

BC/57623
IB/82059

INSTITUTO DE BIOLOGIA

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS



MITSUE TAUKUTI BRIANTI

Estudo da frequência de mutações mitocondriais em brasileiros portadores de deficiência auditiva neurossensorial não síndrômica de etiologia não esclarecida

Este exemplar corresponde à redação final da tese defendida pelo(a) candidato (a) Mitsue T. Brianti e aprovada pela Comissão Julgadora.

Dissertação apresentada ao instituto de biologia para obtenção do título de mestre em Genética e Biologia Molecular na área de Genética Humana e Médica

Ed. L. Sartorato

Orientadora: Profa. Dra. Edi Lúcia Sartorato

Co-orientadora: Profa. Dra. Andréa T. Maciel Guerra

JNIDADE IB/E2059
Nº CHAMADA 11
V 1 EX 1
TOMBO BC/ 57623
PROC 28-217-04
C 1 D 1
PREÇO 21,00
DATA 15/04/2004
Nº CPD _____

Bib id: 314347

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA - UNICAMP**

B76e

Brianti, Mitsue Taukeuti

Estudo da frequência de mutações mitocondriais em brasileiros portadores de deficiência auditiva neurossensorial não sindrômica de etiologia não esclarecida / Mitsue Taukeuti Brianti. --
Campinas, SP:[s.n.], 2003.

Orientadora: Edi Lúcia Sartorato

Co-orientadora: Andréa Trevas Maciel Guerra

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas.
Instituto de Biologia.

I. Surdez. 2. Mutação (Biologia). 3. Mitocondria. I. Sartorato, Edi Lúcia.
II. Guerra, Andréa Trevas Maciel. III. Universidade Estadual de Campinas. Instituto
de Biologia. IV. Título.

Banca Examinadora

Data 04 / 08 /2003.

Profa. Dra. Edi Lúcia Sartorato

Ed. L. Sartorato

Profa. Dra. Maricilda Palandi de Mello

Maricilda Palandi de Mello

Prof. Dr. Rui Fernando Pilotto

Rui Fernando Pilotto

Profa. Dra. Vera Vera Lúcia Gil da Siva Lopes

Dedico este trabalho a
minha mãe e ao meu pai que
nos deixou há pouco tempo,
pessoas que nunca hesitaram
a me ajudar.

Agradeço:

À Profa. Dra, Edi Lúcia Sartorato, pela orientação.

Aos professores participantes da pré-banca de minha tese, pela análise deste trabalho e tempo despendido: Prof. Dr. Rui Pilotto (Universidade federal do Paraná/ Curitiba), Profa. Dra. Carmem Silva Bertuzzo (FCM/UNICAMP), Profa. Dra. Vera Lopes (FCM/ UNICAMP).

Aos professores participantes da banca de minha tese, pela análise deste trabalho e tempo despendido: Prof. Dr. Rui Pilotto (Universidade federal do Paraná/ Curitiba), Profa. Dra. Maricilda Palandi de Mello (CEBMEG/UNICAMP) e minha orientadora Profa. Dra, Edi Lúcia Sartorato.

À Profa. Dra. Andréa T. Maciel Guerra (FCM/UNICAMP) pela co-orientação, pelo fornecimento de amostras, pela análise, e pelas idéias que muito contribuíram para a realização deste trabalho.

Aos professores do Instituto de Biologia (IB/UNICAMP) pela minha formação acadêmica.

A Madá pelo auxílio no laboratório, e a Camila por me ajudar a terminar os seqüenciamentos.

Aos amigos dos tempos de graduação.

Aos demais amigos, colegas e funcionários do GBMEG, do Instituto de Biologia, dos demais Institutos da UNICAMP e as pessoas da escola de primeiro grau “Raio de Luz” e colégio “Aplicado Anglo” de Mogi Guaçu (SP) que acreditaram e investiram em mim.

Aos amigos de Mogi Guaçu.

Ao Marinho em especial, pelo seu companheirismo que foi imprescindível para finalização deste trabalho.

Aos familiares que sempre me desejaram votos de felicidade e apoio.

À Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP, 99-00610-4) pelos auxílios financeiros e a CAPES pela bolsa concedida.

A todos que de alguma forma, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho.

Resumo

A surdez congênita ocorre em aproximadamente 1 entre 1000 nascimentos. Nos países desenvolvidos, em média, 60% da deficiência auditiva é de origem genética. No entanto, no Brasil as maiorias dos casos de surdez de etiologia esclarecidas ocorrem devido a fatores ambientais, tais como as infecções congênitas (principalmente a rubéola), anóxia perinatal, Kernicterus e meningite.

A deficiência auditiva hereditária é um grupo heterogêneo de entidades genéticas, as quais podem ser distinguidas através de manifestações clínicas, padrão de herança e *locus* genéticos. A maioria dos pacientes com surdez genética não apresenta outras manifestações clínicas ou laboratoriais, sendo estes casos denominados de surdez não síndrômica. Aproximadamente 80% dos casos de surdez não síndrômica possuem padrão de herança autossômica recessiva, 15% autossômica dominante e 1-3% herança ligada ao cromossomo X. Mutações mitocondriais, principalmente nos genes 12SrRNA e tRNA^{Ser(UCN)}, também tem sido descritas como importante causa da deficiência auditiva neurossensorial não síndrômica em algumas populações.

Diferenças consideráveis nas freqüências das mutações 12SrRNA A1555G e tRNA^{Ser(UCN)} A7445G tem sido reportadas em diferentes populações. Nos analisamos 206 pacientes de diferentes famílias Brasileiras portadoras de surdez neurossensorial não-síndrômica, foi encontrado um indivíduo portador da mutação A1555G (0,485%) e um portador da mutação A7445G (0,485%).

Sendo assim, nosso estudo revelou baixa freqüência das mutações mitocondriais A1555G e A7445G na população Brasileira.

Abstract

Congenital deafness occurs in approximately 1 in 1000 live births. In developed countries about 60% of hearing loss is genetic. However, in Brazil most cases of hearing loss are due to environmental factor, such as congenital infections (mainly rubella), perinatal anoxia, Kernicterus and meningitis.

Hereditary deafness is a heterogeneous group of genetic entities, which can be distinguished by clinical manifestations, mode of inheritance and genetic locus. The majority of patients with hereditary deafness have no other clinical or laboratory pathologies and are referred to as non-syndromic cases. Approximately 80% of non-syndromic cases show a recessive pattern of inheritance, 15% of cases show dominant transmission and 1-3% are X-linked. Mitochondrial mutations, especially in the mitochondrial 12SrRNA and tRNA^{Ser(UCN)} genes, are known to be one of important causes of non-syndromic sensorineural hearing loss in some population.

Considerable differences on frequencies of the mitochondrial 12SrRNA A1555G and tRNA^{Ser(UCN)} A7445G have been reported in different populations. Our screening of 206 patients coming from independent Brazilian families with prelingual sensorineural non-syndromic deafness revealed one deaf individual with A1555G (0,485%), and one deaf individual with A7455G (0,485%).

Therefore, our study shows that the mitochondrial A1555G and A7445G mutations are not a common cause of non-syndromic sensorineural hearing loss in the Brazilian population.

SUMÁRIO

1 – INTRODUÇÃO.....	01
1.1 - Sistema auditivo.....	01
1.1.1 - O som.....	03
1.1.2 - O ouvido.....	07
1.2 - Aspectos gerais da deficiência auditiva.....	07
1.3 - Epidemiologia da deficiência auditiva.....	08
1.4 - Diagnostico etiológico da surdez.....	10
1.5 - Deficiência auditiva de etiologia genética.....	12
1.6 – Conexinas.....	20
1.7 - O Gene GJB2.....	20
1.7.1- A Mutação 35delG.....	22
1.7.2 - Outras mutações.....	24
1.8 - Outros genes.....	25
1.9 - DNA mitocondrial e sua relação com a deficiência auditiva.....	26
1.9.1 - O DNA mitocondrial.....	26
1.9.2 - Mutações mitocondriais que causam surdez.....	28
1.9.3 - Mutação A1555G.....	31
1.9.3.1 – Aspectos gerais da mutação A1555G.....	31
1.9.3.2– Ototoxicidade.....	33

1.9.4 - Mutação A7445G.....	35
1.9.5 - Mutação 7472insC.....	36
1.9.6- Mutações T7510C e T7511C.....	37
1.10 - Aconselhamento genético.....	37
2 – OBJETIVOS.....	41
3 - MATERIAL E MÉTODOS.....	42
3.1 – Casuística.....	42
3.2 – Método.....	43
3.2.1 - Análise molecular do DNA mitocondrial.....	44
3.2.1.1 - Extração do mtDNA.....	44
3.2.1.2 - Amplificação dos fragmentos do DNA mitocondrial.....	44
3.2.1.3 - Digestões dos fragmentos de mtDNA com enzimas de restrição.....	46
4 – RESULTADOS.....	48
4.1 - Análise molecular do DNA mitocondrial.....	48
4.1.1 - Mutação A1555G.....	48
4.1.2 - Mutação A7445G.....	51

5 – DISCUSSÃO.....	54
6 – CONCLUSÃO.....	58
7 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRAFICAS.....	59
8 – ANEXO.....	77
8.1 – Consentimento pós-informação.....	77
8.2 - Metodologia da análise molecular do gene GJB2.....	80
8.3 - Resultado da análise molecular do gene GJB2.....	87

LISTA DE TABELAS

Tabela I - Principais causas de deficiência auditiva em crianças, detectadas em cinco instituições do estado de São Paulo (%).....	10
Tabela II - Idade das crianças com diagnóstico de surdez.....	11
Tabela III - Exemplos de síndromes que apresentam deficiência auditiva.....	13
Tabela IV- <i>Locis</i> envolvidos com as formas não sindrômicas, autossômicas recessivas de surdez (VAN LAER <i>et al.</i> , 1998; VAN CAMP & SMITH, 2000).....	14
Tabela V - <i>Locis</i> envolvidos com as formas não sindrômicas, autossômicas dominantes de surdez (VAN LAER <i>et al.</i> , 1998; VAN CAMP & SMITH, 2000).....	16
Tabela VI - <i>Locis</i> envolvidos com as formas de surdez de transmissão ligada ao cromossomo X (VAN LAER <i>et al.</i> , 1998; VAN CAMP & SMITH, 2000).....	18
Tabela VII - Alteração no quadro de leitura da proteína Cx26 na presença da mutação 35delG.....	24

Tabela VIII - Mutações mitocondriais associadas à deficiência auditiva síndrômica.	28
Tabela IX - Mutações mitocondriais associadas à deficiência auditiva não-síndrômica.....	29
Tabela X - Posições de anelamento, seqüências e tamanhos dos fragmentos gerados pelos <i>primers</i> utilizados na amplificação dos fragmentos mitocondriais.....	45
Tabela XI – Resultado do rastreamento da mutação A1555G nos 206 pacientes estudados.....	50
Tabela XII - Posições de anelamento, seqüências e tamanhos dos fragmentos gerados pelos <i>primers</i> utilizados na amplificação do gene GJB2.....	82
Tabela XIII– Mutações rastreadas no gene GJB2 dos indivíduos estudados.....	87

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Esquema de uma onda sinusóide.....	02
Figura 2 - Esquema mostrando o ouvido externo, médio e interno.....	03
Figura 3 - Ossículos auditivos.....	04
Figura 4 - Ilustração da forma pelo qual o movimento da base do estribo desloca a janela redonda causando os movimentos do líquido da cóclea.....	06
Figura 5 — Ciclos utilizados na amplificação dos fragmentos mitocondriais.....	46
Figura 6 - Fragmento do gene 12S rRNA amplificado pela reação de PCR (fragmento1), em gel de agarose, corado com brometo de etídio. (a) <i>leder</i> de 1Kb e (b) fragmento 1 de 2060 pb.....	48
Figura 7 - Resultado da análise da presença da mutação mitocondrial A1555G por meio de digestão do fragmento 1, com a enzima de restrição <i>Bsma</i> I, em indivíduo portador da mutação onde a enzima de restrição divide o fragmento 1 em 2 fragmentos (A), e em indivíduo normal onde a enzima de restrição divide o fragmento 1 em 3	

fragmentos (B)..... 49

Figura 8- Fragmento do gene 12S rRNA amplificado pela reação de PCR (fragmento 2), em gel de agarose, corado com brometo de etídio. (a) *leder* de 1Kb e (b) fragmento 2 de 1821 pb..... 51

Figura 9 - Resultado da análise da presença da mutação mitocondrial A7445G por meio da digestão do fragmento 2, com a enzima de restrição *XbaI*, (a) em indivíduo normal e (b) em indivíduo portador da mutação A7445G)..... 52

Figura 10 - Ciclos utilizados na amplificação do gene GJB2..... 83

1- INTRODUÇÃO

1.1- Sistema Auditivo

1.1.1- O som

O som é produzido por ondas de compressão e descompressão que são transmitidas no ar ou em outros meios elásticos, tal como a água. No ar, o som se propaga com a velocidade de cerca de 335 m/s. As ondas estão associadas à variação de pressão, chamada de pressão do som. A unidade de pressão sonora é o N/m², porém ela é mais comumente expressa como o nível de pressão do som (SPL). A unidade do SPL é o decibel (db). O nível de pressão do som é calculado pela expressão:

$SLP = 20 \log (P/Pr)$ onde P é a pressão sonora e Pr é uma pressão de referência 0,0002 dinas /cm² ou 1 N/ m² (limiar absoluto para a audição humana).

A freqüência do som é medida em ciclos por segundo, ou Hertz (Hz). No entanto, o som é, na verdade, uma mistura de tons puros. Cada tom puro resulta de ondas sinusóides, com determinada freqüência, e é caracterizado não só por sua freqüência, mas também por sua amplitude e fase (Figura 1). Assim, é possível dividir a composição de determinado um som em um conjunto de tons puros.

