

Daniela Tiaki Uehara

Pesquisa de microrrearranjos em genes candidatos a
surdez sindrômica e não-sindrômica

São Paulo
2010

Daniela Tiaki Uehara

Pesquisa de microrrearranjos em genes candidatos a surdez sindrômica e não-sindrômica

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo, para a obtenção de Título de Mestre em Ciências, na Área de Biologia/Genética.

Orientadora: Profa. Dra. Regina Célia Mingroni Netto

São Paulo
2010

Ficha Catalográfica

Uehara, Daniela Tiaki

Pesquisa de microrrearranjos em genes
candidatos a surdez síndrômica e não-síndrômica.

88 pp.

Dissertação (Mestrado) - Instituto de
Bióciências da Universidade de São Paulo.
Departamento de Genética e Biologia Evolutiva.

1. Surdez hereditária
2. Surdez síndrômica
3. Surdez não-síndrômica
4. CNV
5. MLPA

Comissão Julgadora:

Prof(a). Dr(a).

Prof(a). Dr(a).

Profa. Dra. Regina Célia Mingroni Netto
Orientadora

*A meus pais e avós, por todo o esforço
empregado na vida para dar melhor
futuro a seus filhos.*

「学問に近道なし」

Provérbio japonés

Agradecimentos

À minha orientadora Profa. Dra. Regina Célia Mingroni Netto, por sua dedicação e confiança comigo, além da acolhida no laboratório desde meu último ano de graduação.

À Dra. Juliana Forte Mazzeu, que desde o começo do projeto me auxiliou em tudo que se referisse a MLPA e, mesmo à distância, sempre teve muita disposição para me ajudar.

À Prof. Dra. Carla Rosenberg, que concebeu e deu sugestões valiosas no decorrer deste projeto, e também à Dra. Ana Cristina Krepischi e Dra. Ana Lúcia Catelani, pela colaboração.

À Dra. Erika Freitas, que executou todos os experimentos de *array*-CGH para confirmação de nossos resultados.

À Profa. Dra. Angela Maria Vianna Morgante, pela revisão do resumo.

À Dra. Fernanda Jehee, pelas sugestões com MLPA.

Ao Dr. Alfredo Tabith Jr. e toda a equipe de profissionais da DERDIC-PUC/SP, pela avaliação audiológica de parte da casuística.

À Maria Teresa Balester de Mello Auricchio, pelo auxílio técnico e amizade.

Aos funcionários do Laboratório de Genética Humana, do Centro de Estudos do Genoma Humano, do Departamento de Genética e Biologia Evolutiva e do Instituto de Biociências da USP.

Aos meus colegas de laboratório Ana Carla, Daniel, Dayane, Karina, Lilian, Magnolia, Renata Nonose, Renata Thiele e Vítor. Agradeço em especial ao Daniel, que com muita paciência me ensinou quase todas as práticas laboratoriais logo que entrei; à Lilian e Karina, pelo apoio científico e pela grande disposição em me ajudar; e à Renata Thiele, grande companheira de esticadas no laboratório (além do agregado Gustavo).

Aos demais colegas dos laboratórios vizinhos, em especial ao Adriano, que me auxiliou nos primeiros experimentos de MLPA.

A todos os pacientes e familiares que participaram deste projeto.

Aos meus pais que, apesar de não entenderem bem o que eu fiz nesses últimos anos, nunca questionaram minhas escolhas pela prioridade que sempre deram à educação.

A todas as outras pessoas ou criaturas que passaram por minha vida e contribuíram de alguma forma para que eu realizasse este projeto.

À Profa. Dra. Mayana Zatz, coordenadora do Centro de Estudos do Genoma Humano, pela infraestrutura que permitiu a realização deste estudo.

Ao Departamento de Genética e Biologia Evolutiva e o Instituto de Biociências da USP, pela infraestrutura.

À FAPESP, pelo auxílio financeiro.

À CAPES, pela bolsa de mestrado.

Resumo

A complexidade da fisiologia da audição resulta da participação e interação de produtos de grande número de genes, razão pela qual a surdez hereditária exibe enorme heterogeneidade genética. Estudos moleculares nas duas últimas décadas permitiram a identificação de vários genes responsáveis por surdez; entretanto, muitos ainda restam ser identificados. A maioria dos estudos de mapeamento de genes de surdez até então conduzidos privilegiou estratégias que buscavam mutações de ponto. Outros mecanismos mutacionais, como deleções e duplicações, foram pouco investigados. Portanto, a contribuição das CNVs (*Copy Number Variations*) na surdez hereditária é pouco conhecida.

O objetivo desse trabalho foi identificar novos genes que possam ter papel na etiologia da surdez síndrômica ou não-síndrômica por meio da investigação de microdeleções e microduplicações em pacientes com perda auditiva. Selecionamos 25 genes candidatos (*CTTN*, *FGF3*, *FGF19*, *FOXC1*, *FOXF2*, *FOXQ1*, *IMMP2L*, *KIF5C*, *LRRN3*, *MAP1A*, *MYLK4*, *PPP3CA*, *SHANK2*, *SLC5A7*, *STRC*, *TMC1*, *TMC2*, *TMC3*, *TMC4*, *TMC5*, *TMC6*, *TMC7*, *TMC8*, *TPCN2* e *TUBB2A*) para a triagem de microrrearranjos por meio da técnica de MLPA (*Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification*). Os genes candidatos foram selecionados a partir de rearranjos detectados em um estudo prévio realizado por meio de *array*-CGH (*Array-based Comparative Genomic Hybridization*) em indivíduos com surdez síndrômica estudados em nosso laboratório, e também a partir de dados da literatura. Nossa casuística foi composta por 163 indivíduos, dos quais 74 são pacientes com surdez associada a outros sinais (síndrômicos), a maioria casos isolados, e 89 são pacientes com surdez não-síndrômica, propósitos de famílias em que segrega surdez de herança autossômica dominante ou recessiva. Desenhamos uma sonda sintética intragênica de MLPA para cada um dos genes candidatos.

Foram detectadas seis deleções em *TMC6* (3,7%), seis deleções e uma duplicação em *STRC* (4,3%) e uma duplicação em *IMMP2L* (0,6%). A triagem de alterações nesses três genes em 189 indivíduos fenotipicamente normais revelou quatro deleções em *TMC6* (2,1%), oito deleções e três duplicações em *STRC* (5,8%) e três deleções em *IMMP2L* (1,6%). Todas as alterações em *TMC6*, tanto nos casos de surdez como nos controles, eram na realidade artefatos devidos a problemas de hibridação da sonda correspondente.

No gene *STRC*, previamente já relacionado à surdez, os rearranjos nos indivíduos afetados devem se tratar de polimorfismos sem efeito fenotípico por serem muito frequentes na população. Contudo, é possível que haja nesses pacientes mutações adicionais que não puderam ser rastreadas e que poderiam contribuir ao fenótipo, em combinação com o rearranjo detectado, como já descrito em um caso da literatura. A duplicação em *IMMP2L* em uma paciente com surdez não-sindrômica, herdada da mãe igualmente afetada, mostrou-se a mais provavelmente relacionada ao fenótipo, pois o estudo complementar por meio de *array*-CGH revelou que o rearranjo inclui uma duplicação parcial da porção 3' de outro gene, *DOCK4*. O produto desse gene possui uma isoforma que se localiza nos estereocílios das células ciliadas e se liga a uma importante proteína relacionada à audição, a harmonina. Portanto, nossa hipótese é a de que a duplicação seja a causa da surdez na família e que *DOCK4* seja um novo gene responsável por surdez. A associação de *IMMP2L* com surdez é menos provável devido ao grande número de CNVs não patogênicas já descritas que incluem partes desse gene. Estudos complementares são necessários para mapear a duplicação com mais precisão. Além disso, o rastreamento de mutações em *DOCK4* em outras famílias com surdez pode vir a confirmar o possível papel desse gene na etiologia da surdez.

Abstract

Several genes contribute to the complexity of physiology of hearing. Consequently, hereditary deafness is extremely heterogeneous from the genetic point of view. In the last two decades, several genes responsible for hereditary hearing loss have been identified, but a large number of genes remains to be found, as evidenced by the unexplained cases of inherited deafness. The search for point mutations in candidate genes after mapping based on linkage studies has been the main strategy in the identification of such genes. Other mutation mechanisms, such as deletions and duplications, have been rarely investigated, and the contribution of DNA copy number variants (CNVs) to hearing loss is not well known.

This study aimed at identifying novel genes, which might play a role in the etiology of syndromic and non-syndromic deafness, through the search of gene microdeletions and microduplications. We selected 25 candidate genes (*CTTN*, *FGF3*, *FGF19*, *FOXC1*, *FOXF2*, *FOXQ1*, *IMMP2L*, *KIF5C*, *LRRN3*, *MAP1A*, *MYLK4*, *PPP3CA*, *SHANK2*, *SLC5A7*, *STRC*, *TMC1*, *TMC2*, *TMC3*, *TMC4*, *TMC5*, *TMC6*, *TMC7*, *TMC8*, *TPCN2* and *TUBB2A*) based on their involvement in microimbalances detected by Array-based Comparative Genomic Hybridization (aCGH) in a previous study of a Brazilian sample of individuals with syndromic hearing loss from our laboratory and others reported in the literature. We studied 163 subjects, 74 of them presenting syndromic deafness, the majority were isolated cases, and 89 being probands of families in which nonsyndromic deafness had an autosomal dominant or recessive mode of inheritance. Gene deletions or duplications were screened by Multiplex Ligand-dependent Probe Amplification (MLPA) using one synthetic intragenic probe designed for each candidate gene.

We detected six deletions in *TMC6* (3,7%), six deletions and one duplication in *STRC* (4,3%), and one duplication in *IMMP2L* (0,6%). The screening of imbalances in these genes in a control sample of 189 hearing individuals revealed four deletions in *TMC6* (2,1%), eight deletions and three duplications in *STRC* (5,8%) and three deletions in *IMMP2L* (1,6%). The imbalances found in *TMC6*, both in affected and control individuals, were in fact artifacts due to problems in the hybridization of the corresponding probe. As to the *STRC* gene, previously related to deafness, the imbalances are more likely to be

polymorphisms with no phenotypic effect. However, the possibility remains that additional undetected mutations in affected individuals contribute to their phenotype, in combination with the microrearrangement, as already reported in the literature. The duplication in *IMMP2L* in a non-syndromic patient, and also present in her affected mother, is most likely causative of deafness, since a complementary study performed with aCGH revealed that the rearrangement included a partial duplication of the 3' end of another gene, *DOCK4*. An isoform of the DOCK4 protein localizes to the stereocilia in the inner ear and interacts with harmonin, a protein already known to be involved in hearing. We hypothesize that this duplication may be the cause of deafness in the family and, this being the case, *DOCK4* appears as a novel deafness gene. The causal association between *IMMP2L* and deafness is less plausible, because of the large number of reported non-pathogenic CNVs that include parts of this gene. Further studies are required to precisely map this duplication. In addition, the screening of mutations in *DOCK4* in other families with hearing impairment is required to evaluate its possible role in the etiology of deafness.

I. INTRODUÇÃO

I. INTRODUÇÃO

I.1. Fisiologia da audição

As informações que se seguem acerca da fisiologia da audição foram resumidas a partir da revisão de Dror e Avraham (2009) e do capítulo “The Auditory System”, da 2ª edição do livro “Neuroscience”, editado por Purves e col. (2001) e disponível no *NCBI Bookshelf* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/bookshelf/br.fcgi?book=neurosci>).

