberta de genes relacionados à surdez hereditária, ainda existe uma enorme dificuldade diagnóstica devido a grande heterogeneidade genética nos casos de perda auditivas terresteres $\frac{1}{2}$

NOV 2017 Comitê de Ética em Pesquisa / FCM UNICAMP

Sd

CBMEG

Ed

Considerando que, a etiologia da surdez de origem genética representa pelo menos metade dos casos, o estabelecimento de estratégias diagnósticas ao nascimento tem grande implicação nas políticas públicas nessa área de conhecimento.

Nos casos hereditários de surdez, são muitos os genes envolvidos sendo importante, portanto, testes genéticos moleculares que possam avaliar um grande número de mutações em múltiplos genes.

Em qualquer desordem, o diagnóstico clínico é essencial para o tratamento da doença. A elucidação da base genética de uma doença humana fornece informações cruciais para o diagnóstico e a compreensão dos mecanismos de progressão dessa doença e opções de tratamento. Assim sendo, em diversos países já se considera para a incorporação de testes moleculares na triagem auditiva neonatal universal, os quais permitam identificar alterações em genes envolvidos no processo de audição, o que tem implicado em uma iminente necessidade de novas estratégias metodológicas para detecção dessas mutações.

Por sua vez, experimentos de genotipagem de SNPs, ou mesmo para rastreamento de mutações de pontos, inserções e deleções envolvidas em doenças genéticas, podem variar de acordo com a abordagem desejada, levando em consideração o custo, a plataforma utilizada e a eficiência. O uso da plataforma TaqMan® OpenArray[™] Genotyping permite analisar, em apenas uma placa, até 3072 mutações de ponto utilizando primers e sondas TaqMan® desenhadas especificamente para o ensaio desejado. Esta tecnologia tem se mostrado um método bastante interessante por ser rápido e de baixo custo para um grande número de ensaios e pacientes. Neste trabalho, será utilizada esta técnica para genar uma plataforma dedicada à surdez neurossensorial sindrômica e não-sindrômica para genotipagem de um conjunto de mutações previamente reportadas na população brasileira.

Pretende-se desenvolver um método rápido e eficaz para detecção das principais alterações em genes nucleares e mitocondriais envolvidas na surdez neurossensorial sindrômica e não-sindrômica. Posteriormente será realizada uma avaliação de custo-benefício do método desenvolvido para aplicação em diagnósticos em grande número de indivíduos, com implicações imediatas nas políticas públicas da surdez no país.



Dessa forma, o presente projeto tem como principal objetivo o desenvolvimento de uma placa de ensaios moleculares simultâneos, visando principalmente o diagnóstico etiológico nos casos de surdez genética, utilizando a plataforma TaqMan® OpenArray™ Genotyping.

Atenciosamente,

Fábio Tadeu Arrojo Martins

Ed.

Profa. Dra. Edi Lúcia Sartorato (orientadora)



FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

S www.fcm.unicamp.br/fcm/pesquisa

CEP, 27/11/12. (PARECER CEP: N° 396/2006)

PARECER

I-IDENTIFICAÇÃO:

PROJETO: "ESTUDO MOLECULAR DA PERDA AUDITIVA".

PESQUISADOR RESPONSÁVEL: Edi Lúcia Sartoro

II – PARECER DO CEP.

O Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP tomou ciência e aprova o adendo que inclui o projeto "OTIMIZAÇÃO DE RASTREAMENTO SIMULTÂNEO DAS PRINCIPAIS MUTAÇÕES ENVOLVIDAS NA SURDEZ NEUROSSENSORIAL SINDRÔMICA UTILIZANDO A PLATAFORMA TAQMAN[®] OPENARRAYTM GENOTYPING[°], com a finalidade de mestrado do aluno Fábio Tadeu Arrojo Martins, referente ao protocolo de pesquisa supracitado.

O conteúdo e as conclusões aqui apresentados são de responsabilidade exclusiva do CEP/FCM/UNICAMP e não representam a opinião da Universidade Estadual de Campinas nem a comprometem.

III – DATA DA REUNIÃO.

Homologado na XI Reunião Ordinária do CEP/FCM, em 27 de novembro de 2012.

Prof. Dr. Carlos Eduardo Steiner PRESIDENTE do COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA FCM / UNICAMP

Comitê de Ética em Pesquisa - UNICAMP Rua: Tessália Vieira de Camargo, 126 Caixa Postal 6111 13083-887 Campinas – SP

FONE (019) 3521-8936 FAX (019) 3521-7187 cep@fcm.unicamp.br