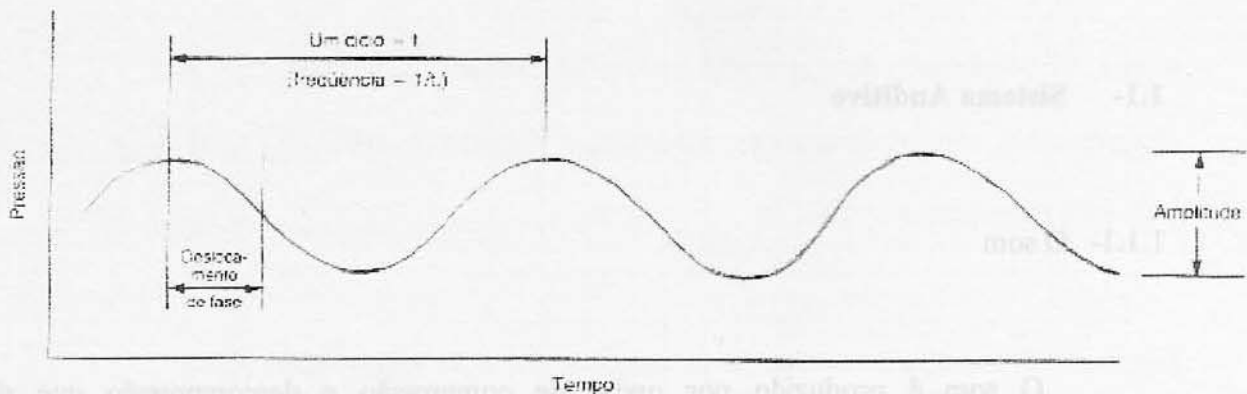


Figura 1 – Esquema de uma onda sinusóide.

O ouvido humano normal é sensível a tons puros com frequências que variam entre 20 e 20000 Hz. O limiar para a detecção de um tom puro varia com sua frequência. Os limiares mais baixos, para os tons puros da audição humana, são de cerca de 1000 a 3000 Hz. Por definição, o limiar nessas frequências é de, aproximadamente, zero dB (pressão de referência, 0,0002 dinas/cm²) (BERNE *et al.*, 2000).

De acordo com essa escala, a fala tem intensidade de cerca de 65 dB, e as principais frequências nela utilizadas ficam na faixa de 300 a 3500 hz. Sons que excedem 100 dB podem causar lesão no aparelho auditivo periférico e os acima de 120 db podem causar dor. A medida que as pessoas envelhecem, sua capacidade de ouvir frequências altas diminui, condição chamada de presbiacusia.

1.1.2- O Ouvido

O aparelho auditivo periférico é o ouvido, que pode ser subdividido em ouvido externo, ouvido médio e ouvido interno (figura 2), e que também podem ser chamados de orelha externa, média e interna, respectivamente. O ouvido externo capta o som e o médio o transmite para o ouvido interno, onde o som é processado (HUDSPETH,1989).

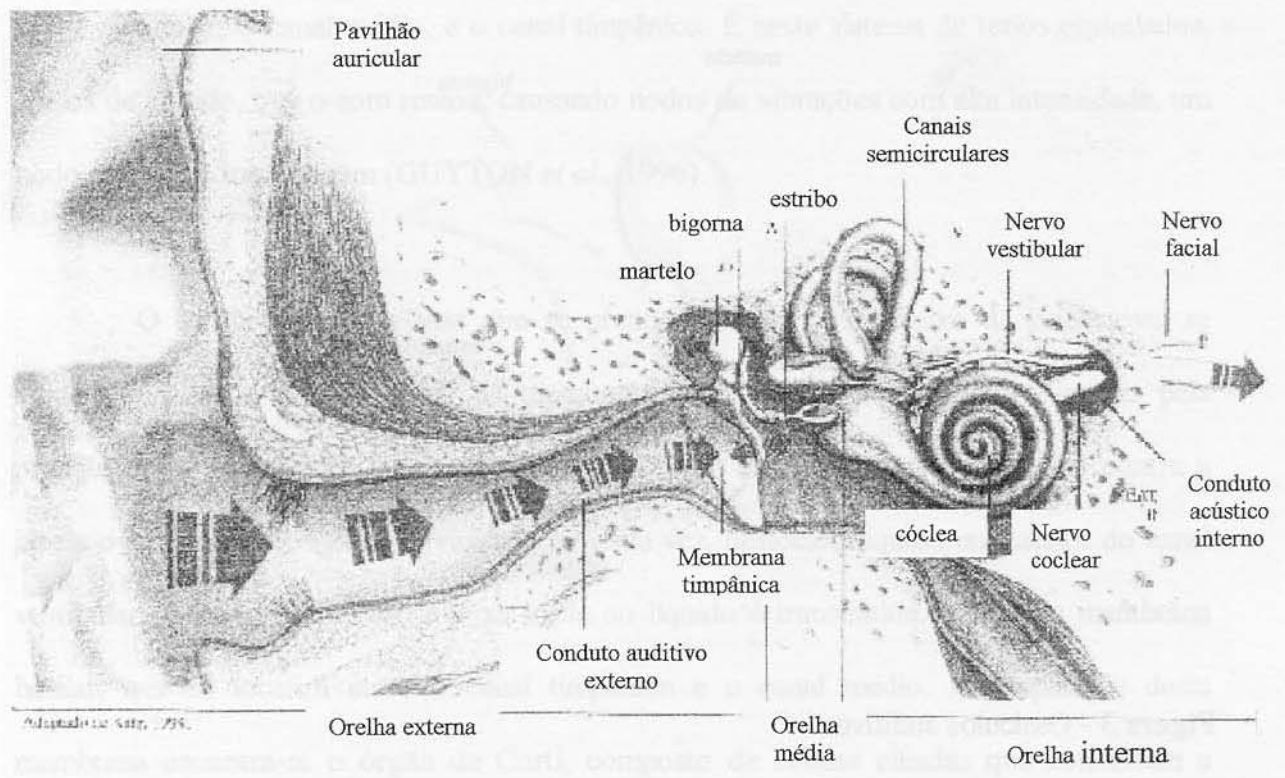


Figura 2 - Esquema mostrando o ouvido externo, médio e interno (adaptado de SALZ, 1998)

O ouvido externo consiste em aurícula e canal auditivo externo, o qual transfere o som para a membrana timpânica, que separa o ouvido externo do médio.

Quando as ondas sonoras atingem a membrana timpânica, causam a vibração desta, cuja parte central ligada a três alavancas ósseas (figura 3), os ossículos auditivos, que conduzem as vibrações para o ouvido interno. Os ossículos auditivos são o martelo, a bigorna e o estribo (BERNE *et al.*, 2000).

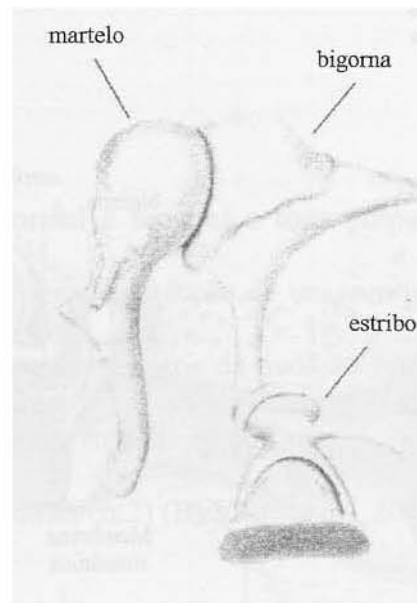


Figura 3 - Ossículos auditivos.

O ouvido médio também exerce outras funções, por meio de dois músculos no ouvido médio: o tensor do tímpano e o estapédio, que se ligam respectivamente, ao martelo e ao estribo. Quando eles se contraem, amortecem os ouvidos da cadeia ossicular e diminuem, assim, a sensibilidade do aparelho acústico. Essa ação pode proteger o aparelho

acústico de sons lesivos, tais como a vocalização, que pode ser antecipada. No entanto, sons como de uma explosão súbita podem danificar o aparelho acústico, porque não ocorre a contração reflexa dos músculos do ouvido médio com rapidez suficiente. O ouvido médio conecta-se com a faringe através da trompa de Eustáquio, por meio da qual as diferenças de pressão entre o ouvido externo e o médio são igualadas (GUYTON, 1988).

No ouvido interno, o órgão sensorial que converte o som em sinais neurais é a cóclea. A estrutura básica desse órgão é um sistema de três tubos enrolados lado a lado: o canal vestibular, o canal médio, e o canal timpânico. É neste sistema de tubos espiralados, cheios de líquido, que o som ressoa, causando nodos de vibrações com alta intensidade, um nodo para cada tom do som (GUYTON *et al.*, 1996).

O estribo tem uma base que se prende à janela oval, abaixo da janela oval se localiza a cóclea. O movimento da membrana timpânica para dentro, ocasionado pela pressão do som, faz com que a cadeia dos ossículos empurre a base do estribo contra a janela oval (figura 4), e esse movimento, por sua vez, desloca o líquido no interior do canal vestibular. A onda de pressão que se inicia no líquido é transmitida através da membrana basilar, que se localiza entre o canal timpânico e o canal médio. Na superfície desta membrana encontra-se o órgão de Corti, composto de células ciliadas que convertem a energia vibratória dos nodos de ressonância em impulsos nervosos. A frequência de cada tom é determinada pelo local na membrana basilar onde ocorre a ressonância. As fibras nervosas que conectam essas células ciliadas ao cérebro possuem orientação espacial, de modo que para cada local que é estimulado na membrana basilar existe um local

correspondente que também é excitado nas diversas áreas auditivas do cérebro (GUYTON *et al.*, 1996).

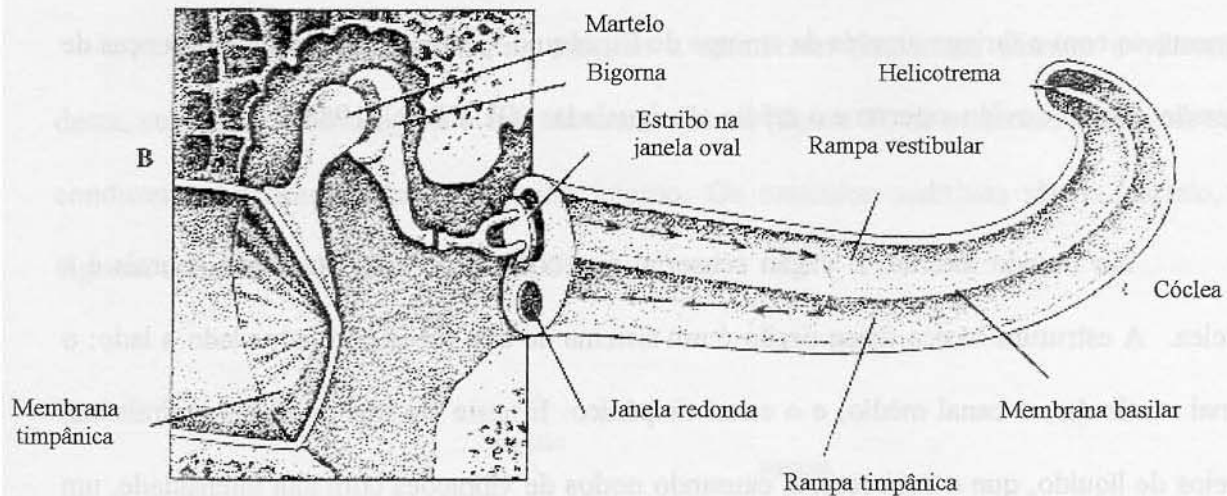


Figura 4 – Ilustração da forma pelo qual o movimento da base do estribo desloca a janela redonda causando os movimentos do líquido da cóclea. (Redesenhado de Kandel E, Schwartz JH: Principles of neural science, New York, 1981, Elsevier North-Holland.)

O ouvido deve detectar ondas sonoras conduzidas pelo ar, porém os mecanismos de transdução neural dependem de movimentos estabelecidos na coluna de líquido no interior da cóclea. Dessa forma, as ondas de pressão no ar devem converter-se em ondas de pressão no líquido. Uma vez que a impedância acústica da água é muito maior do que a do ar, se não houvesse um dispositivo especial para combinar as impedâncias a maior parte dos sons que o ouvido seria simplesmente refletida (GUYTON, 1988).

1.2- Aspectos gerais da deficiência auditiva

A deficiência auditiva é um dos distúrbios sensoriais humanos mais comuns, e pode se manifestar em qualquer faixa etária (SIMÕES & MACIEL-GUERRA, 1992; KALATZIS & PETIT, 1998).

Em vista da complexidade do mecanismo de audição, não é difícil compreender que a surdez possa resultar de ampla variedade de anomalias geneticamente determinadas (surdez hereditária), bem como de diversos fatores ambientais (surdez adquirida). Assim sendo, frente a um portador de deficiência auditiva, o diagnóstico etiológico é freqüentemente difícil de ser estabelecido.

A surdez adquirida pode ser de origem pré-natal (infecções congênitas, particularmente a rubéola; uso de determinados medicamentos durante a gestação, como a talidomida), peri-natal (anóxia neonatal, tocotraumatismo, *kernicterus*) ou pós-natal (meningoencefalite, patologias de ouvido médio, traumatismos, uso de medicamentos como os antibióticos aminoglicosídeos).

Quanto à surdez hereditária, esta pode ser *sindrômica*, ou seja, apresentar-se associada a malformações crânio-faciais ou cervicais, displasias esqueléticas, anomalias cutâneas ou oculares, doenças neurológicas, e disfunções renais ou metabólicas, entre outras; ou isolada (não-sindrômica) (VAN CAMP & SMITH, 1997).