O sistema auditivo transforma as ondas sonoras em padrões distintos de atividade neural, que se integram às informações vindas de outros sistemas sensoriais para gerar respostas. O primeiro estágio dessa transformação se dá nas orelhas externa e média, locais onde ocorre a captação do som e amplificação da pressão sonora, de modo que essa energia possa ser transmitida com sucesso para a orelha interna. Na orelha interna, uma série de processos bioquímicos decompõe o estímulo original em elementos mais simples, de maneira que informações sobre frequência, amplitude e fase são transduzidos por células especializadas e convertidas em atividade elétrica para as fibras do nervo acústico.

Nesse processo tem papel central a cóclea, estrutura que se localiza na orelha interna. A cóclea é um canal ósseo-membranoso em formato de caracol e dividido em três compartimentos preenchidos por fluidos: as escalas média, vestibular e timpânica. A escala média contém o órgão de Corti, que é a porção sensorial propriamente dita do sistema auditivo. Esse órgão, situado na membrana basilar, é constituído por células de suporte e por aproximadamente 16.000 células sensoriais denominadas células ciliadas. Essas podem ser de dois tipos, internas e externas. A porção apical das células ciliadas contém projeções especializadas ricas em actina denominadas estereocílios. Uma membrana acelular, denominada tectória, cobre o epitélio de células ciliadas. A Fig. 1 traz uma ilustração esquemática da cóclea e detalhe de suas porções, evidenciando a localização das células ciliadas do órgão de Corti e dos estereocílios.

Quando o som é captado, fluidos se movem pela escala média e fazem vibrar a membrana basilar e a membrana tectória. As vibrações são o gatilho para a deflexão dos

estereocílios, permitindo o influxo de íons potássio por meio da abertura de canais que irão despolarizar a membrana das células ciliadas internas. Essa despolarização provoca a liberação de vesículas contendo neurotransmissores nas células ciliadas internas ou externas que irão desencadear o impulso nervoso e assim transmitir a informação ao cérebro via nervo acústico.

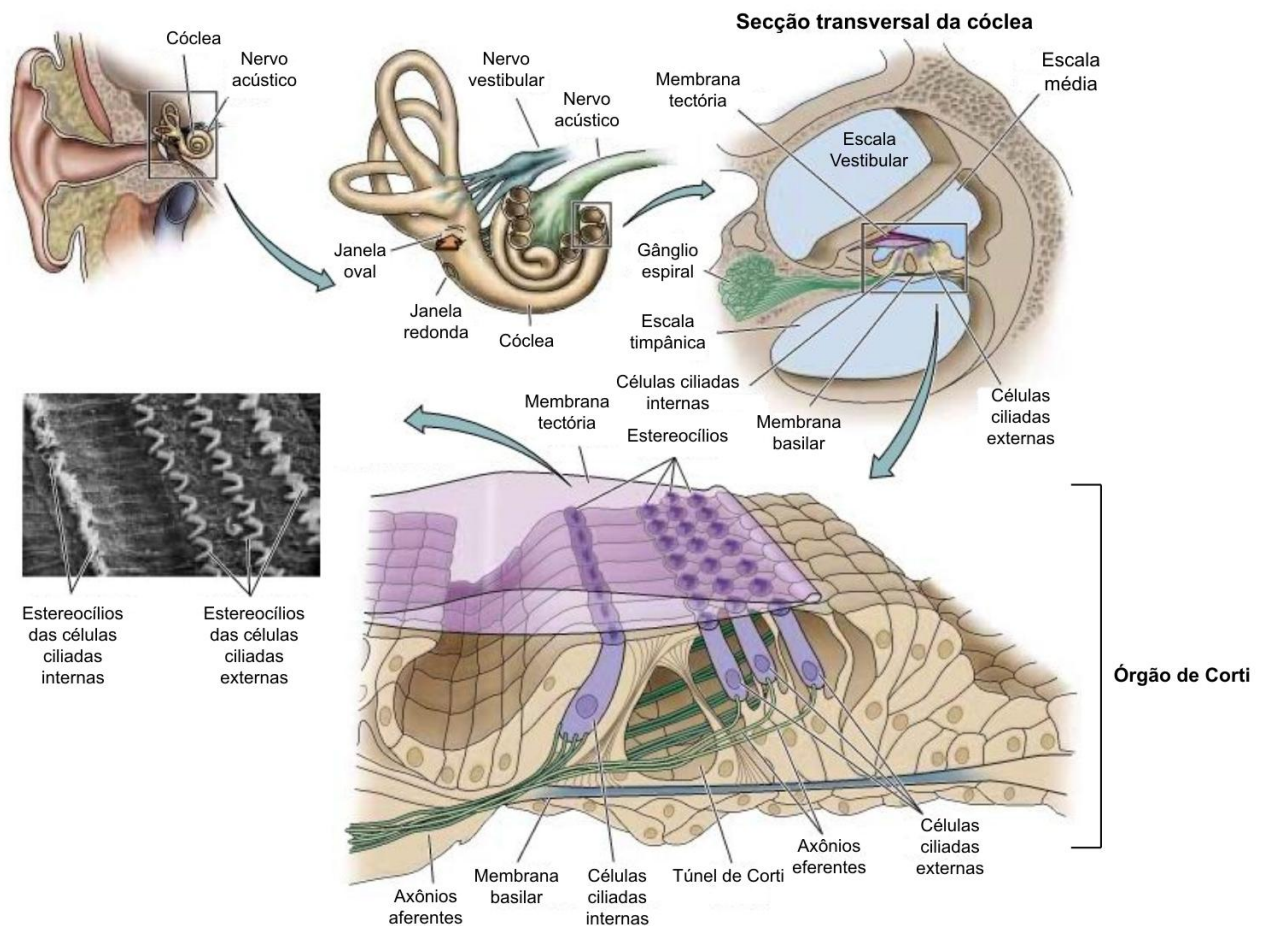


Fig. 1. Ilustração esquemática da cóclea e sua seção transversal. Em destaque, esquema detalhado do órgão de Corti e micrografia dos estereocílios das células ciliadas (Fonte: “The inner ear”, capítulo “The auditory system” do livro “Neuroscience”, disponível no *NCBI Bookshelf* - <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/bookshelf/br.fcgi?book=neurosci&part=A894>).

I.2. A deficiência auditiva

A deficiência ou perda auditiva é a condição na qual existe uma incapacidade parcial ou total de detecção ou percepção do som. É considerada o distúrbio sensorial mais prevalente em humanos e pode ser resultante de causas genéticas, ambientais ou de ambas (Hutchin e Cortopassi, 2000). A audição é fundamental para que ocorra o desenvolvimento da fala e do aprendizado da criança. Portanto, a perda ou a diminuição da capacidade auditiva pode comprometer seriamente a aquisição da linguagem e a capacidade de comunicação. Aproximadamente 70 milhões de pessoas no mundo inteiro sofrem desse distúrbio e é estimado que cerca de 30% dos adultos exibirão perda auditiva significativa a partir dos 65 anos de idade (Hutchin e Cortopassi, 2000). Em países desenvolvidos, aproximadamente uma a cada 1.000 crianças nasce com deficiência auditiva grave o suficiente para requerer educação especial, sendo que em 50-60% dos casos, a deficiência é devida a causas genéticas e, em 40-50% dos casos, é adquirida devido a causas ambientais (Finsterer e Fellingner, 2005). Os fatores ambientais incluem frequente exposição a ruído, trauma acústico, infecções virais ou bacterianas e uso de drogas ototóxicas, enquanto os casos de etiologia genética ocorrem devidos a mutações em diferentes genes ou elementos regulatórios relacionados ao desenvolvimento da estrutura e função da orelha (Dror e Avraham, 2009).

No Brasil, estima-se que quatro em 1.000 indivíduos apresentem o defeito ao nascimento e, até a década de noventa, a deficiência auditiva hereditária era responsável por cerca de 16% do total de casos de surdez no país (Braga e col., 1999). Essa frequência é baixa se comparada aos países desenvolvidos, onde tal valor pode chegar a 60%. Isso se deve ao fato de que, em nosso país, a surdez decorrente de causas ambientais como rubéola materna, meningite e exposição a drogas ototóxicas ainda é mais frequente, embora esse quadro possa estar se alterando graças a melhorias na saúde pública. Entretanto, há poucos estudos epidemiológicos recentes que demonstrem tal tendência. Em um desses estudos, Nóbrega e col. (2005) compararam as principais causas de surdez em crianças atendidas no Departamento de Otorrinolaringologia e de Distúrbios da Comunicação Humana da Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP) entre os

períodos de 1990-1994 e 1994-2000, e verificaram que as frequências da surdez de etiologia genética nos dois períodos variaram de 6,9 a 14%.

Os termos “perda” ou “deficiência auditiva” são comumente utilizados para se referir a qualquer déficit ou comprometimento auditivo abaixo dos níveis considerados normais para a audição. Já o termo “surdez” implica em um comprometimento auditivo geralmente grave ou profundo (Smith e col., 2010). Utilizaremos neste trabalho, porém, os três termos como sinônimos, do mesmo modo que esses termos têm sido tratados na maioria dos trabalhos de genética, pois muitas vezes perdas genéticas com a mesma etiologia exibem gravidade de manifestação muito variável.

I.2.1. Classificação clínica

Clinicamente, a classificação da surdez pode seguir vários critérios. Em relação à manifestação clínica, a surdez é dividida em não-sindrômica, na qual se tem a surdez como único sinal clínico, sem fenótipos adicionais, e sindrômica, caracterizada por perda de audição em combinação com outras anormalidades. Quanto à idade de manifestação, a surdez é pré-lingual, quando se manifesta antes ou durante o aprendizado da linguagem, ou pós-lingual, se sua manifestação ocorre após a aquisição da linguagem.

Segundo Davis e Silverman (1970), a surdez pode ser classificada quanto ao valor dos limiares auditivos em decibéis (dB) como leve (21-40 dB), moderada (41-70 dB), grave (71-90 dB) ou profunda (>91 dB). Em relação à localização do defeito, se estiver na orelha externa e/ou média, ou seja, afetar a condução do som até a orelha interna, a surdez é classificada como condutiva. Se o defeito ocorrer a partir da orelha interna até o encéfalo, por exemplo, comprometendo as células ciliadas da cóclea, o nervo acústico ou outras estruturas, é classificada como sensorineural. Existem ainda casos onde pode haver uma combinação de ambos os tipos de defeito, sendo a surdez classificada como mista.

Outro critério de classificação é a lateralidade, no qual a perda é dita unilateral quando somente uma orelha é afetada, e bilateral, quando ambas são afetadas. Por fim, quanto à evolução, a surdez pode ser chamada de estacionária quando não se altera com o tempo, ou progressiva, quando primeiramente surge como leve e evolui para um quadro mais grave ou ainda para outras frequências (revisão em Smith e col., 2010).

I.3. A deficiência auditiva de etiologia genética

A surdez de etiologia genética é um exemplo notável das doenças geneticamente heterogêneas, isto é, aquelas em que fenótipos idênticos ou similares decorrem de mutações em locos diferentes ou de diferentes mecanismos genéticos. A heterogeneidade genética pode ser classificada como alélica ou de locos. O primeiro termo é usado para se referir ao caso de mutações diferentes em um mesmo gene, e o segundo, a fenótipos clínicos semelhantes causados por mutações em diferentes locos gênicos.