A deficiência auditiva pode ser classificada, também, de acordo com alguns outros critérios. Com relação à localização do defeito, ela pode ser condutiva, quando a anomalia afeta o ouvido médio ou externo, neurossensorial (perceptiva ou neural), quando as anomalias estão situadas entre os receptores do ouvido interno e as regiões auditivas do cérebro, ou ainda mistas, quando envolvem ambos os defeitos. De acordo com o grau da perda auditiva, ela pode ser classificada como leve, correspondendo a perda de 27-40dB; moderada (41-55 dB); moderada a grave (56-70 dB); grave (71-90 dB); e profunda, correspondendo à perda auditiva >90dB. A deficiência auditiva pode ser pré-lingual, quando está presente ao nascimento ou antes da aquisição da linguagem, ou pós-lingual, quando se apresenta depois (KALATZIS & PETIT, 1998). Ao impedir a aquisição da linguagem, a surdez pré-lingual tem graves conseqüências sobre os mais diversos aspectos da vida de seus portadores.

1.3- Epidemiologia da deficiência auditiva

A prevalência da deficiência auditiva congênita varia segundo vários autores nas diferentes populações. No Brasil, entretanto, não existem dados oficiais da prevalência da deficiência auditiva. Segundo dados da Organização Mundial de Saúde (OMS), 10% da população mundial apresenta algum tipo de problema auditivo, devendo, portanto, existir cerca de 16 milhões de deficientes auditivos no Brasil, sendo 35 mil portadores de surdez profunda.

Em países desenvolvidos, a prevalência da deficiência auditiva na infância é estimada em 1/1000, variando de 0,8 a 2/1000 em diferentes áreas do mundo industrializado, sendo que entre as crianças com déficit permanente de audição cerca de 90% apresentam distúrbios neurosensoriais, 5% de condução e 5% mistos (PARVING & HAUCH, 1994). Estima-se que 60% dos casos de surdez pré-lingual tenham bases genéticas (MURGIA *et al.*, 1999), e que 30% destes casos sejam sindrômicos e 70% não sindrômicos (KALATZIS & PETIT, 1998). Além disso, 1/1000 crianças tornam-se surdas após a aquisição da linguagem, ou seja, no período pós-lingual, formas essas que são freqüentemente menos graves e progressivas.

A tabela I ilustra algumas das principais causas de surdez observadas na população brasileira em cinco diferentes centros do estado de São Paulo. A predominância acentuada dos casos de etiologia de causa ambiental reflete as más condições médico-sanitárias da população, de cuja melhoria depende a profilaxia de diversos casos de surdez, além da falta de busca diagnóstica. Em países desenvolvidos, a diminuição acentuada das causas ambientais de surdez tem aumentado a freqüência da deficiência auditiva de etiologia genética (RUSSO, 2000).

Tabela I - Principais causas de deficiência auditiva em crianças, detectadas em cinco instituições do estado de São Paulo (%) (RUSSO, 2000).

Causas	DERDIC	UNIFESP	Santa Casa	HC/USP	CPA/USP
Não conhecidas	45,5	40,9	60,4	43,9	54,0
Rubéola	29,0	31,8	20,9	12,5	2,0
Meningites	18,0	9,0	12,8	7,3	35,0
Trauma no parto	5,5	9,0	3,5	14,2	9,0

DERIC- Divisão de Educação e Reabilitação de Desordens da Comunicação, Universidade Católica de São Paulo; UNIFESP- Universidade Federal de São Paulo; Santa Casa de São Paulo; HC/USP- Hospital Publico da Universidade de São Paulo; CPA/USP- Universidade São Paulo, campus Bauru.

1.4 - Diagnostico etiológico da surdez

A busca do diagnóstico etiológico da deficiência auditiva esbarra, em grande parte, na demora em se reconhecer essa deficiência, o que geralmente ocorre a partir do segundo ano de vida (PARVING & HAUCH, 1994). A tabela II mostra a idade de diagnóstico da surdez em crianças, num estudo realizado na Universidade de São Paulo (USP) em 1992 (RUSSO, 2000)

Quanto mais se demora a fazer o diagnóstico etiológico da surdez, torna-se menor a confiabilidade dos dados a respeito de intercorrências neonatais e das dosagens sorológicas para o diagnóstico de infecções congênitas. Além disso, em muitos casos em

que não são detectados quaisquer fatores ambientais que possam ter originado a deficiência auditiva, não há também antecedentes familiares sugestivos de uma origem genética e nem outras anomalias congênitas associadas; assim sendo, não há como determinar a etiologia, e, conseqüentemente, o risco de recorrência familiar.

Tabela II - Idade das crianças com diagnóstico de surdez (RUSSO, 2000).

Idade (meses)	(%)
0-12	6,52
13-24	20,82
25-48	45,82
49-144	26,84

Nos casos de surdez adquirida, o risco de recorrência familiar dessa anomalia é praticamente desprezível. Em se tratando de surdez hereditária, por outro lado, existe uma probabilidade de que surjam outros casos na família, probabilidade essa que depende de seu mecanismo de herança. Nos casos em que não se chega a um diagnóstico etiológico, o risco de recorrência pode ser fornecido, empiricamente, como sendo cerca de 10% - em algumas famílias, porém, esta será uma superestimativa, e em outras uma subestimativa. Apenas o diagnóstico etiológico preciso pode vir a tranquilizar aqueles que não estão sob risco e alertar os que de fato poderão vir a gerar outros portadores dessa anomalia.

1.5 - Deficiência auditiva de etiologia genética

Como já foi dito, surdez hereditária pode ser síndrômica, ou seja, apresentar-se associada a malformações crânio-faciais ou cervicais, displasias esqueléticas, anomalias cutâneas ou oculares, doenças neurológicas, e disfunções renais ou metabólicas, entre outras; ou isolada (não-sindrômica) (VAN CAMP & SMITH, 1997).

Mutações em genes responsáveis por quadros síndrômicos associados à surdez neurosensorial vêm sendo identificadas freqüentemente. Acredita-se que existam mais de 400 condições geneticamente determinadas nas quais a surdez seja uma das características. A tabela III mostra alguns desses achados, nos quais a disacusia é considerada uma das características relevantes.

A deficiência auditiva não-sindrômica é quase exclusivamente monogênica e altamente heterogênea. Acredita-se que mais de 100 genes possam estar envolvidos na surdez não-sindrômica (SOBE *et al.*, 2000), que pode se apresentar com vários padrões de herança: ligado ao cromossomo X (DFN) (1 - 3% dos casos), autossômico dominante (DFNA) (15%), e formas autossômicas recessivas (DFNB) (80%). Além disso, existem os casos com herança materna devido a mutações em genes mitocondriais (2 %) (KALATZIS & PETIT, 1998).

Tabela III - Exemplos de síndromes que apresentam deficiência auditiva.

Surdez com malformações craniofaciais e cervicais	Síndrome de Treacher Collins Síndrome de Crouzon Síndrome de Apert
Surdez com displasias esqueléticas	Osteogênese imperfeita Síndrome de Klippel-Feil
Surdez com anomalias cutâneas	Síndrome de Waardenburg
Surdez com disfunção renal	Síndrome de Alport
Surdez com anomalias oculares	Síndrome de Usher Síndrome de Fraser
Surdez com disfunção metabólica	Síndrome de Pendred Síndrome de Hurler
Surdez com anomalias cromossômicas	Trissomia do cromossomo 18 Trissomia do cromossomo 21

Até o momento, com relação às formas não-sindrômicas de surdez, 90 *locus* foram mapeados, sendo 39 para as formas autossômicas recessivas (DFNB) (tabela IV), 51 para as autossômicas dominantes (DFNA) (tabela V), e 8 ligadas ao cromossomo X (DFN) (tabela VI). Foram clonados 25 genes nucleares e 2 genes mitocondriais (<http://dnalab-www.uia.ac.be/dnalab/hhh/>).

Tabela IV – *Locis* envolvidos com as formas não-sindrômicas, autossômicas recessivas de surdez (VAN LAER *et al.*, 1998; VAN CAMP & SMITH, 2000; <http://dnalab-www.uia.ac.be/dnalab/hhh/>).

<i>Locis</i>	Localização	Gene	Marcadores	Referências
DFNB1	13q12	GJB2	D13S143 D13S175 D13S292	Cuilford <i>et al</i> , 1994 Kelsell <i>et al</i> , 1997
DFNB2	11q13.5	MYO7A	D11S911 D11S527 D11S937	Guilford <i>et al</i> , 1994 Liu <i>et al</i> , 1997 Weil <i>et al</i> , 1997
DFNB3	17p11.2	MYO15	D17S122 D17S805 D17S842	Friedman <i>et al</i> , 1995 Wnag <i>et al</i> , 1998
DFNB4	7q31	PDS	D7S501 D7S496 D7S523	Baldwin <i>et al</i> , 1995 Li <i>et al</i> , 1998
DFNB5	14q12	?	D14S79 D14S253 D14S286	Fukushima <i>et al</i> , 1995
DFNB6	3p14-p21	?	D3S1767 D3S1289 D3S1582	Fukushima <i>et al</i> , 1995
DFNB7	9q13-q21	?	D9S50 D9S301 D9S16	Jain <i>et al</i> , 1995
DFNB8	21q22	?	D21S212 D21S1225 D21S1575	Veske <i>et al</i> , 1996
DFNB9	2p22-p23	OTOF	D2S144 D2S171 D2S158 D2S174	Chaib <i>et al</i> , 1996 Yasunaga <i>et al</i> , 1999
DFNB10	21q22.3	?	D21S168 D21S1260 D21S1259	Bonné-Tamir <i>et al</i> , 1996
DFNB12	10q21-q22	?	D10S68 D10S535 D10S580	Chaib <i>et al</i> , 1996
DFNB13	7q34-q36	?	D7S661 D7S498	Mustapha <i>et al</i> , 1998
DFNB14	7q31	?	D7S527 D7S3074	Mustspha <i>et al</i> , 1998
DFNB15	3q21-q25	?	D3S1309 D3S1593 D3S1553	Chen <i>et al</i> , 1997
	19p13		D19S592 D19S221	
DFNB16	2q2415q21-q22	?	THBS1 D15S132 D15S123	Campbell <i>et al</i>

DFNB17	7q31	?	D7S2487 D7S655 D7S480	Grenwald <i>et al</i> , 1998
DFNB18	11p14-p15.1	?	D11S902 D11S921 D11S861	Jain <i>et al</i> , 1998
DFNB19	18p11	?	D18S62 D18S843 D18S378	
DFNB20	11q25-qter	?	D11S969 D11S439	Moynihan <i>et al</i> , 1999
DFNB21	11q	TECTA	D11S4111 D11S925 D11S934	Mustapha <i>et al</i> , 1999
DFNB22	16p12.2	OTOA	?	Zwaenepoel <i>et al.</i> , 2002
DFNB23	10p11.2-q21	?	D10S220 D10S1762 D10S1652	Richard Smith, unpublished
DFNB24	11q23	?	D10S2017 D10S1986 D10S199 2	Richard Smith, unpublished
DFNB25	4p15.3-q12	?	D4S1632 D4S405 D4S428	Richard Smith, unpublished
DFNB26	4q2 modif. 1q22-23	?	D4S424 D4S1604 D1S1153 D1S1679	Riazzuddiun <i>et al</i> , 1999
DFNB27	2q23-q31	?	D2S326, D2S2257, D2S2273	Pulleyn <i>et al.</i> , 2000
DFNB28	22q13	?	D22S283, D22S423, D22S274	
DFNB29	21q22	CLDN14		Wilcox <i>et al.</i> , 2001
DFNB30	10p12.1	MYO3A	D10S1160, D10S1775, D10S197	
DFNB31	9q32-q34	WHRN		Mustapha <i>et al.</i> , 2002
DFNB32	1p13.3-22.1	?		Masmoudi <i>et al.</i> , 2003
DFNB33	9q34.3	?		Medlei-Hashim <i>et al.</i> , 2002
DFNB34	?	?		
DFNB35	14q24.1-24.3	?		Ansar <i>et al.</i> , 2003
DFNB36	?	?		
DFNB37	6q13	MYO6		Ahmed <i>et al.</i> , 2003

DFNB38 ? ?
 DFNB39 ? ?

DFNB= forma de deficiência auditiva genética não-sindrômica de transmissão autossômica recessiva

?= desconhecido nd= informação não disponível

Tabela V- *Locis* envolvidos com as formas não-sindrômicas, autossômicas dominantes de surdez (VAN LAER *et al.*, 1998; VAN CAMP & SMITH, 2000; <http://dnalab-www.uia.ac.be/dnalab/hhh/>).

<i>Locis</i>	Localização	Gene	Marcadores
DFNA1	5q31	HDIA1	D5S640 D5S410 D5S412
DFNA2	1p34	GJB3 KCNQ4	D1S255 MYCL1 D1S193
DFNA3	13q12	GJB2 GJB6	D13S143 D13S175 D13S292
DFNA4	19q13	?	D19S208 D19S2224 ApoC2
DFNA5	7p15	?	D7S629 D7S673 D7S529
DFNA6	4p16.3	?	D4S1614 D4S412 D4S132
DFNA7	11q21-q23	?	D1S194 D1S196 D1S210
DFNA8	11q22-24	TECTA	D11S41111 D11S925 D11S934
DFNA9	14q12-q13	COCH	D14S54 D14S121 D14S49
DFNA10	6q22-q13	?	D6S267 D6S407 D6S472
DFNA11	11q12.3-q21	MYO7A	D11S911 D11S527 D11S937
DFNA12	11q22-q24	TECTA	D11S41111 D11S925 D11S934
DFNA13	6p21	?	D6S1051 D11S1680 D6S1666
DFNA14	4p16	?	D4S2925 D4S3023 D4S431 D4S2935
DFNA15	5q31	POU4F3	D5S436 D5S210
DFNA16	2q24	?	D2S2380 D2S335

DFNA17	22q	?	D22S280 D22S282
DFNA18	3q22	?	
DFNA19	17q25	?	
DFNA20	17q25	?	D17S1806,D17S928
DFNA21	6p21	?	
DFNA22	6q13	MYO6	D6S257, D6S445
DFNA23	14q	?	
DFNA24	4q	?	
DFNA25	12q21-24	?	
DFNA26	17q25	?	D17S784 D17S914 D17S970
DFNA27	4q12	?	D4S428 D4S392
DFNA28	8q22	?	GAAT1A4 D8S1132
DFNA29	?	?	
DFNA30	15q26	?	D15S130 D15S127
DFNA31	?	?	
DFNA32	?	?	
DFNA33	?	?	
DFNA34	?	?	
DFNA35	?	?	
DFNA36	9q13-q21	TMC1	
DFNA37	?	?	
DFNA38	4p16	WFS1	
DFNA39	4q21.3	?	
DFNA40	16p12	?	
DFNA41	12q24-qter	?	
DFNA42		?	
DFNA43	2p12	?	

DFNA44	3q28-29	?
DFNA45	?	?
DFNA46	?	?
DFNA47	9p21-22	?
DFNA48	12q13-q14	?
DFNA49	?	?
DFNA50	?	?
DFNA51	9q21	?

DFNA= forma de deficiência auditiva genética não-sindrômica de transmissão autossômica dominante

?= desconhecido nd= informação não disponível

Tabela VI - *Locis* envolvidos com as formas de surdez de transmissão ligada ao cromossomo X (VAN LAER *et al.*, 1998; VAN CAMP & SMITH, 2000; <http://dnalab-www.uia.ac.be/dnalab/hhh/>).

<i>Locis</i>	Localização	Gene	Marcadores
DFN1	Xq22	DDP	DXS101
DFN2	Xq22	?	COL4A5
DFN3	Xq21.1	POU3F4	DXS26 DXS995 DXS232
DFN4	Xq21.2	?	DXS997 CXS992
DFN5			
DFN6	Xp22	?	DXS8036 DXS8022 DXS8019
DFN7	?	?	
DFN8	?	?	

?= desconhecido

nd= informação não disponível

Não surpreende a quantidade de *loci* envolvidos no fenótipo da surdez, se considerarmos que a cóclea é um dos órgãos mais complexos do ser humano. Como responsável pela audição, esta utiliza aproximadamente 16.000 células sensoriais ciliadas que dependem, para seu bom funcionamento, de despolarização da membrana celular e transdução mecanoelétrica, liberação da transmissão e transporte de íons, entre outros eventos (AVRAHAN, 1997).

Os estudos genéticos da surdez não-sindrômica têm sido muito lentos em decorrência da similaridade dos fenótipos associados aos diversos genótipos. Entretanto, grandes avanços ocorreram nos últimos cinco anos. Apesar do grande número de *loci* envolvidos na surdez não-sindrômica, particularmente naquela com padrão de herança autossômico recessivo, a descoberta de que mutações no gene da conexina 26 (GJB2) são responsáveis pela grande maioria desses casos mudou consideravelmente a prática clínica do aconselhamento genético nessa área (LIU *et al.*, 1997; KELSELL *et al.*, 1997).

O gene GJB2 foi o primeiro a ser identificado como sendo responsável pela surdez neurossensorial não-sindrômica de padrão autossômico recessivo. Este gene localiza-se no *locus* DFNB1, na região cromossômica 13q12 (KELSELL *et al.*, 1997). A partir de então, muitos outros genes envolvidos no fenótipo da surdez neurossensorial não-sindrômica foram clonados e estão sendo estudados.

Acredita-se hoje, que o gene da conexina 26 (GJB2), seja o principal responsável pela deficiência auditiva neurossensorial congênita (GASPARINI *et al.*, 2000).

1.6 Conexinas

Em termos evolucionários, as conexinas podem ser agrupadas em pelo menos três subfamílias: α , β , e γ , a conexina 26, por exemplo, é uma beta conexina: **GJB2** (gap junction protein, beta-2). Entretanto, a nomenclatura mais comum é baseada no peso molecular da proteína, isto é, Cx26 (GB2), Cx30 (GJB6), Cx31 (GJB3), Cx32 (GJB1), Cx43 (α 1) e assim sucessivamente (KRUTOVSKIKH & YAMASAKI, 2000). Mutações nestes genes causam surdez com herança autossômica recessiva (GJB2 e GJB3), autossômica dominante (GJB2, GJB3 e GJB6) ou ligada ao X (GJB1). Além disso, são responsáveis tanto por surdez síndrômica (GJB2, ceratoderma palmoplantar; GJB3, variabilidade eritoderma; e GJB1, neuropatia periférica), quanto não-síndrômica (GJB2, GJB3 e GJB6) (RABIONETE *et al.*, 2000).

1.7 O Gene GJB2

As descobertas mais importantes até o momento no estudo molecular da deficiência auditiva referem-se às mutações observadas no gene da conexina 26 (GJB2), que se revelaram como a origem mais freqüente da surdez de herança autossômica recessiva. KELSELL *et al* (1997) estavam inicialmente estudando uma família que apresentava tanto ceratoderma palmoplantar (PPK) quanto surdez neurossensorial congênita. Por meio de uma avaliação clínica, presumiu-se que a PPK não estava associada a surdez. Estudos de ligação indicaram o envolvimento dos fenótipos na região 13q11-12, onde 3 *loci* haviam

sido localizados: o da surdez não-sindrômica autossômica recessiva (DFNB1), o da surdez não-sindrômica autossômica dominante (DFNA3), e o da doença de Clouston (displasia ectodérmica hidrótica – HED). O gene candidato para ambas as doenças, PPK e HED, encontrado na região 13q12, foi identificado como o codificador da proteína conexina 26 (GJB2 ou Cx26). Este gene contém somente dois exons, um exon 5' não codificante, e um codificante de aproximadamente 800 pb separados por uma região 5' → 3' não codificante (DENOYELLE *et al.*, 1999).

Baseados nessas observações, esses pesquisadores resolveram procurar por mutações no gene da conexina 26 nos indivíduos afetados por PPK ou HED. Entretanto, uma substituição (T → C) no códon 34 do gene foi identificada nos indivíduos que apresentavam surdez neurosensorial. A partir de então, o gene GJB2 foi investigado com relação a sua expressão em cóclea, ducto coclear e estria vascular de rato. Cruzando estes dados, o gene apresentou-se como forte candidato a responsável pela surdez não-sindrômica neurosensorial (KESELL *et al.*, 1997).

A comprovação posterior de que mutações no gene GJB2 estão envolvidas em 50% dos casos de surdez pré-lingual não-sindrômica de herança autossômica recessiva, o que corresponde a 10% -20% de todos os casos de surdez (WILCOX *et al.*, 2000), mudou a prática do aconselhamento genético nessa área, principalmente considerando o fato de que uma mutação específica (35delG) está presente em 80% dos casos onde este gene está envolvido (DENOYELLE *et al.*, 1997; COHN *et al.*, 1999).

Já existem mais de 50 mutações descritas no gene GJB2, resultando tanto em formas dominantes quanto recessivas de surdez não-sindrômica. A maioria das mutações se encontra relacionada com as formas recessivas (<http://www.iro.es/cx26deaf.html>).

1.7.1- A Mutação 35delG

A mutação 35delG, cuja detecção tem alta relevância no rastreamento genético da surdez, é observada em indivíduos de diferentes grupos étnicos: árabes, beduínos, caucasóides, indianos, israelenses, italianos, paquistaneses, espanhóis, entre outros. Trata-se da deleção de uma guanina (G) de uma série de seis guaninas que se estendem da posição 30 à 35 no gene GJB2. Essa deleção, que está presente no códon 10, altera o quadro de leitura de aminoácidos (*frameshift*). Com isso, a glicina é convertida para valina no códon 13 e é formado um *stop códon* logo após (tabela VII) (DENOYELLE *et al.*, 1997; ESTIVILL *et al.*, 1998; SCOTT *et al.*, 1998; GASPARINI *et al.*, 2000; SOBE *et al.*, 2000).

Estudos têm demonstrado uma alta frequência de portadores da mutação 35delG em diferentes regiões geográficas. A partir desses estudos algumas hipóteses estão surgindo para explicar esses achados. O fato de que em países europeus o índice de heterozigotos para mutação 35delG é bastante alto, principalmente na região sul, sugere que esta mutação possa ter se originado neste continente. A alta frequência de portadores também pode, por outro lado, indicar um efeito fundador ou uma vantagem seletiva para os heterozigotos, ou mesmo uma combinação entre ambos (GASPARINI *et al.*, 2000). Atualmente foram

detectados dois raros SNPs (*single nucleotide polymorphisms*) com desequilíbrio de ligação com a mutação 35delG em diferentes populações, demonstrando assim que o defeito molecular 35delG não é um *hotspot* (ROTHROCK *et al.*, 2003).

Pesquisas sobre a incidência da mutação 35delG mostraram que a frequência de heterozigotos na Europa é, em média, de 1 em cada 51 indivíduos (GASPARINI *et al.*, 2000). No estado de São Paulo, foram identificados seis heterozigotos para a mutação 35delG, em uma amostra aleatória de 620 neonatos, ou seja, uma proporção de 0,97% (SARTORATO *et al.*, 2000). Outro estudo mostrou que a mutação 35delG é a mais freqüente entre os deficientes auditivos não sindrômicos brasileiros; entre uma amostra de 36 pacientes surdos de etiologia não definida, 22% eram portadores da mutação 35delG. (OLIVEIRA *et al.*, 2002).

A alta freqüência de surdez pré-lingual de herança autossômica recessiva é um indício de que muitas pessoas da população sejam portadoras de mutações no gene da conexina 26 (DENOYELLE *et al.*, 1997). A penetrância determinada pela homozigose para a mutação 35delG é bastante variável, de surdez leve/moderada à profunda, havendo também alguns casos de surdez progressiva. Esta variabilidade fenotípica sugere que outros fatores possam compensar a inatividade da Cx26 na função coclear (STEEL, 1999). Esses possíveis fatores modificadores dos efeitos desta mutação poderiam também explicar o fato de alguns indivíduos que são heterozigotos para mutações no gene GJB2 apresentarem deficiência auditiva (WILCOX *et al.*, 2000).

Tabela VII – Alteração no quadro de leitura da proteína Cx26 na presença da mutação 35delG.

Mutação	Seqüência dos aminoácidos
35delG	Mutado: Gln Thr Ile Leu Gly Val
	STP
	Normal: Gln Thr Ile Leu Gly Gly
	Val
aa: 7 8 9 10 11 12 13	

1.7.2- Outras mutações

Além da mutação 35delG, outras mutações no gene GJB2 causadoras de surdez foram descritas, dentre as quais devem ser mencionadas: a 167delT e a 235delC.

A mutação 167delT resulta em um códon de terminação precoce no códon 81, e esta localizada no segundo *loop* extracelular da conexina 26. Não existem dados acerca da freqüência desta mutação na população em geral, mas em Judeus Askenazitas 4,3% dos surdos analisados eram portadores desta mutação, enquanto apenas 0,7% eram portadores da mutação 35delG (MORELL *et al.*, 1998).

Já a mutação 235del C tem sido observada em orientais (populações japonesas e chinesas), sendo nestas populações, a mais freqüente das mutações. Entre os pacientes Japoneses com deficiência auditiva de origem genética, sua freqüência foi estimada em 2:203. Nenhum dos estudos realizados nessas populações identificaram a mutação 35delG (FUSE *et al.*, 1999).

1.8 - Outros genes

Além do gene da conexina 26 (GJB2), existem outros genes que também estão envolvidos com a deficiência auditiva neurosensorial não-sindrômica. Recentemente foi descrita uma grande deleção no gene GJB6 [$\Delta(GJB6-D13S1830)$]. Esta mutação é recessiva, causando surdez em indivíduos homocigotos ou duplos heterocigotos (para esta deleção e para mutações no gene GJB2). Nos indivíduos duplos heterocigotos, a deleção foi observada em *trans* com outra mutação no gene da conexina 26 (35delG, 167delT) (LERER, *et al.*, 2001; PALLARES-RUIZ, *et al.*, 2002). Na população francesa, esta mutação foi reportada como a segunda mais freqüente causa da surdez pré-lingual, sendo a mais freqüente a mutação 35delG (CASTILLO *et al.*, 2002).

Outro importante gene relacionado com a deficiência auditiva neurosensorial autossômica recessiva (DFNB 9) é o chamado OTOF (YASUNAGA *et al.*, 2000). Até o momento cinco diferentes mutações foram detectadas neste gene em famílias portadoras de surdez (YASUNAGA *et al.*, 2000; MIGLIOSI *et al.*, 2002).

1.9 - DNA mitocondrial e sua relação com a deficiência auditiva

1.9.1 - O DNA mitocondrial

O DNA mitocondrial (mtDNA) é um pequeno genoma circular localizado no interior da mitocôndria, a qual encontra-se no citoplasma da célula. Há a hipótese da mitocôndria ter se originado como um simbiote de células proto-eucarióticas há aproximadamente 1,5 a 2 bilhões de anos (WALLACE *et al.*,1999), e conseqüentemente possuir a molécula de DNA diferente, autônoma e independente do DNA nuclear.

Há centenas de mitocôndrias em cada célula eucariótica, e elas possuem variadas funções metabólicas, sendo a mais importante a síntese de ATP através da fosforilação oxidativa. Cada mitocôndria possui de 2 a 10 moléculas de mtDNA; assim, cada célula contém milhares moléculas de mtDNA. Devido este fato podemos observar mutações homoplásmicas ou heteroplásmicas, ou seja, uma mutação pode estar presente em todas as cópias do DNA mitocondrial (homoplasmia) ou apenas em parte delas (heteroplasmia).