A descoberta de produtos gênicos relevantes à função auditiva por meio da identificação de genes responsáveis por surdez contribuiu com uma fração considerável do conhecimento acerca da biologia molecular da orelha interna (Dror e Avraham, 2009). De acordo com a revisão de Finsterer e Fellingner (2005), estima-se que 300 a 500 genes sejam necessários à audição. Dada a complexidade da fisiologia da audição, não é de se admirar o grande número de genes relacionados e o fato de a surdez exibir uma enorme heterogeneidade genética. Em geral, os genes mutados que levam à deficiência auditiva codificam proteínas que atuam na morfogênese dos cílios das células ciliadas, proteínas relacionadas à homeostase iônica da cóclea, componentes da matriz extracelular e fatores de transcrição, entre outras funções (Hilgert e col., 2009b).

Com relação aos mecanismos de herança, é estimado que cerca de 75-80% dos casos de surdez genética não-sindrômica sejam de herança autossômica recessiva, 20-25% de herança autossômica dominante e uma pequena porcentagem de herança ligada ao X, em torno de 1 a 1,5% (revisão em Smith e col., 2010). A frequência da herança mitocondrial não é muito bem conhecida, sendo estimada em 1% dos casos genéticos (Kokotas e col, 2007).

Os diferentes locos ou regiões candidatas a conterem um ou mais genes responsáveis por surdez são designados DFN (do inglês *DeaFNes*) e numerados seguindo a ordem de descoberta. Os locos que supostamente contêm genes de surdez de herança autossômica recessiva são denominados DFNB, aqueles com padrão autossômico dominante de DFNA e os locos que estão no cromossomo X são designados DFNX. Segundo o *Hereditary Hearing Loss Homepage* (<http://hereditaryhearingloss.org/>), de Van Camp e Smith (última atualização em outubro de 2010), até o momento, 61 locos de

surdez não-sindrômica de herança autossômica recessiva foram mapeados com a identificação de 36 genes, 49 locos foram mapeados com 24 genes identificados para a herança autossômica dominante e, para a herança ligada ao X, cinco locos foram mapeados com a identificação de dois genes. Adicionalmente, dois locos identificados como genes modificadores também já foram mapeados. Em relação à herança mitocondrial, dois principais genes foram identificados e muitas mutações diferentes nesses genes foram relacionadas à surdez hereditária não-sindrômica.

Além do enorme número de genes relacionados com a surdez, outros fatores contribuem para aumentar a complexidade da genética da audição: em um mesmo gene, existem mutações que estão associadas a diferentes padrões de herança. Por exemplo, diferentes mutações que ocorrem nos genes *GJB2*, *GJB6*, *MYO7A*, *TECTA* e *TMC1* têm comportamento dominante ou recessivo. Estudos moleculares também têm demonstrado que diferentes mutações no mesmo gene podem causar surdez sindrômica e não-sindrômica, como é o caso dos genes *SLC26A4*, *USH1C* e *WFS1* (Smith e col., 2010). Dessa maneira, fica evidente a grande heterogeneidade genética da surdez.

A surdez também pode ser de origem multifatorial ou complexa, resultando da interação de vários fatores genéticos e ambientais. Um exemplo é a presbiacusia, que é a diminuição da capacidade auditiva relacionada ao envelhecimento. Até o momento, poucos genes foram associados a esse tipo de surdez. Não se sabe se genes relacionados a formas monogênicas de surdez também podem estar associados à surdez de mecanismo multifatorial (Hilgert e col., 2009b).

I.3.1. Surdez não-sindrômica

Apesar de a surdez estar relacionada a várias doenças e síndromes que têm o distúrbio como um de seus sinais clínicos, 70% dos casos de surdez hereditária são não-sindrômicos (Keats e Berlin, 1999). No total, foram identificados até o momento 56 genes responsáveis por surdez não-sindrômica. Entretanto, eles correspondem somente a cerca de metade do total de locos já mapeados, pois muitos locos ainda não tiveram seus genes identificados. A Tabela I lista os 56 genes já conhecidos e a função de seus produtos no processo da audição.

Tabela I. Genes de surdez não-sindrômica e função dos produtos no processo da audição (modificado de Hilgert e col., 2009a).

Gene	Loco	Função do produto na audição
Herança autossômica recessiva ou dominante		
<i>GJB2</i>	DFNB1/DFNA3A	Homeostase iônica
<i>TMC1</i>	DFNB7/DFNB11/DFNA36	Função desconhecida
<i>TECTA</i>	DFNB21/DFNA8/DFNA12	Proteína da matriz extracelular
<i>MYO7A</i>	DFNB2/DFNA11	Proteína motora dos estereocílios
<i>GJB6</i>	DFNB1/DFNA3B	Homeostase iônica
<i>MYO6</i>	DFNB37/DFNA22	Proteína motora dos estereocílios
<i>GJB3</i>	- /DFNA2B	Homeostase iônica
<i>COL11A2</i>	DFNB53/DFNA13	Proteína da matriz extracelular
Herança autossômica recessiva		
<i>SLC26A4</i>	DFNB4	Homeostase iônica
<i>MYO15A</i>	DFNB3	Proteína motora dos estereocílios
<i>OTOF</i>	DFNB9	Exocitose nas vesículas sinápticas das células ciliadas internas
<i>CDH23</i>	DFNB12	Proteína de adesão dos estereocílios
<i>TMPRSS3</i>	DFNB8/10	Função desconhecida
<i>TRIOBP</i>	DFNB28	Formação do citoesqueleto dos estereocílios
<i>TMIE</i>	DFNB6	Função desconhecida
<i>PJVK</i>	DFNB59	Sinalização de células ciliadas e neurônios
<i>ESPN</i>	DFNB36	Formação do citoesqueleto dos estereocílios
<i>PCDH15</i>	DFNB23	Proteína de adesão dos estereocílios
<i>ESRRB</i>	DFNB35	Fator de transcrição
<i>MARVELD2</i>	DFNB49	Homeostase iônica
<i>LHFPL5</i>	DFNB67	Proteína de adesão dos estereocílios
<i>STRC</i>	DFNB16	Proteína da matriz extracelular
<i>CLDN14</i>	DFNB29	Homeostase iônica

Tabela I (continuação)

Gene	Loco	Função do produto na audição
<i>RDX</i>	DFNB24	Formação do citoesqueleto dos estereocílios
<i>MYO3A</i>	DFNB30	Proteína motora dos estereocílios
<i>SLC26A5</i>	DFNB61	Motor molecular de células ciliadas externas
<i>WHRN</i>	DFNB31	Proteína do arcabouço protéico dos estereocílios
<i>USH1C</i>	DFNB18	Proteína do arcabouço protéico dos estereocílios
<i>OTOA</i>	DFNB22	Proteína da matriz extracelular
<i>GRXCR1</i>	DFNB25	Função desconhecida
<i>LOXHD1</i>	DFNB77	Feixe de estereocílios
<i>TPRN</i>	DFNB79	Feixe de estereocílios
<i>GPSM2</i>	DFNB82	Proteína transmembrânica
<i>PTPRQ</i>	DFNB84	Sinalização celular
<i>HGF</i>	DFNB39	Sinalização celular
<i>LRTOMT</i>	DFNB63	Função desconhecida
Herança autossômica dominante		
<i>WFS1</i>	DFNA6/14/38	Homeostase iônica
<i>KCNQ4</i>	DFNA2A	Homeostase iônica
<i>COCH</i>	DFNA9	Proteína da matriz extracelular
<i>MYO1A</i>	DFNA48	Função desconhecida
<i>ACTG1</i>	DFNA20/26	Formação do citoesqueleto dos estereocílios
<i>EYA4</i>	DFNA10	Fator de transcrição
<i>MYH14</i>	DFNA4	Função desconhecida
<i>DFNA5</i>	DFNA5	Função desconhecida
<i>POU4F3</i>	DFNA15	Fator de transcrição
<i>CRYM</i>		Homeostase iônica
<i>TFCP2L3</i>	DFNA28	Fator de transcrição
<i>MYH9</i>	DFNA17	Proteína motora dos estereocílios

Tabela I (continuação)

Gene	Loco	Função do produto na audição
<i>CCDC50</i>	DFNA44	Formação do citoesqueleto dos estereocílios
<i>DLAPH1</i>	DFNA1	Formação do citoesqueleto dos estereocílios
<i>MIRN96</i>	DFNA50	Regulação da expressão gênica
<i>TJP2</i>	DFNA51	Manutenção de diferença de potencial elétrico
Herança ligada ao X		
<i>POU3F4</i>	DFNX2	Fator de transcrição
<i>PRPS1</i>	DFNX1	Metabolismo de purina e biossíntese de nucleotídeos
Herança mitocondrial		
<i>MT-RNR1</i>	12S RNAr	RNA ribossômico mitocondrial
<i>MT-TS1</i>	RNA _t ^{Ser(UCN)}	RNA transportador mitocondrial

I.3.1.1. Herança autossômica recessiva

Cerca de 80% dos casos de surdez não-sindrômica apresentam herança autossômica recessiva. As perdas auditivas com esse padrão de herança são geralmente sensorineurais, de manifestação pré-lingual, de graves a profundas, geralmente atingem todas as frequências e são estacionárias (Keats e Berlin, 1999).

No caso da surdez não-sindrômica tem grande destaque o gene *GJB2*, no loco DFNB1, relacionado tanto com formas dominantes quanto recessivas de surdez não-sindrômica. Este gene codifica a conexina 26, um membro da família das conexinas, proteínas que são componentes estruturais das junções comunicantes intercelulares do tipo “fenda” (*gap junctions*) e às quais se atribui um papel importante em vários processos de transdução auditiva, como a reciclagem dos íons potássio na endolinfa e a troca de metabólitos entre as células de suporte (Mese e col., 2004). Mutações no gene *GJB2* podem alterar a função da conexina 26 ao acarretar deficiência no fluxo de potássio e desta forma

levar à morte celular e conseqüentemente à perda auditiva, uma vez que níveis elevados de potássio podem afetar a função e a sobrevivência das células de suporte necessárias à audição (Rabionet e col., 2000). O fenótipo mais comum associado a mutações nesse gene é caracterizado por surdez profunda e pré-lingual. Mutações neste gene são responsáveis por até 80% dos casos de surdez hereditária com padrão de herança autossômico recessivo. A mutação mais frequente é a c.35delG, que requer homozigose para sua manifestação. Trata-se do genótipo mais comum em 75% dos casos de mutações nesse gene (Wilcox e col., 1999). Por esta razão, mutações no gene *GJB2* são alvo de intenso estudo molecular e constituem o primeiro passo na triagem de mutações relacionadas à perda auditiva.

Outro gene de destaque, presente no mesmo loco DFNB1, é o *GJB6*, o qual codifica outra proteína das junções do tipo “fenda”, a conexina 30. Os genes *GJB2* e *GJB6* estão na mesma região cromossômica, 13q11-12, cerca de 35 kb um do outro e expressam proteínas com 77% de identidade de seqüência entre elas (Pallares-Ruiz e col., 2002). Grandes deleções como a del(*GJB6*-D13S1830), de cerca de 342 kb, e del(*GJB6*-D13S1854), de cerca de 309 kb, são encontradas em associação com mutações no gene *GJB2*, levando à deficiência auditiva (del Castillo e col., 2002; del Castillo e col., 2005). Existe ainda um caso descrito de um paciente portador da mutação p.V84M no gene *GJB2* e uma enorme deleção de pelo menos 920 kb que removeu os genes *GJB2* e *GJB6* no alelo em *trans* (Feldmann e col., 2009). Porém, uma porcentagem significativa de portadores de mutações em heterozigose no gene *GJB2* não possui nenhuma dessas grandes deleções, o que sugere que devem existir outras mutações não identificadas presentes no loco DFNB1 (Hilgert e col., 2009a).

Mais recentemente, Wilch e col. (2010) descreveram uma nova deleção no loco DFNB1 que evidencia a existência de uma região regulatória *in cis* que controla a expressão dos genes *GJB2* e *GJB6*. A deleção, de 131,4 kb, e cujo ponto de quebra proximal dista mais de 100 kb de *GJB2* e *GJB6*, foi encontrada em quatro indivíduos heterozigotos para a mutação c.35delG e que apresentavam níveis reduzidos de expressão do RNAm de ambos os genes do alelo em *trans*. Outra deleção com tamanho em torno de 200 kb em DFNB1, que não envolve nem *GJB2* nem *GJB6*, foi encontrada em indivíduos heterozigotos para a mutação c.35delG em *GJB2*, sugerindo novamente que essas deleções

estejam eliminando um elemento regulatório essencial à expressão de *GJB2* na orelha interna (del Castillo e col., 2009).

A pesquisa das deleções em *GJB6* está indicada, portanto, em pacientes com surdez, principalmente se apresentarem uma mutação única no gene *GJB2*.

I.3.1.2. Herança autossômica dominante

A surdez não-sindrômica de herança autossômica dominante corresponde a 20-25% dos casos de surdez hereditária, sendo majoritariamente de manifestação pós-lingual, progressiva e sensorineural. Até o momento não se observou um gene que esteja mais frequentemente associado à surdez com esse tipo de herança, da maneira como ocorre com o gene *GJB2* na herança autossômica recessiva. No entanto, os locos com maior número de famílias descritas são o DFNA2A e o DFNA9, onde se localizam respectivamente os genes *KCNQ4* e *COCH*.

I.3.1.3. Herança ligada ao X

A contribuição da herança ligada ao cromossomo X à surdez hereditária é estimada em 1 a 1,5%. O loco mais frequentemente associado a casos de surdez com esse tipo de herança é o DFNX2, com surdez do tipo mista e associada à fixação do estribo. Neste loco reside o gene *POU3F4*, o qual codifica um fator de transcrição (Willems e col., 2000).

I.3.1.4. Herança mitocondrial

A surdez hereditária de herança mitocondrial está geralmente associada a genes que codificam componentes do aparato de síntese protéica mitocondrial, isto é, RNAs ribossômicos e RNAs transportadores. Existem dois genes principais que foram relacionados à surdez mitocondrial não-sindrômica devidos ao grande número de mutações descritas: o gene *MT-RNR1*, que codifica a subunidade 12S RNAr, e o *MT-TS1*, que codifica o RNAt^{Ser(UCN)}. A primeira mutação associada à perda auditiva não-sindrômica foi a m.1555A>G no gene *MT-RNR1*, descrita pela primeira vez em uma grande família árabe-israelense por Prezant e col. (1993). Juntamente com a mutação c.35delG do gene *GJB2*, é uma das mutações mais comuns que causam surdez. Esta mutação também tem sido encontrada em pacientes com perda auditiva após uso de antibióticos aminoglicosídeos

(Pandya e col., 1997; Estivill e col., 1998). Um estudo realizado por nosso grupo estimou que a mutação m.1555A>G foi responsável por 2% dos casos de perda auditiva estudados no laboratório (Abreu-Silva e col., 2006).

Outras mutações mitocondriais associadas à surdez não-sindrômica são m.961delTinsC(n), m.1095T>C, m.1494C>T no gene *MT-RNR1*, e as mutações m.7445A>G, m.7472insC, m.7510T>C e m.7511T>C no gene *MT-TS1* (revisão em Kokotas e col., 2007). Mutações nesse último gene, como a m.7445A>G e m.7472insC, também já foram descritas em pacientes apresentando outros sinais clínicos, como queratoderma palmoplantar e disfunções neurológicas, respectivamente.

I.3.2. Surdez sindrômica

A perda de audição pode ocorrer em associação com outros sinais clínicos sendo, nesses casos, chamada de surdez sindrômica. Existem mais de 400 síndromes que incluem a surdez como um de seus sinais clínicos. Algumas das síndromes mais frequentes que apresentam esse distúrbio como um de seus sinais mais característicos são a síndrome de Waardenburg (com defeitos de pigmentação e telecanto – OMIM #193500), a síndrome de Treacher Collins (com anormalidades craniofaciais – OMIM #154500), a síndrome de Usher (com retinose pigmentar – OMIM #276900), a síndrome de Pendred (com bócio – OMIM #274600), a síndrome de Alport (com defeitos renais – OMIM #301050) e a síndrome branquio-oto-renal (com defeitos craniofaciais e renais – OMIM #113650).

O quadro sindrômico pode ser causado por um único gene que, quando mutado, causa tanto a surdez quanto os sinais associados (como é o caso das síndromes acima citadas) ou pode ainda resultar de alterações de segmentos maiores de DNA contendo genes de surdez não-sindrômica. Nesse caso, os sinais associados seriam causados por outros genes mapeados no mesmo segmento cromossômico, caracterizando síndromes de genes contíguos. Portanto, a surdez sindrômica também pode ser resultante da deleção de genes contíguos, embora poucos casos tenham sido descritos (Zhang e col., 2007). Alguns exemplos incluem a síndrome de hiperinsulinismo infantil associado a enteropatia, surdez e tubulopatia renal (OMIM #606528), causada por deleção em 11p contendo os genes *USH1C*, *ABCC8* e *KCNJ11* (Bitner-Glindzicz e col., 2000), e a síndrome HDR

(hipoparatiroidismo, surdez e displasia renal – OMIM #146255), causada por uma deleção em 10p13-14 (Lichtner e col., 2000).

I.4. Variações no número de cópias e doenças genéticas

Há muito tempo se sabe que variações no DNA que perturbam a condição diplóide, como deleção ou duplicação de material genômico, podem ter como consequência um fenótipo anormal. Além das alterações cromossômicas detectáveis pela análise citogenética convencional, são conhecidas desde a década de 80 algumas síndromes de deleção ou duplicação submicroscópicas (revisão em Stankiewicz e Lupski, 2010). Por exemplo, a microdeleção em 15q11.2q12 como causa da síndrome de Prader-Willi foi identificada em 1981 (Ledbetter e col., 1981), e em 1991 foi identificada a primeira microduplicação em pacientes com a doença de Charcot-Marie-Tooth tipo 1A (Lupski e col., 1991).

As alterações no número de cópias compreendendo pequenos segmentos, isto é, de 1 kb a alguns Mb, têm tido grande destaque nos cinco últimos anos, pois se descobriu que elas estão amplamente presentes e dispersas por todo o genoma humano e, portanto, constituem grande fonte de diversidade genética (revisão em Zhang e col., 2009). Esse conhecimento foi possível com o advento e a ampla difusão de modernas ferramentas de investigação do genoma humano, como por exemplo, a técnica de *array*-CGH (*Array-based Comparative Genomic Hybridization*). Essa técnica, que estima o número de cópias de DNA simultaneamente em milhares de sequências-alvo do genoma, possibilitou a descoberta dessas extensas variações genômicas estruturais, as quais foram chamadas de CNVs (*Copy Number Variations*). O termo CNV foi formalizado por Feuk e col. (2006), que o definiram como um segmento de DNA cujo tamanho varia de 1 kb a vários Mb e que está presente em número variável de cópias em comparação a um genoma de referência.

A vários mecanismos, como NAHR (*Nonallelic Homologous Recombination*), NHEJ (*Nonhomologous End-Joining*), retrotransposição e, mais recentemente, FoSTeS (*Fork Stalling and Template Switching*), são atribuídas as origens desses rearranjos genômicos e formação das CNVs, que podem ser deleções, duplicações, triplicações e inserções (revisão em Stankiewicz e Lupski, 2010). As CNVs podem englobar parte ou um gene por inteiro, ou

podem constituir um segmento contendo vários genes ou ainda elementos regulatórios. Por essa razão, acredita-se que muitas delas desempenhem um papel na alteração de funções fisiológicas, podendo contribuir ao desenvolvimento de doenças. As CNVs intragênicas ou que abrangem um único gene podem ter consequências funcionais similares às mutações de ponto patogênicas, enquanto as CNVs maiores podem compreender múltiplos genes e acarretar síndromes de genes contíguos (revisão em Lee e Scherer, 2010). Alguns exemplos de CNVs relacionadas a doenças de herança mendeliana estão listadas na Tabela II.

Tabela II. Exemplos de CNVs relacionadas a doenças de herança mendeliana (modificado de Zhang e col., 2009).

Doença/Síndrome	Loco	Rearranjo	Gene(s)
Gaucher	1q21	del	<i>GBA</i>
Smith-Magenis	17p11.2	del	SGC incluindo <i>RAI1</i>
Potocki-Lupski	17p11.2	dup	<i>RAI1</i>
Charcot-Marie-Tooth tipo 1A	17p12	dup	<i>PMP22</i>
DiGeorge/Velo-Cardio-Facial	22q11.2	del	SGC incluindo <i>TBX1</i> , <i>COMT</i>
Pelizaeus-Merzbacher	Xq22.2	del/dup	<i>PLP1</i>
Hemofilia A	Xq28	inv/del	<i>F8</i>
Nanismo pituitário	17q24	del	<i>GH1</i>
Atrofia muscular espinhal	5q13	del	<i>SMN1</i>

Del: deleção; dup: duplicação; inv: inversão; SGC: síndrome de genes contíguos.

O principal mecanismo pelo qual esses rearranjos desencadeiam quadros clínicos é a modificação da dosagem gênica, isto é, quando a região deletada ou duplicada contém um ou mais genes cujos efeitos são sensíveis à dosagem. Outros mecanismos que podem deflagrar fenótipos são a ruptura de regiões codificadoras ou de regiões regulatórias.

As CNVs podem ser responsáveis por defeitos ou doenças esporádicas, doenças de herança mendeliana e também já foram associadas à susceptibilidade de doenças de mecanismo multifatorial. Como exemplos do último caso, tem-se a associação entre o número de cópias e aumento na susceptibilidade à infecção pelo vírus HIV-1/AIDS, à doença de Crohn e a lúpus eritematoso sistêmico (Gonzalez e col., 2005; Fellermann e col., 2006; McCarroll e col., 2008).

A extensa aplicação nos últimos anos da técnica de *array*-CGH também demonstrou que genomas de indivíduos aparentemente saudáveis apresentam normalmente centenas de regiões genômicas que variam significativamente em número de cópias (Iafrate e col., 2004; Sebat e col., 2004, Redon e col., 2006). Portanto, existem muitas CNVs que, apesar de englobarem um ou mais genes, não possuem nenhum efeito fenotípico aparente. Não estão claros ainda os mecanismos que levam algumas CNVs a terem um efeito fenotípico enquanto outras parecem não ter significado clínico. Dessa forma, um dos grandes desafios atuais consiste em distinguir as CNVs provavelmente patogênicas daquelas presentes na população geral (isto é, benignas), o que implica na necessidade de um estudo cuidadoso antes de se associar uma CNV à causa ou predisposição a uma determinada doença.

Para auxiliar na interpretação do significado de uma CNV, vários critérios foram propostos. Por exemplo, CNVs *de novo* são mais prováveis de ser as responsáveis por um determinado fenótipo clínico, ao contrário de uma CNV herdada de um genitor não afetado. Outro critério importante é observar se uma CNV encontrada se sobrepõe a algum rearranjo já catalogado em bancos de dados que compilam CNVs presentes na população geral (como o DGV - *Database of Genomic Variants* - <http://projects.tcag.ca/variation/>) ou em bancos de dados que compilam CNVs clinicamente relevantes (como o DECIPHER - *Database of Chromosomal Imbalance and Phenotype in Humans using Ensembl Resources* - <http://decipher.sanger.ac.uk>). Demais critérios estão listados na Tabela III.