Cada uma destas moléculas de mtDNA constitui-se de 16.569 bp, dupla fita, em forma de círculo fechado. A molécula de mtDNA codifica 13 genes de mRNA, 2 de rRNA, e 22 de tRNA, específicos desta organela. Os 13 mRNA são transcritos em ribossomos mitocondriais-específicos, através de um código também específico, em 13 proteínas. Estas proteínas interagem com aproximadamente 60 proteínas codificadas no núcleo para formar 5 complexos enzimáticos requeridos na fosforilação oxidativa. Estes complexos, situados

na membrana das mitocôndrias, estão envolvidos na cadeia transportadora de elétrons e síntese de ATP (ATTARDT & SCHATZ, 1988).

O DNA mitocondrial é transmitido exclusivamente pela mãe, já que apenas as mitocôndrias do oócito são transmitidas de uma geração para a próxima. O espermatozóide não contribui com mtDNA à prole (WALLACE *et al.*, 1999).

Apenas 1 Kb do mtDNA de mamíferos não é codificante, sendo portanto considerado compacto. Ao contrário do DNA nuclear, o DNA mitocondrial não interage com histonas, apresentando assim maior instabilidade devido à falta de proteção, função desempenhadas por estas proteínas. Além disso, este DNA está constantemente exposto a radicais livres devido à proximidade com a cadeia respiratória. Acredita-se que seja em decorrência destes fatos que a taxa de mutação deste ácido nucléico é maior que a do DNA nuclear. Outro importante fato que contribui com a alta taxa de mutação nesta molécula é a ausência de um sistema de reparo.

Desordens mitocondriais geralmente geram doenças que afetam tecidos que requerem altos níveis de energia, como o muscular e o nervoso. Também é comum observar deficiência auditiva causada por danos mitocondriais (mutações no mtDNA), já que a cóclea é um órgão altamente dependente do metabolismo da cadeia respiratória (PETTY *et al.*, 1986).

1.9.2 - Mutações mitocondriais que causam surdez

Mutações nos genes mitocondriais podem causar deficiência auditiva síndrômica ou não-síndrômica. A tabela VIII lista as mutações mitocondriais que provocam surdez síndrômica, e a tabela IX as mutações que originam deficiência auditiva não-síndrômica.

Tabela VIII - Mutações mitocondriais associadas à deficiência auditiva síndrômica (dnalab-www.uia.ac.be/dnalab/hhh/).

Gene	Mutação	Fenótipo	Referências
tRNA Leu(UUR)	3243A→G	MELAS e MIDD	Goto <i>et al</i> , 1990 van den Ouweland <i>et al</i> , 1992
tRNA ^{Lys}	8344A→G	MERRF	Shoffner <i>et al</i> , 1990
	3856T→C	MERRF	Zeviani <i>et al</i> , 1992
	8296A→G	MIDD	Kameoka <i>et al</i> , 1998
tRNA ^{Ser} (UCN)	7512T→C	Progressiva mioclonia, epilepsia, ataxia e surdez	Jaksch <i>et al</i> , 1998b
muitos	Deleção grande	KSS	Moraes <i>et al</i> , 1989
muitos	Deleção grande/duplicação	MIDD	Ballinger <i>et al</i> , 1992
tRNA ^{Glu}	14709T→C	MIDD	Hao <i>et al</i> , 1995

MELAS=*Mitochondrial encephalopathy, lactic acidosis and stroke-like episodes*,
 KSS=*Kearns-Sayre Syndrome*, MERRF=*Myoclonic epilepsy and red fibers*,
 MIDD=*Maternally inherited diabetes and deafness*

Tabela IX - Mutações mitocondriais associadas à deficiência auditiva não-sindrômica(dnalab-www.uia.ac.be/dnalab/hhh/).

Gene	Mutação	Sintomas adicionais	Referências		
12SrRNA	1555A→G	Sem provas	Prezant <i>et al</i> , 1993		
			Usami <i>et al</i> , 1998		
			Estivill <i>et al</i> , 1998		
tRNASer(UCN)	7445A→G	Queratodermia palmoplantar	Reid <i>et al</i> , 1994		
			Fischel-Ghodsian <i>et al</i> , 1995		
			Sevior <i>et al</i> , 1998		
			7472insC	Disfunção neurológica,	Tiranti <i>et al</i> , 1995
				incluindo ataxia e mioclonia	Jaksch <i>et al</i> , 1998 a
		Jaksch <i>et al</i> , 1998 b			
	7510T→C	Nenhuma ocorrência	Schuelke <i>et al</i> , 1998		
	7511T→C	Nenhuma ocorrência	Sue <i>et al</i> , 1999		

Entre as formas de surdez sindrômica, é freqüente observar a deficiência auditiva como parte do fenótipo de síndromes neuromusculares como KSS, MERRF e MELAS ou

ainda como acompanhantes da diabetes melitus de herança materna (http://danalab-www.uia.ac.be/hhh/mito_bory.html):

- KSS (*Kearns-Sayre Syndrome*)

Oftalmoplegia externa progressiva (PEO) e retinopatia que se manifesta antes de 20 anos de idade; ataxia, bloqueio cardíaco ou CSF. A surdez neurosensorial pode fazer parte do fenótipo.

-MERRF (*Myoclonic epilepsy and red fibers*)

O fenótipo é caracterizado pela mioclonia, epilepsia e ataxia, embora, a demência, atrofia óptica e surdez também possam ocorrer.

-MELAS (*Mitochondrial encephalopathy, lactic acidosis and stroke-like episodes*)

MELAS é uma doença infantil caracterizada por vômitos intermitentes, fraqueza nas pernas e braços e cefaléia recorrente semelhante a uma pancada; é também frequentemente associada com baixa estatura. Há uma grande variedade de sintomas entre os pacientes, incluindo a surdez em aproximadamente 30% das pessoas afetadas.

-MIDD (*Maternally inherited diabetes and deafness*)

Em muitas famílias com diabetes melitus e surdez neurosensorial, têm sido descritas mutações mitocondriais. A que tem sido observada mais frequentemente é a mutação 3243A→G, também observada como causadora da MELAS. Em estudos de

populações diabéticas, a 3243A→G tem sido encontrada em uma pequena porcentagem dos pacientes (NEWKRIRK *et al.*, 1997).

Com relação à surdez não-sindrômica, cinco mutações mitocondriais, até o momento, foram reportadas em alguns pacientes. Porém, para duas destas cinco mutações, tem-se observado sintomas adicionais acompanhando a deficiência auditiva. Com exceção da mutação A1555G, todas as mutações não-sindrômicas estão localizadas no gene tRNASer(UCN).

1.9.3 - Mutação A1555G

1.9.3.1 – Aspectos gerais da mutação A1555G

O defeito molecular homoplásmico A1555G, localizado no gene ribossomal 12S rRNA, o primeiro a ser identificado no DNA mitocondrial como responsável pela surdez, foi descrito em 1993 em uma grande família árabe-israelita (PREZANT *et al.*, 1993). Esta mutação apresenta altas frequências em certas populações como a espanhola e a japonesa. Até o momento, não há estudos publicados desta mutação entre a população brasileira.

A importância deste defeito molecular está no fato de ser constatado em altas frequências nos pacientes com deficiência auditiva neurosensorial que tiveram contato com medicamentos aminoglicosídicos, o que faz crer que em muitos desses casos a surdez

relacionada à mutação mitocondrial, possa ter sido induzida pelo uso de aminoglicosídeos (USAMI, 1997; CASANO *et al.*, 1998; ESTIVILL *et al.*, 1998; USAMI *et al.*, 2000).

A ototoxicidade aminoglicosídea é uma das causas mais comuns de surdez adquirida. Apesar dos danos vestibulo–cloqueares serem quase universais quando os indivíduos são expostos a altos níveis de aminoglicosídeo por períodos prolongados, e na exposição de baixas quantidades desses medicamentos há significativo componente genético influenciando na susceptibilidade para ototoxicidade (KONIGSMARK *et al.*, 1976; HIGASHI, 1989; HU *et al.*, 1991).

Além do fato de, em inúmeras famílias, terem sido descritos casos de surdez após a exposição a aminoglicosídeos, diferenças entre os limiares de susceptibilidade a essas drogas também sugerem um componente genético (STEBBINS *et al.*, 1981).

Este componente genético foi identificado com a análise de três famílias chinesas, nas quais muitos indivíduos desenvolveram surdez após o uso de aminoglicosídeos. Sabendo dos efeitos dos aminoglicosídeos na capacidade de tradução dos ribossomos e do padrão de herança materna para a surdez que estas famílias apresentavam, foram rastreados defeitos genéticos nos genes de rRNA mitocondrial, assim detectando uma mutação no gene 12S r RNA nas três famílias analisadas (PREZANT *et al.*, 1993).

Acredita-se que além desta mutação existam outros fatores genéticos e ambientais influenciando na susceptibilidade à ototoxicidade, pois não se observa um único padrão fenotípico entre os portadores desta mutação. Um fator nuclear foi descrito como uma das

possíveis influências nas diferenças fenotípicas relacionadas à deficiência auditiva associada a mutação A1555G (GUAN *et al.*, 1996). Na China uma pequena proporção de pacientes sem um histórico familiar positivo para ototoxicidade a aminoglicosídeos exibiu esta mutação (FISCHEL-GHODSIAN *et al.*, 1995).

Estudos realizados nos E.U.A. mostraram uma frequência de 15% da mutação A1555G nos casos de surdez induzida por aminoglicosídeo (FISCHEL-GHODSIAN *et al.*, 1997); já no Japão, o número encontrado foi de 30% (HU *et al.*, 1991). Esta diferença de frequência pode ser reflexo do maior e mais prolongado uso de aminoglicosídeos nos E.U.A. (FISCHEL-GHODSIAN, 1997)

1.9.3.2 – Ototoxicidade

As ototoxicoses são provocadas por drogas medicamentosas que alteram o ouvido interno. Podendo afetar o sistema coclear, ou o sistema vestibular, ou ambos.

Diferentes tipos de drogas podem causar ototoxicidade. Entre elas está o grupo dos antibióticos aminoglicosídeos, como a estreptomicina, a diidroestreptomicina, a neomicina, a canamicina A e B, a paramomicina, a aminosidina, a gentamicina, a amicacina a tobramicina, anetilmicina. Desse grupo, estreptomicina, tobramicina e gentamicina são mais vestibulotóxicos que cocleotóxicos; sendo os demais mais cocleotóxicos. Alguns antibióticos não aminoglicosídeos têm sido citados na literatura como ototóxicos. São eles: a eritromicina, com efeitos reversíveis; o cloranfenicol, principalmente por ação tópica; a

ampicilina; a miocilina, derivado da tetraciclina com ação vestibulotóxica; a cefalosporina, com poucas referências; a viomicina; a capreomicina, com maior toxicidade vestibular; a polimixina B e E; e a colistina.

Outros grupos de drogas ototóxicas são os desinfetantes, como clorexidine, benzetônio, benzalcônio, iodo, iodine e iodoforo, e álcoois, como etanol e propilenoglicol. Essas drogas são usadas às vezes para assepsia em cirurgias do ouvido médio, podendo provocar ototoxicidade por ação local. Há também o grupo dos beta-bloqueadores, como practolol e propanolol, aos quais se atribuem alterações cocleares com perda auditiva. Diuréticos como o ácido etacrínico, a furosemida, a bumetanina, a piretamida e a indapamida são cocleotóxicos, mas as alterações auditivas são reversíveis. Entretanto, embora essas drogas não sejam vestibulotóxicas; potencializam a ação dos aminoglicosídeos.

Drogas antiinflamatórias, como salicilatos, aspirina e quinino, podem provocar alterações auditivas, mas a cocleototoxicidade dos salicilatos e da aspirina é reversível. Antineoplásticos também podem ser ototóxicos, como é o caso da cisplatina, da mostarda nitrogenada e da vincristina, podendo ser reversível ou não. Os contraceptivos orais podem provocar perdas auditivas uni ou bilaterais progressivas e irreversíveis (BLACK & PESZNECKER, 1993).

Dos grupos de drogas ototóxicas, os antibióticos aminoglicosídeos são talvez os mais importantes, e sem dúvida os mais estudados. Alguns autores concluíram que estes antibióticos se ligam a receptores das membranas das células ciliadas do órgão de Corti, da mácula sacular e da utricular e das cristas do sistema vestibular. Esses receptores são os

polifosfoinosítidios, componentes da membrana celular com papel importante nos eventos bioelétricos e na permeabilidade da membrana por interação com o íon cálcio. A formação de complexos entre os antibióticos aminoglicosídeos e os polifosfoinosítidios produz modificações na fisiologia da membrana e na sua permeabilidade, acabando por afetar a estrutura e a função dos cílios, em primeiro lugar, depois da própria membrana, e finalmente, por causar destruição das células receptoras (SCHACHT, 1993).

1.9.4 - Mutação A7445G

A mutação A7445G foi encontrada em uma família da Escócia e uma da Nova Zelândia. Ambas as famílias apresentavam deficiência auditiva neurosensorial não-sindrômica de padrão de herança materna (REID *et al.*, 1994; FISCHEL-GHODSIAN *et al.*, 1995). A avaliação clínica da família da Nova Zelândia revelou queratoderma palmoplantar em muitos de seus membros. Além disso, a mutação A7445G foi detectada em uma família japonesa com queratoderma palmoplantar e surdez neurosensorial progressiva (SEVIOR *et al.*, 1998).

Esta mutação também demonstrou ser um defeito molecular homoplasmico em todas as famílias em que foi encontrada até o momento (FISCHEL-GHODSIAN, 2000).

Curiosamente, a penetrância desta mutação para os deficientes auditivos da família escocesa mostrou-se baixa, enquanto que nas famílias da Nova Zelândia e Japão apresentou-se muito alta. A mutação A7445G é uma mudança silenciosa no último

nucleotídeo do gene da cadeia pesada do citocromo oxidase I e no nucleotídeo adjacente da terminação 3' do gene do tRNASer(UCN) (cadeia leve). A mutação interfere mecanicamente no processamento da cadeia leve do mRNA policistronico, com significativa diminuição na quantidade de tRNASer(UCN) (GUAN *et al.*, 1997). A diferença da penetrância nestas situações é aparentemente devida uma diferença de haplótipos mitocondriais. Na família da Nova Zelândia, a seqüência completa do mtDNA revelou três mudanças adicionais no gene do complexo protéico I (FISCHEL-GHODISIAN *et al.*, 1995).