I.5. Técnicas de análise genética de alta resolução: *Array*-CGH e MLPA

O mapeamento dos genes constitui uma etapa importante na compreensão da biologia de uma doença genética. A identificação dos genes causadores de uma doença pode tornar possível a realização de testes de diagnóstico para mutações específicas, de suma importância no aconselhamento genético das famílias com a doença (Keats, 2002).

Tabela III. Principais critérios para a avaliação do significado de uma CNV (Lee e col., 2007).

Critérios principais	Característico de CNVs patogênicos	Característico de CNVs benignos
1. a. A CNV é herdada de um genitor saudável		x
b. A CNV é herdada de um genitor afetado	x	
2. a. A CNV é similar a uma CNV presente em um parente saudável		x
b. A CNV é similar a uma CNV presente em um parente afetado	x	
3. a. A CNV se sobrepõe a um rearranjo genômico catalogado em um banco de dados de CNVs de indivíduos saudáveis (por exemplo, DVG)		x
b. A CNV se sobrepõe a um rearranjo genômico catalogado em um banco de dados de CNVs de indivíduos afetados (por exemplo, DECIPHER)	x	
4. A CNV contém genes já relacionados a doenças	x	
5. a. A CNV é rica em genes	x	
b. A CNV é pobre em genes		x
Critérios secundários		
1. a. A CNV é uma deleção	x	
b. A CNV é uma deleção em homozigose	x	
2. a. A CNV é uma duplicação		x
b. A CNV é uma amplificação (ganho de mais de uma cópia)	x	
3. A CNV é maior que 3 Mb	x	
4. A CNV é desprovida de elementos regulatórios conhecidos		x

O mapeamento genético é frequentemente realizado por meio de duas estratégias principais: correlações entre alterações cromossômicas associadas a fenótipos anormais e estudos de ligação em grandes famílias apresentando vários indivíduos afetados. Na primeira estratégia, a presença de alterações cromossômicas associadas a fenótipos anormais sugere que os pontos de quebra, a monossomia ou a duplicação de segmentos possam estar interferindo na expressão de um ou mais genes, o que explicaria a doença observada. Após a identificação do cromossomo portador de uma alteração, faz-se uso de técnicas citogenéticas e moleculares para refinar a localização do rearranjo e deduzir quais são os genes provavelmente envolvidos.

As técnicas citogenéticas clássicas, que incluem bandamento cromossômico, possuem resolução que não permite detectar aberrações menores que 4-10 Mb. Por esta razão, nos últimos anos têm sido desenvolvidas e utilizadas técnicas com maior poder de resolução, tais como FISH (*Fluorescent "in situ" Hybridization*), CGH (*Comparative Genomic Hybridization*), *array*-CGH e MLPA (*Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification*). Por constituírem ferramentas relevantes para a compreensão deste trabalho, as duas últimas técnicas serão explicadas com maior detalhe.

I.5.1. *Array*-CGH

A técnica de *array*-CGH permite analisar alterações em número de cópias (deleções ou duplicações) simultaneamente em milhares de sequências-alvo do genoma e tem como base a técnica de hibridação comparativa do genoma (CGH) previamente descrita por Kallioniemi e col. (1992), a qual utilizava cromossomos metafásicos. A técnica de *array*-CGH utiliza como alvo de hibridação um conjunto de sondas organizadas em alta densidade em uma lâmina de vidro. A resolução do método é determinada pela distância entre os clones e o tamanho dos fragmentos de DNA clonados. O DNA genômico que se pretende estudar e o da amostra de referência são marcados e os sinais fluorescentes são capturados por um *laser scanner*. As intensidades de DNA em cada sequência alvo são então quantificadas e permitem estimar ganhos ou perdas de segmentos cromossômicos (Carter e col., 2002; Vissers e col., 2003; Oostlander e col., 2004).

No *array*-CGH, os fragmentos clonados ou sondas de DNA têm localização previamente conhecida nos cromossomos e, dessa forma, podem ser diretamente

relacionados com a informação sobre a sequência do genoma humano disponível em bancos de dados. Além da resolução, o *array*-CGH tem como grande vantagem o fato de utilizar DNA e não metáfases de células em divisão, representando ainda uma metodologia valiosa para detectar alterações genômicas naquelas situações sugestivas de alterações cromossômicas em que anomalias não foram detectadas pela citogenética convencional.

Existem ressalvas na aplicação dessa técnica no caso de distinção de mutações *de novo* e herdadas. Parte das complicações reside no fato de que as alterações identificadas por *array*-CGH são calculadas aditivamente (isto é, com base no genoma diplóide) e essa tecnologia não fornece informações sobre rearranjos equilibrados no número de cópias. Por exemplo, uma duplicação aparentemente *de novo* pode ser, na verdade, produto de um rearranjo equilibrado herdado de um dos genitores, não detectável por *array*-CGH. Assim, quaisquer alterações detectadas por *array*-CGH devem preferencialmente ser confirmadas por técnicas moleculares alternativas como FISH, MLPA e PCR quantitativo em tempo real (Rodríguez-Revenga e col., 2007).

I.5.2. MLPA

A técnica de MLPA foi desenvolvida e descrita por Schouten e col. (2002) e permite detectar alterações no número de cópias em até 50 sequências diferentes de DNA em uma única reação de amplificação. Em outras palavras, essa técnica possibilita a identificação de duplicações e deleções em um grande número de sequências simultaneamente.

A identificação do número de cópias de uma dada sequência é efetuada por meio da hibridação de sondas específicas a essa sequência. A peculiaridade desta técnica está no fato de que não é o DNA genômico que é o alvo da amplificação por PCR, mas sim as sondas que se hibridam ao DNA e que são amplificadas. As sondas de MLPA constituem-se de dois oligonucleotídeos complementares às sequências-alvo de DNA genômico: um oligonucleotídeo sintético curto e um oligonucleotídeo sintético longo contendo um fragmento com sequência derivada de fago M13. Este último contém uma sequência *stuffer* que varia de tamanho nas diferentes sondas e que possibilita a separação dos diferentes fragmentos por eletroforese em capilar. Inicialmente, as sondas são hibridizadas à sequências-alvo no DNA e em seguida os dois oligonucleotídeos são ligados por uma ligase termostável. Após uma nova desnaturação, o fragmento formado pela junção das sondas é

então amplificado por PCR (*Polymerase Chain Reaction*). A reação de PCR é realizada com um único par de *primers*, que hibrida com todas as sondas. Por fim, os fragmentos são submetidos à eletroforese em capilar. A Fig. 2 ilustra de modo esquemático o princípio básico da reação de MLPA.

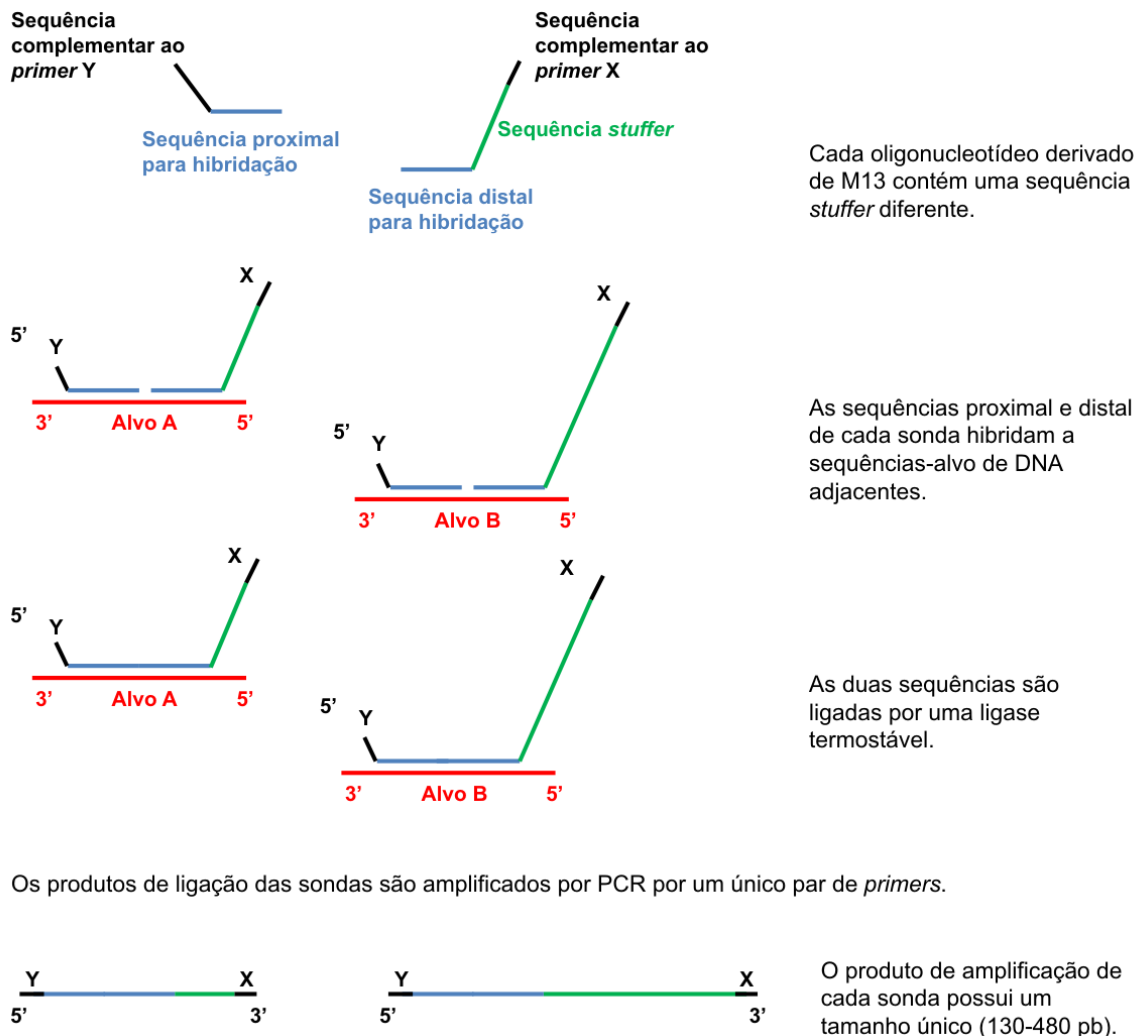


Fig. 2. Ilustração esquemática da reação de MLPA (modificado de Schouten e col., 2002).

Quando existem patologias onde o gene (ou parte dele) se encontra deletado ou duplicado, as técnicas laboratoriais de PCR e sequenciamento apresentam limitações na detecção devido à amplificação exclusiva do alelo normal na amostra ou da amplificação

simultânea de vários alelos. Nesse caso, a análise pela técnica de MLPA é uma alternativa apropriada para contornar essas limitações por permitir a identificação de deleções e duplicações. Outras vantagens da técnica de MLPA residem em sua rapidez, simplicidade, baixo custo e disponibilidade de resultados em 24 h para até 96 pacientes.

A empresa que desenvolveu a técnica de MLPA, MRC-Holland (<http://www.mrc-holland.com/>), disponibiliza centenas de *kits* de sondas para o estudo de diversas doenças genéticas ou síndromes conhecidas, como por exemplo, distrofia muscular de Duchenne, vários tipos de câncer hereditário, síndrome do cromossomo X frágil, doença de Charcot-Marie-Tooth, entre outros. Existem também *kits* para triagem de surdez genética, como por exemplo o *kit* contendo sondas para os genes *GJB2*, *GJB6*, *WFS1* e *POU3F4* e *kit* de sondas para os genes *PAX3* e *MITF*, cujas mutações são responsáveis pela síndrome de Waardenburg tipo 2 e tipo 1 e 3, respectivamente.