1.9.5 - Mutação 7472insC

Também no gene do tRNASer(UCN), a inserção de um C na posição do nucleotídeo 7472, foi observada em uma família italiana com surdez progressiva, isolada ou acompanhada de ataxia, disartria e, mais raramente mioclonia focal (TRIANI *et al.*, 1995). Esta mutação também foi encontrada em uma família holandesa com deficiência auditiva progressiva de herança materna (VERHOEVEN *et al.*, 1999). A surdez era do tipo não síndrômico em todos os membros da família, exceto em uma pessoa que adicionalmente sofria também de ataxia e mioclonia.

Jaksch *et al.* (1998) observaram diversas pessoas em pequenas famílias que eram homoplásmicas para a inserção 7472. Além de deficiência auditiva, os portadores desta mutação sofriam de epilepsia mioclônica, ataxia e deficiência mental.

1.9.6- Mutações T7510C e T7511C

Hutchin *et al.* (1999) identificaram uma família com deficiência auditiva progressiva de herança materna não associada a nenhum outro sintoma. Nesta família, foi detectada uma nova mutação de uma timina para uma citosina no gene do tRNASer(UCN), na posição 7510. A mutação não estava presente nos controles, e a mutação era homoplásmica nos indivíduos afetados.

Uma grande família com deficiência auditiva de herança materna foi estudada por Friedman *et al.* (1999). O histórico familiar não revelou nenhuma outra deficiência além surdez, que era progressiva. O rastreamento de mutações no mtDNA revelou uma mutação pontual (T7511C) no gene do tRNASer(UCN). Dezoito dos vinte membros surdos da família possuíam seu DNA mutado.

1.10 - Aconselhamento genético

Segundo os autores Silva e Duarte (1995), o aconselhamento genético é um processo de comunicação que visa, especialmente, orientar casais sobre o risco de doenças genéticas em descendentes e fornecer-lhes informação pertinente, exposta de forma simples, sincera e direta.

A essência do processo de aconselhamento genético é a mesma, tanto envolvendo deficientes auditivos, como pessoas portadoras de outras anomalias genéticas. No entanto, tratando-se de deficiência auditiva, dois aspectos específicos fundamentais devem ser considerados: a questão sócio-cultural e a heterogeneidade etiológica.

A deficiência auditiva como cultura é uma consequência natural do agrupamento de crianças surdas em escolas especiais e do uso de uma linguagem gestual comum, a linguagem dos sinais. Nos Estados Unidos, 90% dos adultos deficientes auditivos casam-se com pessoas também deficientes auditivas, havendo casais que manifestam predileção por filhos deficientes auditivos (ARNOS, 1994). No Brasil não há dados a respeito deste assunto, mas a questão da autonomia reprodutiva entre os surdos vem sendo discutida, principalmente pela doutora em antropologia Débora Diniz. (SILVA & DUARTE, 1995).

A outra questão relevante no aconselhamento genético é a heterogeneidade etiológica da deficiência auditiva. Uma grande parcela dos afetados é representada por casos esporádicos de surdez isolada (SILVA & DUARTE, 1995). Nos casos em que apenas uma pessoa é afetada na família, sem anomalias associadas que permitam o diagnóstico de síndrome específica e sem história de consangüinidade, torna-se praticamente impossível definir se o paciente apresenta deficiência auditiva de etiologia genética ou ambiental. Nestas circunstâncias, um levantamento minucioso de dados sobre antecedentes gestacionais e intercorrências pós-natais pode auxiliar na exclusão ou não da influência de fatores ambientais. Quando tais fatores são excluídos, o aconselhamento genético é complicado pela presença de heterogeneidade genética. Desta forma, é de extrema

importância fornecer aos consulentes, ao menos riscos empíricos, calculados com base em pesquisas populacionais sobre a ocorrência e recorrência da perda auditiva.

Mesmo em um país como o Brasil, onde a deficiência auditiva de etiologia ambiental predomina, a frequência de casos de etiologia genética é significativa (16%). Braga *et al.* (1999) estudaram uma amostra brasileira, observando que o risco de recorrência para irmãos de casos afetados isolados é de 3% quando as causas ambientais da deficiência auditiva não podem ser excluídas; mas aumenta para 21% quando são eliminadas. Quando a consangüinidade parental está presente, os respectivos riscos aumentam para 17% e 25%.

Sendo assim, com a possibilidade de etiologia genética para a deficiência auditiva, é relevante que as famílias de afetados recebam orientação quanto aos riscos de recorrência do problema em filhos e outros parentes mais próximos. Geralmente os médicos que acompanham as crianças encaminham suas famílias para serviços de aconselhamento genético. A decisão de ter filhos ou não é da competência exclusiva dos casais; entretanto, estes casais devem estar supridos de informações suficientes que lhes permitam tomar decisões conscientes.

Este estudo, ao investigar a presença das mutações A1555G e A7445G e, com isso, criar estimar a prevalência destas mutações entre os brasileiros portadores de deficiência auditiva neurosensorial não-sindrômica sem mutações no gene da conexina 26, também teve o propósito de ativamente auxiliar no aconselhamento genético, além de alertar os pesquisadores que também trabalham com estas mutações quanto à conveniência de

padronizar a metodologia deste tipo de estudo para possibilitar a agregação de resultados, a fim de produzir uma análise estatística significativa dos dados.

2 – OBJETIVOS

Investigar as mutações A1555G e A7445G, respectivamente nos genes mitocondriais 12S rRNA e tRNASer(UCN), em indivíduos brasileiros, portadores de deficiência auditiva neurossensorial não-sindrômica e com ausência de mutações no gene GJB2.

Determinar a frequência da mutação A1555G em três tipos de amostras:

- pacientes com histórico de complicações neonatais e possível exposição a medicamentos aminoglicosídeos
- pacientes com menores probabilidades de exposição a esses medicamentos
- pacientes sem avaliação genético-clínica prévia

3 - MATERIAL E MÉTODOS

3.1 – Casuística

Estudou-se um total de 206 casos índices, sendo 78 provenientes do CEPRE (Centro de Estudos e Pesquisas em Reabilitação Prof. Dr. Gabriel Porto), 98 do HC-UNICAMP (Hospital das Clínicas da Universidade Estadual de Campinas) e 30 da ABRAE (Associação Brasileira dos Amigos de Excepcionais); que apresentavam deficiência auditiva neurosensorial não-sindrômica. A idade dos pacientes variava entre 1 e 57 anos. Todos os indivíduos incluídos na amostra tiveram sua participação previamente autorizada pelos responsáveis, mediante assinatura do consentimento pós-informação (Anexo 8.1), após o esclarecimento sobre o estudo a ser realizado.

A amostra foi dividida em 3 grupos para o estudo da mutação A1555G, já que este defeito molecular está associado à predisposição a ototoxicidade.

Grupo A - pacientes com histórico de complicações neonatais e exposição possível ou comprovada a medicamentos aminoglicosídeos (16 indivíduos – 12mulheres e quatro homens).

Grupo B - pacientes cuja história clínica indica menor probabilidade de exposição a esses medicamentos (62 indivíduos – 33mulheres e 29 homens).

Grupo C – pacientes com antecedentes pessoais não conhecidos (128 indivíduos – 59 mulheres e 69 homens).

Os indivíduos dos grupos A e B foram selecionados entre os pacientes atendidos no Ambulatório de Genética do Centro de Estudos e Pesquisa em Reabilitação (CEPRE); esse ambulatório faz parte do serviço de Genética Clínica do Departamento de Genética Médica da Faculdade de Ciências Médicas (FCM) da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP). A médica responsável pela seleção foi a Dra. Andréa Trevas Maciel Guerra. Os pacientes selecionados foram avaliados clinicamente a fim de excluir ao máximo a influência de fatores ambientais na etiologia da surdez.

Em relação aos pacientes selecionados no CEPRE, realizou-se um levantamento do histórico clínico de cada um, separando os que apresentavam complicações neonatais e exposição possível ou comprovada a medicamentos aminoglicosídeos (Grupo A), dos que não apresentavam essas características (Grupo B).

Dentre os pacientes do Grupo C, dos quais não se teve acesso ao histórico clínico, 98 eram pacientes do Hospital das Clínicas da Universidade Estadual de Campinas (HC-UNICAMP) e 30 da ABRAE.

3.2 – Método

Inicialmente foi investigada a presença de mutação no gene da conexina 26 (GJB2) através de seqüenciamento, a metodologia utilizada para análise molecular deste gene encontra-se no anexo 8.2. As famílias portadoras de alteração nesse gene foram excluídas do estudo do mtDNA.

Para verificar a presença das mutações mitocondriais A1555G e A7445G foi utilizado o método de RFLP.

3.2.1 - Análise molecular do DNA mitocondrial

A análise molecular do DNA mitocondrial foi realizada a fim de detectar as mutações A1555G e A7445G, localizadas nos genes 12S rRNA e tRNASer(UCN), respectivamente, utilizando as técnicas que abaixo seguem.

3.2.1.1 - Extração do mtDNA

A técnica utilizada na extração do DNA mitocondrial foi a mesma usada para a análise molecular do gene da conexina 26 (descrita no anexo 8.2). Ambas as mutações analisadas são descritas na literatura como homoplasmicas; sendo assim, não houve restrição na escolha do tecido utilizado para extração do mtDNA. A extração foi realizada a partir de 10 a 15ml de sangue periférico.

3.2.1.2 - Amplificação dos fragmentos do DNA mitocondrial

Foram amplificados dois fragmentos de mtDNA, um de 2060 pares de bases (pb) para verificar a presença da mutação A1555G (fragmento 1), e outro de 1821 pb para verificar a presença da mutação A7445G (fragmento 2). Para esta reação de amplificação foram sintetizados dois pares de *primers* (1 e 2, para análise das mutações A1555G e A7445G, respectivamente) de acordo com ANDERSON *et al.*, 1981. As seqüências dos

primers construídos (direito CxF e inverso CxR), a posição de anelamento e o tamanho (em pares de bases) dos fragmentos amplificados por cada par de oligonucleotídeos são mostrados na tabela X.

Tabela X - Posições de anelamento e seqüências dos *primers* utilizados na amplificação dos fragmentos mitocondriais e tamanhos dos fragmentos gerados.

Par	Posição de anelamento	Seqüência dos <i>Primers</i> 5'→ 3'	Tamanho do fragmento (pb)
1	1039	Cx1F- ATATC TGA ACACACAATAG	2060
	3099	Cx1R- CT ATTAGGTCCAGCCAAAG	
2	6900	Cx2F- AAATGATCTGCTGCAGTGCT	1821
	8721	Cx2R- GGTATGTGTTGTGATTCCT	

As amplificações de ambos os fragmentos foram realizadas em 40 ciclos utilizando 200 a 500ng de DNA genômico, 200µM de cada desoxinucleotídeo trifosfato (dATP, dCTP, dGTP e dTTP), 20pmol de cada *primer* (direto e inverso), 2,5U de enzima *Taq* DNA polimerase em tampão de PCR 10x (Tris-HCl 10mM pH 8,8) e 1,5mM de MgCl₂, em volume final de reação de 50µl.

Os ciclos usados na amplificação dos fragmentos estão representados na figura 5.

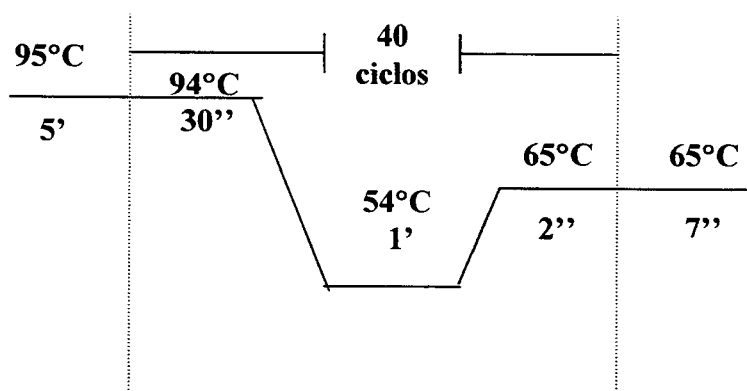


Figura 5 – Ciclos utilizados na amplificação dos fragmentos mitocondriais.

3.2.2.3 - Digestão dos fragmentos de mtDNA com enzimas de restrição

Os fragmentos 1 e 2 foram submetidos a digestão com as enzimas *BsmA* I e *Xba* I, respectivamente. As reações foram realizadas da seguinte maneira:

- Digestão do fragmento 1: 17,5 μ l do produto do PCR do fragmento 1; 0,5 μ l da enzima *BsmA* I e 2 μ l de tampão.
- Digestão do fragmento 2: 17,5 μ l do produto do PCR do fragmento 2; 0,5 μ l da enzima *Xba* I e 2 μ l de tampão.

O fragmento número 1, de 2060 pares de bases, quando digerido com a enzima de restrição *BsmA* I, na ausência da mutação A1555G, gera 3 fragmentos; os tamanhos em pares de bases destes fragmentos são 1100, 516 e 444. Já na presença desta mutação um dos

sítios de restrição é abolido; assim, apenas dois fragmentos são gerados, um de 1616 pb e outro de 444 pb.

No fragmento número 2, de 1821 pares de bases, a presença da mutação A7445G também abole um sítio de restrição, só que para a enzima *Xba* I. Na ausência da mutação A7445G, a digestão do fragmento com a enzima de restrição *Xba* I gera 3 fragmentos, de 435 pb, 540 pb e 846pb. Quando a mutação A7445G está presente, a digestão gera apenas dois fragmentos, um de 435 pb e outro de 1386pb.