A técnica de MLPA possui ainda outras aplicações além da quantificação do número de cópias: também é possível quantificar a expressão gênica (RT-MLPA), detectar metilação (MS-MLPA) e identificar mutações de ponto. No entanto, ela tem sido empregada principalmente nos estudos que visam detectar alterações no número de cópias (Shen e Wu, 2009).

I.6. Justificativa do estudo

Apesar do notável avanço nos estudos sobre a surdez hereditária, sobretudo nos últimos 20 anos, ainda restam muitos genes a ser identificados como responsáveis por surdez. De fato, existem pelo menos 60 locos mapeados cujo gene ainda não foi identificado, se observarmos o *Hereditary Hearing Loss Homepage*. Existem ainda casos de surdez não-sindrômica de herança autossômica recessiva em que a segunda mutação não pôde ser identificada, como ocorre no caso dos genes *GJB2* e *OTOF*, indicando que a segunda mutação poderia se tratar de deleção ou duplicação. Além disso, a grande maioria dos estudos de mapeamento genético da surdez privilegiou a estratégia do estudo de ligação seguido de sequenciamento dos genes candidatos, que mostra principalmente mutações de ponto. Isso indica que a busca de outros mecanismos mutacionais, como

deleções ou duplicações, foram de certa forma negligenciados nos estudos conduzidos até então. Portanto, a contribuição das CNVs ainda está subestimada no estudo da surdez hereditária.

Existem poucas descrições de alterações no número de cópias já relacionadas à surdez. Dentre os genes de surdez não-sindrômica, o gene *GJB6* é o único que possui deleções documentadas, em associação a mutações de ponto no gene *GJB2*. Outro gene, *STRC*, de surdez não-sindrômica (loco DFNB16), estava incluído em deleções em homozigose presentes em duas famílias com síndrome de genes contíguos (Avidan e col., 2003; Zhang e col., 2007) e também incluído em uma deleção presente em homozigose em um paciente síndrômico (Knijnenburg e col., 2009). Na síndrome de Waardenburg, Milunsky e col. (2007) estimaram que deleções inteiras ou parciais do gene *PAX3* podem explicar aproximadamente 10% dos casos de indivíduos afetados pela síndrome do tipo 1 ou do tipo 3 que não possuem mutações identificadas por sequenciamento.

Nosso estudo teve sua origem no único trabalho na literatura que teve como abordagem buscar CNVs relacionadas à surdez. Esse trabalho, publicado pela Dra. Ana Lúcia Catelani e colaboradores (Catelani e col., 2009), originou-se de sua tese de doutoramento conduzida no Departamento de Genética e Biologia Evolutiva do Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo, sob orientação da Profa. Dra. Carla Rosenberg e com a colaboração da Profa. Dra. Regina Célia Mingroni Netto. Na tese, intitulada “Variação no número de cópias de segmentos de DNA (CNV) em pacientes com surdez síndrômica” (Catelani, 2010), foi investigada a presença de alterações cromossômicas em pacientes com surdez associada a outros sinais clínicos. O principal objetivo desse estudo foi a identificação de novas regiões cromossômicas candidatas a conter genes que venham a esclarecer os fenótipos de surdez dos pacientes. As estratégias utilizadas foram os estudos citogenéticos convencionais e de alta resolução, baseados principalmente na técnica de *array*-CGH.

A casuística de Catelani (2010) se constituiu de 31 pacientes avaliados no Serviço de Aconselhamento Genético do Laboratório de Genética Humana do IB-USP, com exceção de dois casos examinados em outros institutos. Os pacientes apresentavam surdez associada a outros sinais, cujo quadro clínico não permitiu classificar com certeza em síndrome conhecida. Nesses pacientes, as causas mais comuns de surdez não-sindrômica

foram excluídas por meio da triagem de rotina das mutações c.35delG e c.167delT no gene *GJB2*, del(*GJB6*-D13S1830) e del(*GJB6*-D13S1854) no gene *GJB6* e a mutação mitocondrial m.1555A>G. Excluídas as mutações mais frequentes, foi realizado o estudo cromossômico dos pacientes (cariótipo), e, nos casos em que o resultado do cariótipo foi normal, o DNA foi investigado para verificação de alterações no número de cópias por meio de *array*-CGH. Posteriormente, foram realizados ainda experimentos de FISH para validar a presença de deleções ou duplicações identificadas pelo *array*-CGH e também para investigar a presença de possíveis rearranjos nos genitores.

O trabalho de Catelani (2010) permitiu a detecção de algumas regiões cromossômicas rearranjadas e indicou alguns genes candidatos à surdez dentro dos rearranjos considerados como mais relevantes. Tivemos como proposta dar continuidade aos achados de Catelani, procurando identificar quais genes nesses rearranjos poderiam ter correlações mais evidentes com a surdez. No entanto, selecionamos mais genes candidatos além de alguns já apontados pelos rearranjos detectados no trabalho de Catelani (2010).

Nosso estudo pode indicar novos genes relacionados à surdez, possibilitando que sejam investigados na grande casuística de pacientes com surdez estudada em nosso laboratório. Esse estudo poderá também, no futuro, ter aplicações no diagnóstico precoce e, principalmente, no aconselhamento genético das famílias dos afetados.

IV.5. Conclusões

A partir de sete alterações detectadas por *array*-CGH em indivíduos com surdez associada a outros sinais, cujo quadro não permitiu classificar em síndrome conhecida (Catelani, 2010), e dados da literatura, selecionamos 25 genes candidatos à surdez e triamos microdeleções e microduplicações em outros pacientes com surdez síndrômica e não-síndrômica. A técnica utilizada para triagem, MLPA, mostrou-se muito eficiente e de fácil execução, razão pela qual é muito apropriada para a triagem rápida de microrrearranjos. Essa técnica também se revelou muito útil para validar e completar resultados de *array*-CGH devido à sua alta especificidade de sequência. De fato, MLPA tem sido utilizada rotineiramente por alguns centros para validar casos de alterações detectadas por *array*-CGH (Hills e col., 2010). Porém, nossa experiência revelou a necessidade de diversos cuidados na construção das sondas pois, do contrário, uma sonda pode gerar artefatos, como aconteceu no caso da sonda do gene *TMC6*.

Detectamos alterações nos genes *IMMP2L* e *STRC* em nossa casuística de 163 indivíduos, mas não nos outros 23 genes testados. É possível que alguns desses 23 genes não tenham efetivamente papel algum na audição ou que alterações no número de cópias nesses genes sejam muito raras. Além disso, devemos salientar que foi desenhada somente uma sonda por gene candidato. É possível que alguns pacientes tenham alterações em regiões desses genes não detectáveis pelas sondas que foram construídas. Entretanto, a construção de várias sondas para cada um dos 25 genes candidatos em nosso estudo teria sido de elevado custo e reduziria o número de genes triados.

As alterações detectadas na casuística que incluem os dois genes, *IMMP2L* e *STRC*, estão em regiões com grande número de CNVs polimórficas já descritas. De fato, alterações nos dois genes foram observadas em nossa amostra controle. A probabilidade de a alteração ser causa da surdez em seus portadores fica, portanto, reduzida. Porém, deve-se levar em conta que pode haver em alguns pacientes mutações de ponto que não puderam ser rastreadas e que poderiam contribuir ao fenótipo.

Nosso resultado mais notável foi o caso da duplicação que engloba parte de dois genes em 7q31.1, *IMMP2L* e *DOCK4*. Além disso, a duplicação foi herdada da mãe da proposita igualmente afetada por deficiência auditiva. O gene *DOCK4* possui uma isoforma que se localiza nos estereocílios das células ciliadas e interage com uma

importante proteína relacionada à audição, a harmonina. Essa informação é suficiente para fazer suspeitar que *DOCK4* seja um novo gene responsável por surdez. A associação de *IMMP2L* com surdez é menos provável, devido ao grande número de CNVs não patogênicas que incluem partes desse gene.

Estudos que permitam um mapeamento mais preciso dessa duplicação são necessários. Uma estratégia a ser considerada é a utilização de PCR quantitativo em tempo real, que poderia auxiliar no mapeamento dos pontos de quebra. O sequenciamento dos éxons de *DOCK4* localizados na região de 23,4 kb em que se localiza o ponto de quebra distal da duplicação também seria recomendado. Esses serão os próximos passos dessa investigação. A investigação de outras famílias estudadas em nosso laboratório - especialmente as com padrão de herança autossômica dominante - pelas mesmas técnicas mencionadas, seria igualmente indicada para confirmar o suposto papel de *DOCK4* na etologia da surdez. A confirmação de *DOCK4* como gene de surdez reforçaria os indícios de papel importante desse gene na função dos estereocílios, como já indicada por Yan e col. (2006).

Nossos resultados reiteram a validade de se buscar novos genes de doenças por meio do estudo de alterações no número de cópias. Por outro lado, também ficou evidente nesse estudo que muitos cuidados devem ser seguidos antes de se correlacionar uma CNV à causa de um determinado fenótipo.

V. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

V. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abe S, Usami S, Hoover DM, Cohn E, Shinkawa H, Kimberling WJ. Fluctuating sensorineural hearing loss associated with enlarged vestibular aqueduct maps to 7q31, the region containing the Pendred gene. *Am J Med Genet.* 82(4):322-8, 1999.
- 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. *Braz J Med Biol Res.* 39(2):219-26, 2006.
- Abreu-Silva RS, Rincon D, Horimoto AR, Sguillar AP, Ricardo LA, Kimura L, Batissoco AC, Auricchio MT, Otto PA, Mingroni-Netto RC. The search of a genetic basis for noise-induced hearing loss (NIHL). *Ann Hum Biol.* 2010 [Epub ahead of print].
- Adato A, Michel V, Kikkawa Y, Reiners J, Alagramam KN, Weil D, Yonekawa H, Wolfrum U, El-Amraoui A, Petit C. Interactions in the network of Usher syndrome type 1 proteins. *Hum Mol Genet.* 14(3):347-56, 2005.
- 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. *Nat Genet.* 40(11):1335-40, 2008.
- 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 USH1C. *Hum Genet.* 110(6):527-31, 2002.
- Avidan N, Tamary H, Dgany O, Cattan D, Pariente A, Thulliez M, Borot N, Moati L, Barthelme A, Shalmon L, Krasnov T, Ben-Asher E, Olender T, Khen M, Yaniv I, Zaizov R, Shalev H, Delaunay J, Fellous M, Lancet D, Beckmann JS. CATSPER2, a human autosomal nonsyndromic male infertility gene. *Eur J Hum Genet.* 11(7):497-502, 2003.
- Baldwin CT, Weiss S, Farrer LA, De Stefano AL, Adair R, Franklyn B, Kidd KK, Korostishevsky M, Bonn -Tamir B. Linkage of congenital, recessive deafness (DFNB4) to chromosome 7q31 and evidence for genetic heterogeneity in the Middle Eastern Druze population. *Hum Mol Genet.* (9):1637-42, 1995.
- 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 X-Z, 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. *Nat Genet.* 26:56-60, 2000.
- Braga MCC, Otto PA, Spinelli M. Recurrence Risks in cases of Nonsyndromic Deafness. *Braz J Dys and Speech-ear Dis.* 2:33-40, 1999.
- Campbell DA, McHale DP, Brown KA, Moynihan LM, Houseman M, Karbani G, Parry G, Janjua AH, Newton V, al-Gazali L, Markham AF, Lench NJ, Mueller RF. A new locus for non-syndromal, autosomal recessive, sensorineural hearing loss (DFNB16) maps to human chromosome 15q21-q22. *J Med Genet.* 34(12):1015-7, 2001.
- Carter NP, Fiegler H, Piper J. Comparative analysis of comparative genomic hybridization microarray technologies: report of a workshop sponsored by the Wellcome Trust. *Cytometry.* 49(2):43-8, 2002.

- Catelani AL, Krepischi AC, Kim CA, Kok F, Otto PA, Auricchio MT, Mazzeu JF, Uehara DT, Costa SS, Knijnenburg J, Tabith A Jr, Vianna-Morgante AM, Mingroni-Netto RC, Rosenberg C. Chromosome imbalances in syndromic hearing loss. *Clin Genet.* 76(5):458-64, 2009.
- Catelani, ALPM. *Variação no número de cópias de segmentos de DNA (CNV) em pacientes com surdez síndrômica.* 155f. Tese (Doutorado em Ciências) - Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.
- Davis H, Silverman RS. *Hearing and deafness.* New York: Rinehart & Wiston, 1970.
- DECIPHER. Database of Chromosomal Imbalance and Phenotype in Humans using Ensembl Resources. URL: <<http://decipher.sanger.ac.uk>>. Acesso em: 22 abr. 2008.
- del Castillo F, Aguirre L, Rodríguez-Ballesteros M, Villamar M, Moreno-Pelayo M, Moreno F, del Castillo I. A novel 200-kb deletion not involving the GJB6 (connexin-30) gene at the DFNB1 locus is found in the compound heterozygous state with a GJB2 (connexin-26) mutation in subjects with autosomal recessive hearing impairment. In: 7th Molecular Biology of Hearing and Deafness, 2009, Boston. Livro de Resumos. Boston: Harvard Medical School, p.85, 2009.
- del Castillo FJ, Rodríguez-Ballesteros M, Alvarez 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, Kanaan 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 non-syndromic hearing impairment. *J Med Genet.* 42(7):588-94, 2005.
- del Castillo I, Villamar M, Moreno-Pelayo MA, del Castillo FJ, Alvarez A, Telleria D, Menendez I, Moreno F. A deletion involving the connexin 30 gene in nonsyndromic hearing impairment. *New Eng J Med.* 346:243-9, 2002.
- DGV – Database of Genomic Variants. URL: <<http://projects.tcag.ca/variation/>>. Acesso em: 8 dez. 2009.
- Dror AA, Avraham KB. Hearing loss: mechanisms revealed by genetics and cell biology. *Annu Rev Genet.* 43:411-37, 2009.
- Ensembl. URL: <<http://www.ensembl.org>>. Acesso em: 9 mar. 2008.
- Entrez Gene. URL: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene>>. Acesso em: 9 mar. 2008.
- Estivill X, Govea N, Barceló E, Badenas C, Romero E, Moral L, Scozzri R, D'Urbano L, Zeviani M, Torroni A. Familial progressive sensorineural deafness is mainly due to the mtDNA A1555G mutation and is enhanced by treatment of aminoglycosides. *Am J Hum Genet.* 62(1):27-35, 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). *Nat Genet.* 17(4):411-22, 1997.
- 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. *Eur J Med Genet.* 52(4):195-200, 2009.
- Fellermann K, Stange DE, Schaeffeler E, Schmalzl H, Wehkamp J, Bevins CL, Reinisch W, Teml A, Schwab M, Lichter P, Radlwimmer B, Stange EF. A chromosome 8 gene-cluster polymorphism with low human beta-defensin 2 gene copy number predisposes to Crohn disease of the colon. *Am J Hum Genet.* 79(3):439-48, 2006.
- Feuk L, Carson AR, Scherer SW. Structural variation in the human genome. *Nat Rev Genet.* 7(2):85-97, 2006.

- Finsterer J, Fellinger J. Nuclear and mitochondrial genes mutated in nonsyndromic impaired hearing. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol.* 69:621-47, 2005.
- Genatlas. URL: <<http://genatlas.medecine.univ-paris5.fr/>>. Acesso em: 9 mar. 2008.
- Gonzalez E, Kulkarni H, Bolivar H, Mangano A, Sanchez R, Catano G, Nibbs RJ, Freedman BI, Quinones MP, Bamshad MJ, Murthy KK, Rovin BH, Bradley W, Clark RA, Anderson SA, O'Connell RJ, Agan BK, Ahuja SS, Bologna R, Sen L, Dolan MJ, Ahuja SK. The influence of *CCL3L1* gene-containing segmental duplications on HIV-1/AIDS susceptibility. *Science.* 307:1434-40, 2005.
- 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. *Am J Med Genet.* 78(2):107-13, 1998.
- Hilgert N, Smith RJ, Van Camp G. Forty-six genes causing nonsyndromic hearing impairment: which ones should be analyzed in DNA diagnostics? *Mutat Res.* 681(2-3):189-96, 2009a.
- Hilgert N, Smith RJ, Van Camp G. Function and expression pattern of nonsyndromic deafness genes. *Curr Mol Med.* 9(5):546-64, 2009b.
- Hills A, Ahn JW, Donaghue C, Thomas H, Mann K, Ogilvie CM. MLPA for confirmation of array CGH results and determination of inheritance. *Mol Cytogenet.* 3:19, 2010.
- Hutchin TP, Cortopassi GA. Mitochondrial defects and hearing loss. *Cell Mol Life Sci.* 57:1927-37, 2000.
- Iafrate AJ, Feuk L, Rivera MN, Listewnik ML, Donahoe PK, Qi Y, Scherer SW, Lee C. Detection of large-scale variation in the human genome. *Nat Genet.* 36(9):949-51, 2004.
- Ikeda A, Zheng QY, Zuberi AR, Johnson KR, Naggert JK, Nishina PM. Microtubule-associated protein 1A is a modifier of tubby hearing (moth1). *Nat Genet.* 30:401-5, 2002.
- Kalay E, Caylan R, Kiroglu AF, Yasar T, Collin RWJ, Heister JGAM, Oostrik J, Cremers CWRJ, Brunner HG, Karaguzel A, Kremer H. A novel locus for autosomal recessive nonsyndromic hearing impairment, *DFNB63*, maps to chromosome 11q13.2-q13.4. *J Mol Med.* 85:397-404, 2007.
- Kallioniemi A, Kallioniemi OP, Sudar D, Rutovitz D, Gray JW, Waldman F, Pinkel D. Comparative genomic hybridization for molecular cytogenetic analysis of solid tumors. *Science.* 258:818-21, 1992.
- Keats BJ, Berlin CI. Genomics and hearing impairment. *Genome Res.* 9(1):7-16, 1999.
- Keats BJ. Genes and syndromic hearing loss. *J Commun Disord.* 35(4):355-66, 2002.
- Khan SY, Riazuddin S, Tariq M, Anwar S, Shabbir M, Riazuddin SA, Khan SN, Husnain T, Ahmed ZM, Friedman TB, Riazuddin S. Autosomal recessive nonsyndromic deafness locus *DFNB63* at chromosome 11q13.2-q13.3. *Hum Genet.* 120:789-93, 2007.
- Kitajiri S, Makishima T, Friedman TB, Griffith AJ. A novel mutation at the *DFNA36* hearing loss locus reveals a critical function and potential genotype-phenotype correlation for amino acid-572 of TMC1. *Clin Genet.* 71(2):148-52, 2007.
- Knijnenburg J, Oberstein SA, Frei K, Lucas T, Gijsbers AC, Ruivenkamp CA, Tanke HJ, Szuhai K. A homozygous deletion of a normal variation locus in a patient with hearing loss from non-consanguineous parents. *J Med Genet.* 46(6):412-417, 2009.
- Kokotas H, Petersen MB, Willems PJ. Mitochondrial deafness. *Clin Genet.* 71:379-91, 2007.
- Kroisel PM, Petek E, Emberger W, Windpassinger C, Wladika W, Wagner K. Candidate region for Gilles de la Tourette syndrome at 7q31. *Am J Med Genet.* 101(3):259-61, 2001.

- Kuo KT, Guan B, Feng Y, Mao TL, Chen X, Jinawath N, Wang Y, Kurman RJ, Shih IeM, Wang TL. Analysis of DNA copy number alterations in ovarian serous tumors identifies new molecular genetic changes in low-grade and high-grade carcinomas. *Cancer Res.* 69(9):4036-42, 2009.
- 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, Deiningen 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. *Nat Genet.* 30(3):277-84, 2002.
- Ledbetter DH, Riccardi VM, Airhart SD, Strobel RJ, Keenan BS, Crawford JD. Deletions of chromosome 15 as a cause of the Prader-Willi syndrome. *N Engl J Med.* 304(6):325-9, 1981.
- Lee C, Iafrate AJ, Brothman AR. Copy number variations and clinical cytogenetic diagnosis of constitutional disorders. *Nat Genet.* 39:S48-54, 2007.
- Lee C, Scherer SW. The clinical context of copy number variation in the human genome. *Expert Rev Mol Med.* 9;12:e8, 2010.
- Li XC, Everett LA, Lalwani AK, Desmukh D, Friedman TB, Green ED, Wilcox ER. A mutation in PDS causes non-syndromic recessive deafness. *Nat Genet.* 18(3):215-7, 1998.
- Lichtner P, Konig R, Hasegawa T, Van Esch H, Meitinger T, Schuffenhauer S. An HDR (hypoparathyroidism, deafness, renal dysplasia) syndrome locus maps distal to the DiGeorge syndrome region on 10p13-14. *J Med Genet.* 37:33-7, 2000.
- Lu B, Poirier C, Gaspar T, Gratzke C, Harrison W, Busija D, Matzuk MM, Andersson KE, Overbeek PA, Bishop CE. A mutation in the inner mitochondrial membrane peptidase 2-like gene (*Imm2l*) affects mitochondrial function and impairs fertility in mice. *Biol Reprod.* 78(4):601-10, 2008.
- Lupski JR, de Oca-Luna RM, Slaugenhaupt S, Pentao L, Guzzetta V, Trask BJ, Saucedo-Cardenas O, Barker DF, Killian JM, Garcia CA, Chakravarti A, Patel PI. DNA duplication associated with Charcot-Marie-Tooth disease type 1A. *Cell.* 66(2):219-32, 1991.
- Maestrini E, Pagnamenta AT, Lamb JA, Bacchelli E, Sykes NH, Sousa I, Toma C, Barnby G, Butler H, Winchester L, Scerri TS, Minopoli F, Reichert J, Cai G, Buxbaum JD, Korvatska O, Schellenberg GD, Dawson G, de Bildt A, Minderaa RB, Mulder EJ, Morris AP, Bailey AJ, Monaco AP; IMGSAC. High-density SNP association study and copy number variation analysis of the *AUTS1* and *AUTS5* loci implicate the *IMMP2L-DOCK4* gene region in autism susceptibility. *Mol Psychiatry.* 15(9):954-68, 2010.
- McCarroll SA, Huett A, Kuballa P, Chilewski SD, Landry A, Goyette P, Zody MC, Hall JL, Brant SR, Cho JH, Duerr RH, Silverberg MS, Taylor KD, Rioux JD, Altshuler D, Daly MJ, Xavier RJ. Deletion polymorphism upstream of *IRGM* associated with altered *IRGM* expression and Crohn's disease. *Nat Genet.* 40(9):1107-12, 2008.
- Mese G, Londin E, Mui R, Brink PR, White TW. Altered gating properties of functional Cx26 mutants associated with recessive non-syndromic hearing loss. *Hum Genet.* 115(3):191-9, 2004.
- Milunsky JM, Maher TA, Ito M, Milunsky A. The value of MLPA in Waardenburg syndrome. *Genet Test.* 11(2):179-82, 2007.
- Morton Human Fetal Cochlea cDNA Library EST Data. URL: <http://www.brighamandwomens.org/bwh_hearing/human-cochlear-ests.aspx>. Acesso em: 9 mar. 2008.