Os produtos da digestão foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1,5% em tampão Tris-Borato-EDTA, ou TBE 10x, composto de Tris Base a 0,089M, Ácido Bórico a 0,089M e EDTA a 0,002M e em pH 8,0. O gel foi corado com brometo de etídio (na concentração final de 0,5µg/ml) que foi feito a partir de solução estoque diluída em 100ml de água Milli Q. Os fragmentos digeridos foram visualizados com iluminação ultravioleta.

4 – RESULTADOS

Os resultados da análise molecular do gene da conexina 26 encontram-se no anexo 8.3.

4.1 – Análise molecular do DNA mitocondrial

4.1.1 – A mutação A1555G

Para a detecção da mutação A1555G foi amplificado um fragmento do gene 12S rRNA (fragmento 1) de cada paciente, pela técnica de PCR (figura 6).

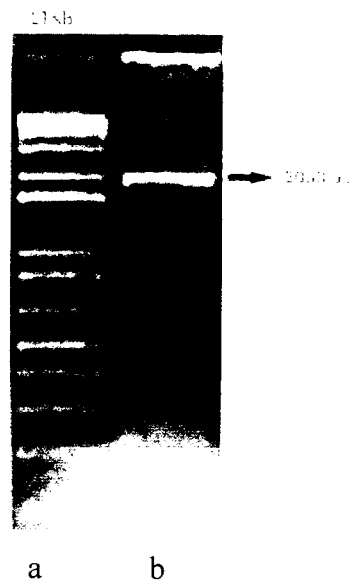


Figura 6 – Fragmento do gene 12S rRNA amplificado pela reação de PCR (fragmento1), em gel de agarose, corado com brometo de etídio. (a) *leder* de 1Kb e (b) fragmento 1 de 2060 pb.

Os fragmentos amplificados foram submetidos à digestão com a enzima de restrição *Bsm*I. Na figura 7 estão ilustrados os resultados da digestão do produto do PCR (fragmento 1) de um paciente não portador da mutação A1555G e o de um portador.

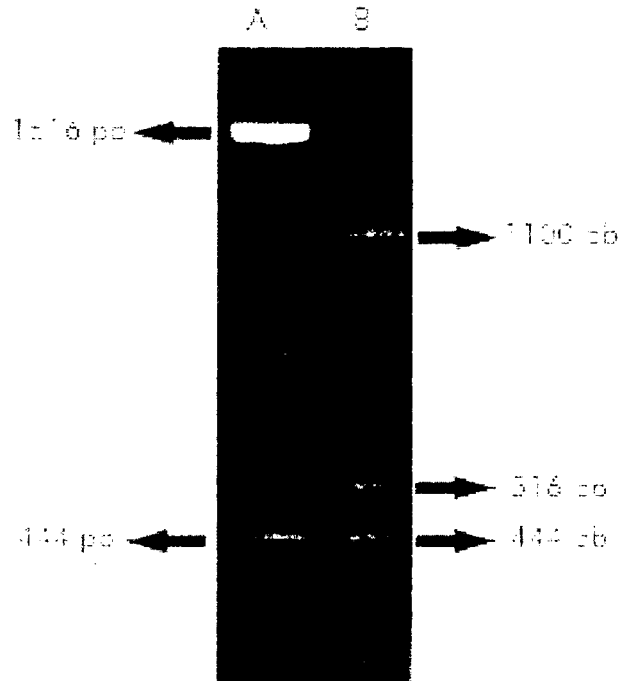


Figura 7 – Resultado da análise da presença da mutação mitocondrial A1555G por meio de digestão do fragmento 1, com a enzima de restrição *Bsm*I, em indivíduo portador da mutação onde a enzima de restrição divide o fragmento 1 em 2 fragmentos (A), e em indivíduo normal onde a enzima de restrição divide o fragmento 1 em 3 fragmentos (B).

Os resultados gerais dos rastreamentos da mutação A1555G nos grupos A, B e C estão apresentados na tabela XI. Como já foi dito anteriormente, o teste para verificação do

defeito molecular A1555G não foi realizado nos pacientes homocigotos para mutação no gene da conexina 26, foram retirados das amostras 19 pacientes.

Tabela XI – Resultado do rastreamento da mutação A1555G nos 206 pacientes estudados.

Grupo	Descrição do grupo	Nº de pacientes estudados	Nº de pacientes portadores da mutação	Frequência da mutação	Frequência da mutação em %
A	-Complicações neonatais -Possível exposição a aminoglicosídeos	16	0	0	0
B	-Pequena probabilidade de exposição a aminoglicosídeos	62	0	0	0
C	-Com antecedentes pessoais não conhecidos	128	1	1/128	0,781
TOTAL		206	1	1/206	0,485

A mutação A1555G foi encontrada em 0,485% da amostra total, ou seja, considerando as três amostras como uma única. Pode-se dizer, portanto, que a frequência do defeito molecular A1555G entre os portadores de deficiência auditiva, neurosensorial, não-sindrômica e ausentes de mutações no gene GJB2 em homozigose, nesta amostra estudada, é de 0,485%, ou aproximadamente 0,5%.

4.2.2 – Mutação A7445G

Para a detecção da mutação A7445G foi amplificado um fragmento do gene tRNASer(UCN) (fragmento 2) pela técnica de PCR (figura 8) de cada paciente.

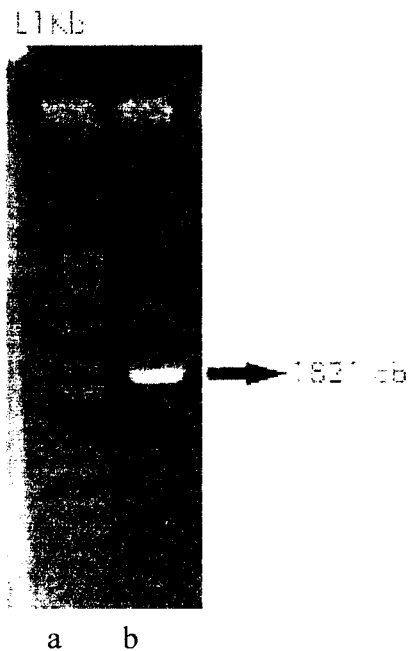


Figura 8 – Fragmento do gene tRNASer(UCN) amplificado pela reação de PCR (fragmento 2), em gel de agarose, corado com brometo de etídio. (a) *leader* de 1Kb e (b) fragmento 2 de 1821 pb.

O fragmento amplificado foi submetido à digestão com a enzima de restrição *Xba*I. A figura 9 ilustra o resultado da digestão do produto do PCR (fragmento 2) de um paciente não portador da mutação A7445G e de um paciente portador do defeito molecular A7445G.

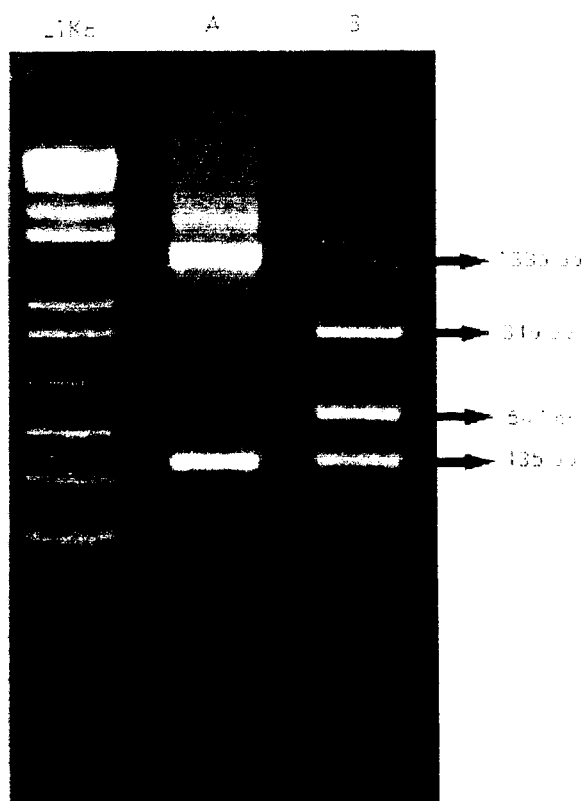


Figura 9 - Resultado da análise da presença da mutação mitocondrial A7445G através da digestão do fragmento 2 com a enzima de restrição *Xba* I em indivíduo normal (a) e em indivíduo portador da mutação A7445G (b).

A mutação mitocondrial A7445G foi rastreada nos mesmos pacientes em que se verificou a presença do defeito molecular A1555G.

Entre os 206 pacientes, foi detectado um portador da mutação A7445G (proveniente do HC-UNICAMP), ou seja, este defeito molecular foi observado em 0,485% da amostra. Sendo assim pode-se dizer que a frequência desta mutação nesta amostra de portadores de deficiência auditiva, neurosensorial, não-sindrômica e sem mutações no gene GJB2 em homozigose, é de 0,485%, ou aproximadamente 0,5%.

5 – DISCUSSÃO

A população brasileira é uma das mais heterogêneas do mundo, resultado de 5 séculos de intercruzamentos entre populações de 3 continentes: colonizadores Europeus, representados em sua maioria pelos portugueses; escravos africanos; e os índios nativos (americanos).

Quando os portugueses chegaram na América, há 500 anos, havia aproximadamente 2,5 milhões de índios vivendo na área onde hoje encontra-se o Brasil (SALZANO & FREIREMAIA 1967; BETHEL 1997). Após a chegada dos portugueses, a missigenação entre homens portugueses e mulheres índias era um evento comum, e após 1755, foi usado até mesmo como estratégia para aumentar a população e, desse modo, ocupar o país colonial (MORNER 1967). A população dos índios americanos decaiu drasticamente devido aos conflitos com os colonizadores europeus e às doenças às quais não estavam adaptados (SALZANO & FREIRE-MAIA 1967, 1970; MONTEIRO 1994; RIBEIRO 1995). Hoje há aproximadamente 326.000 índios no Brasil vivendo em reservas assistidas pelo governo federal.

Os africanos começaram ser introduzidos na população brasileira em meados do século XVI; para o trabalho escravo em fazendas de cana-de-açúcar, na extração do ouro e diamantes e plantações de café. Historicamente foi constatada a vinda de aproximadamente 3,5 milhões de africanos (SALZANO & FREIRE-MAIA 1967; CURTIN 1969; RIBEIRO

1995). Com relação aos europeus, estimou-se que migraram para o Brasil aproximadamente 500 mil portugueses entre 1500 e 1808 (SALZANO & FREIRE-MAIA 1967).

Com os portos abertos para os países amigos, o Brasil recebeu mais imigrantes de várias partes do mundo (Itália, Espanha, Alemanha, entre outros). No século XX, as imigrações asiáticas tiveram forte expressão através dos japoneses, libaneses e sírios.

De acordo com Callegari-Jacques & Salzano (1999), 58% dos imigrantes que vieram para o Brasil entre 1500 e 1973 eram Europeus, 40% eram africanos e 2% asiáticos. E a partir desta estimativa, surgiram questionamentos sobre como estes diferentes grupos étnicos contribuem atualmente para o “pool” gênico, em especial o mitocondrial, de nossa população.

Em estudo recente de haplótipos mitocondriais, foi demonstrado que essencialmente a herança materna brasileira é africana e indígena, ou seja, o DNA mitocondrial da população brasileira é em sua maioria representado por haplótipos africanos e indígenas (ALVES-SILVA J *et al.*, 2000). Estes resultados são compatíveis com os dados históricos, onde há relatos de maior proporção de imigrantes europeus homens em relação a mulheres, além de ter sido comum o relacionamento entre homens europeus e mulheres índias ou negras.

Assim as baixas frequências destas mutações encontrada neste estudo (cerca de 0,5% cada), quando comparadas aos dados da literatura, poderiam ser explicada pela constituição étnica da nossa população. No entanto, como não existem estudos da

prevalência destas mutações em população africana ou indígena Americana, não podemos afirmar que esta seria a explicação para nossos achados.

Outro fato que a ser considerado é o da precariedade do sistema de saúde brasileiro, que limita a obtenção de informações do histórico de saúde dos pacientes. Geralmente, este histórico é obtido dos próprios pacientes ou de suas famílias sem registros que possam ser obtidos de outros prontuários médicos além daqueles obtidos na instituição atual. Em vários casos faltam informações precisas de intercorrências durante a gestação, o parto e período peri-natal, entre outras. Além disso, não há uma padronização com relação à anamnese que garanta uma homogeneidade na investigação clínica.

Sendo assim, trabalhou-se com amostras de pacientes que diferem daquelas utilizadas em trabalhos semelhantes da literatura, como os estudos realizados por Fischel-Ghodsian (1997) e Hu (1991), onde se investigam a relação da mutação A1555G com a ototoxicidade utilizando amostra composta apenas por indivíduos que foram sabidamente expostos a aminoglicosídeos.

Neste trabalho a divisão da amostra em 3 grupos para o estudo da mutação A1555G, foi uma tentativa de trabalhar a relação da mutação com a ototoxicidade, mas devido as dificuldades discutidas anteriormente, conseguiu-se apenas uma pequena amostra de pacientes com exposição possível ou comprovada a medicamentos aminoglicosídeos, assim não sendo possível à realização de uma comparação, estatisticamente viável, entre as amostras.

As reduzidas frequências das mutações mitocondriais encontradas neste estudo, podem também ser um reflexo da inclusão de pacientes com surdez de causa ambiental que não tenha sido diagnosticada durante a avaliação clínica, na amostra.

As frequências das mutações mitocondriais encontradas neste estudo, mesmo sendo de uma mostra da população, ela nos fornecem referência sobre a grandeza destas frequências na população brasileira de portadores de deficiência auditiva neurosensorial não-sindrômica e sem mutações no gene GJB2.