- 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. *Eur J Hum Genet.* 6(6):548-51, 1998.
- Nobrega M, Weckx LL, Juliano Y. Study of the hearing loss in children and adolescents, comparing the periods of 1990-1994 and 1994-2000. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol.* 69(6):829-38, 2005.
- Nunnari J, Fox TD, Walter P. A mitochondrial protease with two catalytic subunits of nonoverlapping specificities. *Science.* 262(5142):1997-2004, 1993.
- OMIM. Online Mendelian Inheritance in Man. URL: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/omim>>. Acesso em: 9 mar. 2008.
- Oostlander AE, Meijer GA, Ylstra B. Microarray-based comparative genomic hybridization and its applications in human genetics. *Clin Genet.* 66(6):488-95, 2004.
- Pagnamenta AT, Bacchelli E, de Jonge MV, Mirza G, Scerri TS, Minopoli F, Chiochetti A, Ludwig KU, Hoffmann P, Paracchini S, Lowy E, Harold DH, Chapman JA, Klauck SM, Poustka F, Houben RH, Staal WG, Ophoff RA, O'Donovan MC, Williams J, Nöthen MM, Schulte-Körne G, Deloukas P, Ragoussis J, Bailey AJ, Maestrini E, Monaco AP; International Molecular Genetic Study Of Autism Consortium. Characterization of a family with rare deletions in CNTNAP5 and DOCK4 suggests novel risk loci for autism and dyslexia. *Biol Psychiatry.* 68(4):320-8, 2010.
- Pallares-Ruiz N, Blanchet P, Mondain M, Claustres M, Roux AF. A large deletion including most of *GJB6* in recessive non syndromic deafness: a digenic effect? *Eur J Hum Genet.* 10(1):72-6, 2002.
- Pandya A, Xia X, Radnaabazar J, Batsuuri J, Dangaansuren B, Fischel-Ghodsian N, Nance WE. Mutation in the mitochondrial 12S rRNA gene in two families from Mongolia with matrilineal aminoglycoside ototoxicity. *J Med Genet.* 34(2):169-72, 1997.
- Pera A, Villamar M, Viñuela A, Gandía M, Medà C, Moreno F, Hernández-Chico C. A mutational analysis of the *SLC26A4* gene in Spanish hearing-impaired families provides new insights into the genetic causes of Pendred syndrome and DFNB4 hearing loss. *Eur J Hum Genet.* 16(8):888-96, 2008.
- Petek E, Schwarzbraun T, Noor A, Patel M, Nakabayashi K, Choufani S, Windpassinger C, Stamenkovic M, Robertson MM, Aschauer HN, Gurling HM, Kroisel PM, Wagner K, Scherer SW, Vincent JB. Molecular and genomic studies of *IMMP2L* and mutation screening in autism and Tourette syndrome. *Mol Genet Genomics.* 277(1):71-81, 2007.
- Petek E, Windpassinger C, Vincent JB, Cheung J, Boright AP, Scherer SW, Kroisel PM, Wagner K. Disruption of a novel gene (*IMMP2L*) by a breakpoint in 7q31 associated with Tourette syndrome. *Am J Hum Genet.* 68(4):848-58, 2001.
- Prezant TR, Agopian JV, Bohlman MC, Bu X, Oztas S, Qiu WQ, Arnos KS, Cortopassi GA, Jaber L, Rotter JI, Shohat M, Fischel-Ghodsian N. Mitochondrial ribosomal RNA mutation associated with both antibiotic-induced and non-syndromic deafness. *Nat Genet.* 4(3):289-94, 1993.
- Rabionet R, Gasparini P, Estivill X. Molecular genetics of hearing impairment due to mutations in gap junction genes encoding beta connexins. *Hum Mutat.* 16(3):190-202, 2000.
- Ramos N, Rueda, LA, Bouadjar, B, Montoya, LS, Orth, G, Favre, M. Mutations in two adjacent novel genes are associated with epidermodyplasia verruciformis. *Nat Genet.* 32: 487-9, 2002.
- Redon R, Ishikawa S, Fitch KR, Feuk L, Perry GH, Andrews TD, Fiegler H, Shapero MH, Carson AR, Chen W, Cho EK, Dallaire S, Freeman JL, González JR, Gratacòs M, Huang J, Kalaitzopoulos D, Komura D, MacDonald JR, Marshall CR, Mei R, Montgomery L, Nishimura K, Okamura K, Shen F, Somerville MJ, Tchinda J, Valsesia A, Woodwark C, Yang F, Zhang J, Zerjal T, Zhang J, Armengol L,

- Conrad DF, Estivill X, Tyler-Smith C, Carter NP, Aburatani H, Lee C, Jones KW, Scherer SW, Hurles ME. Global variation in copy number in the human genome. *Nature*. 444:444-54, 2006.
- Risheg H, Keitges E, Bumside RD, Gadi I, Jaswaney V, Pasion R, Schwartz S, Tepperberg J, Papenhausen P. Assessing the phenotypic effects of IMMP2L and DOCK4 detected by whole genome SNP array. In: 60th Annual American Society of Human Genetics Meeting. Disponível em: <<http://www.ashg.org/cgi-bin/2010/showdetail.pl?absno=22426>>. Acesso em: 28 out. 2010.
- Rodriguez-Revena L, Mila M, Rosenberg C, Lamb A, Lee C. Structural variation in the human genome: the impact of copy number variants on clinical diagnosis. *Genet Med*. 9(9):600-6, 2007.
- Rozen S, Skaletsky H. Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. *Methods Mol Biol*. 132:365-86, 2000.
- Schouten JP, McElgunn CJ, Waaijer R, Zwijnenburg D, Diepvens F, Pals G. Relative quantification of 40 nucleic acid sequences by multiplex ligation-dependent probe amplification. *Nucleic Acids Res*. 30(12):e57, 2002.
- Sebat J, Lakshmi B, Troge J, Alexander J, Young J, Lundin P, Mánér S, Massa H, Walker M, Chi M, Navin N, Lucito R, Healy J, Hicks J, Ye K, Reiner A, Gilliam TC, Trask B, Patterson N, Zetterberg A, Wigler M. Large-scale copy number polymorphism in the human genome. *Science*. 305(5683):525-8, 2004.
- Shen Y, Wu BL. Designing a simple multiplex ligation-dependent probe amplification (MLPA) assay for rapid detection of copy number variants in the genome. *J Genet Genomics*. 36(4):257-65, 2009.
- Smith RJH, Hildebrand MS, Van Camp G. Deafness and hereditary hearing loss overview. In: Pagon RA (Ed.). Gene reviews. Seattle: University of Washington, Seattle, 1993-. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/bookshelf/br.fcgi?book=gene&part=deafness-overview>>. Acesso em: 2 aug. 2010.
- Stankiewicz P, Lupski JR. Structural variation in the human genome and its role in disease. *Annu Rev Med*. 61:437-55, 2010.
- The auditory system. In: Purves D. (Ed.). *Neuroscience*. Sunderland: Sinauer Associates, 2001. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/bookshelf/br.fcgi?book=neurosci&part=A879>>. Acesso em: 24 out. 2010.
- Tlili A, Masmoudi S, Dhouib H, Bouaziz S, Rebeh IB, Chouchen J, Turki K, Benzina Z, Charfedine I, Drira M, Ayadi H. Localization of a novel autosomal recessive non-syndromic hearing impairment locus DFNB63 to chromosome 11q13.3-q13.4. *Ann Hum Genet*. 71:271-5, 2006.
- Tyson C, McGillivray B, Chijiwa C, Rajcan-Separovic E. Elucidation of a cryptic interstitial 7q31.3 deletion in a patient with a language disorder and mild mental retardation by array-CGH. *Am J Med Genet A*. 129A(3):254-60, 2004.
- UCSC Genome Browser Home. URL: <<http://genome.ucsc.edu/>>. Acesso em: 23 abr. 2008.
- Ueda S, Fujimoto S, Hiramoto K, Negishi M, Katoh H. Dock4 regulates dendritic development in hippocampal neurons. *J Neurosci Res*. 86(14):3052-61, 2008.
- UniGene. URL: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/UniGene>>. Acesso em: 9 mar. 2008.
- Usami S, Abe S, Weston MD, Shinkawa H, Van Camp G, Kimberling WJ. Non-syndromic hearing loss associated with enlarged vestibular aqueduct is caused by PDS mutations. *Hum Genet*. 104(2):188-92, 1999.

- Van Camp G, Smith RJH. Hereditary hearing loss homepage. URL: <<http://hereditaryhearingloss.org/>>. Acesso em: 14 out. 2010.
- 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. *Nat Genet.* 26(1):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. *Nat Genet.* 29(3):345-9, 2001.
- Visser LE, de Vries BB, Osoegawa K, Janssen IM, Feuth T, Choy CO, Straatman H, van der Vliet W, Huys EH, van Rijk A, Smeets D, van Ravenswaaij-Arts CM, Knoers NV, van der Burgt I, de Jong PJ, Brunner HG, van Kessel AG, Schoenmakers EF, Veltman JA. Array-based comparative genomic hybridization for the genomewide detection of submicroscopic chromosomal abnormalities. *Am J Hum Genet.* 71:1261-70, 2003.
- Wilch E, Azaiez H, Fisher RA, Elfenbein J, Murgia A, Birkenhäger R, Bolz H, Da Silva-Costa SM, del Castillo 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. *Clin Genet.* 78(3):267-74, 2010.
- Wilcox SA, Osborn AH, Allen-Powell DR, Maw MA, Dahl HH, Gardner RJ. Connexin26 deafness in several interconnected families. *J Med Genet.* 36(5):383-5, 1999.
- Willems PJ. Mechanism of Disease: Genetic Causes of Hearing Loss. *N Engl J Med* 342(15): 1101-9, 2000.
- Yajnik V, Paulding C, Sordella R, McClatchey AI, Saito M, Wahrer DC, Reynolds P, Bell DW, Lake R, van den Heuvel S, Settleman J, Haber DA. DOCK4, a GTPase activator, is disrupted during tumorigenesis. *Cell.* 112(5):673-84, 2003.
- Yan D, Li F, Hall ML, Sage C, Hu WH, Giallourakis C, Upadhyay G, Ouyang XM, Du LL, Bethea JR, Chen ZY, Yajnik V, Liu XZ. An isoform of GTPase regulator DOCK4 localizes to the stereocilia in the inner ear and binds to harmonin (USH1C). *J Mol Biol.* 357(3):755-64, 2006.
- Zhang F, Gu W, Hurles ME, Lupski JR. Copy number variation in human health, disease, and evolution. *Annu Rev Genomics Hum Genet.* 10:451-81, 2009.
- Zhang Y, Malekpour M, Al-Madani N, Kahrizi K, Zanganeh M, Lohr NJ, Mohseni M, Mojahedi F, Daneshi A, Najmabadi H, Smith RJ. Sensorineural deafness and male infertility: a contiguous gene deletion syndrome. *J Med Genet.* 44(4):233-40, 2007.