Uma solução para o problema da dificuldade de se conseguir em um único trabalho amostras devidamente estruturadas, afins de uma análise estatística integrada, seria os pesquisadores que trabalham com estas mesmas mutações padronizarem a metodologia possibilitando, com isso, a união de dados de diferentes estudos para produção conjunta de trabalhos onde se consiga determinar estimativas exatas de frequências.

6- CONCLUSÃO

A análise molecular do gene 12S rRNA quanto a presença da mutação A1555G em 206 pacientes portadores de deficiência auditiva neurosensorial, não-sindrômica e sem mutações no gene GJB2, permitiu a identificação de mutação em 0,485% dos casos. O que sugere uma baixa frequência de tal defeito molecular na população de deficientes auditivos brasileiros.

O rastreamento da mutação A7445G no gene mitocondrial tRNA^{Ser(UCN)} em 206 pacientes portadores de deficiência auditiva neurosensorial, não-sindrômica e sem mutações no gene GJB2, também indicou baixa frequência deste defeito molecular entre os surdos brasileiros. A mutação A7445G também foi detectada em 0,485% dos casos estudados.

Sendo assim, este estudo nos forneceu uma referência sobre a grandeza da frequência das mutações A1555G e A7445G na população brasileira portadora de deficiência auditiva neurosensorial, não-sindrômica e sem mutações no gene da conexina 26.

7- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 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. *Am J Hum Genet.* 2003; 72(5): 1315-22.
- ALVES-SILVA J, SANTOS MS, GUIMARÃES PEM, FERREIRA ACS, BANDELT HJ, PENA SDJ, PRADO VF. The ancestry of mtDNA lineages. *Hum Genet* 2000; 67: 444-461.
- ANDERSON S, BANKIER AT, BARREL BG, DE BRUIJN MHL, COUSON AR, DROUIN J, EPERON IC, NIERLICH DP, ROE BA, SANGER F, SCHERIER PH, SMITH AJH, STANDEN R, YOUNG IG. Sequence and organization of the mitochondrial genome. *Natur* 1981; 290: 457-465.
- ANSAR M, DIN MA, ARSHAD M, SOHAIL M, FAIYAZ-UL-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. *Eur J Hum Genet.* 2003; 11(1): 77-80.
- ARNOS KS. Hereditary hearing loss. *N Engl J Med* 1994; 331: 469-470.
- ATTARDI G, SCHATZ G. Biogenesis of mitochondria. *Annu. Rev Cell Biol* 1988; 4: 289-333.
- AVRAHAN K.B. Motors, channels and sounds of silence. *Nature Genet* 1997; 6: 608-609.
- BALDWIN CT, WEISS S, FARRER LA, DE STEFANO AL, ADAIR R, FRANKLYN B, KIDD KK, KOROSTISHEVSKY M, BONNE-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.* 1995; 4(9): 1637-42.
- BALLINGER SW, SHOFFNER JM, HEDAYA EV, TROUNCE I, POLAK MA, KOONTZ DA, WALLACE DC. Maternally transmitted diabetes and deafness associated with a 10.4 Kb mitochondrial deletion. *Nature Genetics* 1992; 1: 11-15.
- BEIGON P. Hereditary deafness. In: Emery, AEH; Rimoin, DL. (eds), *Principles and practice of Medical Genetics* 1983. Edinburgh : Church Livingston, 562-575.
- BERNE R M, LEVY M N, KOEPPEN B M, STANTON B A. Fisiologia. 4 ed. Rio de janeiro: Editora Guanabara Koogan S. A.; 2000.
- BETHELL L. Nota sobre as populações americanas às vésperas das invasões européias. In: Bethell L (ed) América Latina colonial. Editora da Universidade de São Paulo, São Paulo, pp 129-131; 1997.
- BLACK FO, PESZNECKER SC. Vestibular ototoxicity: Clinical considerations. *Otolaryngol Clin North Am* 1993; 26: 713-736.
- BONNE-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. *Am J Hum Genet.* 1996; 58(6): 1254-9.
- 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. *Am J Hum Genet.* 2001; 68(1): 26-37.
- BRAGA MMC, OTTO PA, SPINELLI M. Recurrence risks in cases of nonsyndromic deafness. *Braz J Dymorphol Speech Dis* 1999; 2: 33-40.
- 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.* 1997; 34(12): 1015-7.
- CASANO RAMS, BYKHOVSKAYA Y, JHONSON DF, HAMON M. TORRICELLI F, BIGOZZI M, FISCHER-GHODSIAN N. Hearing loss due to the mitochondrial A155G mutation in Italian families . *Am J Med Genet* 1998; 79:388-391.
- CASTILLO I, VILLAMAR M, MORENO-PELAYO MA, CASTILLO FJ, ÁLVAREZ A, TELERÍA D, MENÉNDEZ I, MORENO F. A deletion involving the connexin 30 gene in nonsyndromic hearing impairment. *N Engl J Med* 2002; 346(4): 243-249.
- CHAIB H, PLACE C, SALEM N, CHARDENOUX S, VINCENT C, WEISSENBAACH J, EL-ZIR E, LOISELET J, PETIT C. A gene responsible for a sensorineural nonsyndromic recessive deafness maps to chromosome 2p22-23. *Hum Mol Genet.* 1996; 5(1): 155-8.
- CHAIB H, PLACE C, SALEM N, DODE C, CHARDENOUX S, WEISSENBAACH J, EL ZIR E, LOISELET J, PETIT C. Mapping of DFNB12, a gene for a non-syndromal

autosomal recessive deafness, to chromosome 10q21-22. *Hum Mol Genet.* 1996; 5(7): 1061-4.

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. *Am J Med Genet.* 1997 5; 71(4): 467-71.

COHN E.S, KELLEY P.M, FOWLER TW, GORGA M.P, LEFKOWITZ D.M, KUEHN H.J, SCHAEFER GB, GOBAR LS, HAHN FJ, HARRIS DJ, KIMBERLING WJ. Clinical studies of families with hearing loss attributable to mutation in the connexin 26 gene (GJB2/DFNB1). *Pediatr* 1999; 103(3): 546-550.

DENOYELLE F, WEIL D, MAW MA, WILCOX SA, LENCH NJ, ALLEN-POWELL DR, OSBORN AH, DAHL H-HM, MIDDLETON A, HOUSEMAN MJ, DODÉ C, MARLIN S, BOULILA-ELGAÏED A, GRATI M, AYADI H, BENARAD S, BITOUN P, LINA-GRANADE G, GODET J, MUSTAPHA M, LOISELET J, EL-ZIR E, AUBOIS A, JOANNARD A, LEVILLIERS J, GARABÉDIAN A-N, MUELLER RF, GARDNER RJM, PETIT C. Prelingual deafness: high prevalence of 30delG mutation in the connexin 26 gene. *Hum Mol Genet* 1997; 6: 2173-2177.

DENOYELLE F, MARLIN S, WEIL D, MOATTI L, CHAUVIN P, ÉRÉA-NOEL G, PETIT C. Clinical features of the prevalent form of childhood deafness, DFN1, due to connexin-26 gene defect: implications for genetic counseling. *Lancet* 1999; 353(17): 1298-1303.

ESTIVILL X, GOVEA N, BARCELO A. Familial progressive of sensorineural deafness is mainly due to the mtDNA A155G mutation and is enhanced by treatment with aminoglycosides. *Am J Hum Genet* 1998; 62:27-35.

- FISCHEL-GHODSIAN N, PRESENT TR, FOURNIER P, STEWART IA, MAW M. Mitochondrial tRNA mutation associated with non-syndromic deafness. *Am J Otolaryngol* 1995; 16:403-408.
- FISCHEL-GHODSIAN N, PREZANT TR, CHALTRAW WE. Mitochondrial gene mutation is a significant predisposing factor in aminoglycoside ototoxicity. *Am J Otolaryngol* 1997a; 18; 173-178.
- FISCHEL-GHODSIAN N, PRESENT TR, CHALTRAW W, WENDT KA, NELSON RA, ARNOS KS, FALK RE. Mitochondrial gene mutation: a common predisposing factor in aminoglycoside ototoxicity. *Am J Otolaryngol* 1997b; 18: 173-178.
- FISCHEL-GHODSIAN N. Mitochondrial mutations and hearing loss. *Cell and Molecular biology of the Ear* 2000; pp136. *Lim Kluwer Academic/Plenum Publisher, New York*.
- 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. *Nat Genet.* 1995; 9(1): 86-91.
- FRIEDMAN RA, BYKHOVSKAYA Y, SUE CM, DIMAURO S, BRADLEY R, FALLIS-CUNNINGHAM R, PARADIES N, PENSAK ML, SMITH RJ, GRODEN J, LI XC, FISCHEL-GHODSIAN N. Maternally inherited nonsyndromic hearing loss. *Am J Med Genet.* 1999; 84(4): 369-72.
- FUKUSHIMA K, RAMESH A, SRISAILAPATHY CR, NI L, CHEN A, O'NEILL M, VAN CAMP G, COUCKE P, SMITH SD, KENYON JB, ET AL. Consanguineous nuclear families used to identify a new locus for recessive non-syndromic hearing loss on 14q. *Hum Mol Genet.* 1995; 4(9): 1643-8.

- FUSE Y, DOI K, HASEGAWA T, SUGIL A, HIBINO H, KUDO T. Three novel connexin 26 gene mutation in autosomal recessive non syndromic deafness. *Neuroport* 1999; 10(9): 1853-1857.
- GASPARINI, P.; RABIONET, R.; BARBUJANI, G.; MELCHIONDA, S.; PETERSEN, M; BRONDUM-NIELSEN, K.; METSPALI, A.; OITMAA, E.; PISANO, M.; FORTINA, P.; ZELANTE, L.; ESTIVILL, X. - High carrier frequency of the 35 delG deafness mutation in European population. *Eur J Hum. Genet* 2000; 8: 19-23.
- 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.* 1998 30; 78(2): 107-13.
- GUILFORD P, BEN ARAB S, BLANCHARD S, LEVILLIERS J, WEISSENBACH J, BELKAHIA A, PETIT C. A non-syndrome form of neurosensory, recessive deafness maps to the pericentromeric region of chromosome 13q. *Nat Genet.* 1994; 6(1): 24-8.
- GOTO Y, NONAKA I, HORAI S. A mutation in the tRNA^{Leu}(UUR) gene associated with the MELAS subgroup of mitochondrial encephalomyopathies [see comments]. *Natur* 1990; 348(6302):651-653
- GUAN M, FISCHER-GHODSIAN N, ATTARDI G. Biochemical evidence for nuclear gene involvement in phenotype of non-syndromic deafness associated with mitochondrial 12S rRNA mutation. *Hum Mole. Gnet* 1997; 5:963-972.
- GUYTON A C. Fisiologia humana. Rio de Janeiro: Editora Guanabara S. A.; 1988.
- GUYTON, AC & HALL JE. Tratado de fisiologia Médica. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan S.A.; 1996

- HAO H, BONILLA E, MANFREDI G, DIMAURO S, MORAES CT. Segregation patterns of a novel mutation in the mitochondrial tRNA glutamic acid gene associated with myopathy and diabetes mellitus. *Am J HumGenet* 1995; 56(5): 1017-1025.
- HIGASHI K. Unique inheritance of streptomycin-induced deafness. *Clin Genet* 1989; 35, 433-436.
- HU DN, QUI WQ, WU BT, FANG LZ, GU YP, ZHANG QH, YAN JH, DING YQ, WONG H. Genetic aspect of antibiotic induced deafness: mitochondrial inheritance. *J Med Genet.* 1991; 29, 79-83.
- HUDSPETH, AJ. How the ear's works work. *Nature* 1989; 341: 397-404.
- HUTCHIN ME, PARKER ID, YOUNG ID, DAVIS A, MUELLER RF. Mitochondrial DNA mutations in the tRNA^{Ser(UCN)} gene causing maternally inherited hearing impairment. Program Nr: 1538 . World wide web: <http://www.faseb.org/genetics/ashg99/fl538.htm>.
- JAIN PK, FUKUSHIMA K, DESHMUKH D, RAMESH A, THOMAS E, LALWANI AK, KUMAR S, PLOPIS B, SKARKA H, SRISAILAPATHY CR. A human recessive neurosensory nonsyndromic hearing impairment locus is potential homologue of murine deafness (dn) locus. *Hum Mol Genet.* 1995; 4(12): 391-4.
- 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.* 1998; 50(2): 290-2.
- JAKSCH M, HOFMANN S, KLEINLE S, LIECHTI-GALLATI S, PONGRATZ DE, MULLER-HOCKER J, JEDELE KB, MEITINGER T, GERBITZ KD. A systematic mutation screen of 10 nuclear and 25 mitochondrial candidate genes in 21 patients with

cytochrome c oxidase (COX) deficiency shows tRNA(Ser)(UCN) mutations in a subgroup with syndromal encephalopathy. *J Med Genet* 1998a; 35(11): 895-900.

JAKSCH M, KLOPSTOCK T, KURLEMANN G, DORNER M, HOFMANN S, KLEINLE S, HEGEMANN S, WEISSERT M, MULLER-HOCKER J, PONGRATZ D, GERBITZ KD. Progressive myoclonus epilepsy and mitochondrial myopathy associated with mutations in the tRNA(Ser(UCN)) gene. *Ann Neurol* 1998b; 44(4):635-640.

KALATZIS V, PETIT C. The fundamental and medical impacts of recent progress in research on hereditary hearing loss. *Hum Mol Genet* 1998; 7(10): 1589-1597.

KAMEOKA K, ISOTANI H, TANAKA K, AZUKARI K, FUJIMURA Y, SHIOTA Y, SASAKI E, MAJIMA M, FURUKAWA K, HAGINOMORI S, KITAOKA H, OHSAWA, N. Novel mitochondrial DNA mutation in tRNA(Lys) (8296A-->G) associated with diabetes. *Biochem Biophys Res Commun* 1998; 245(2): 523-527.

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* 1997; 387(6628): 80-83.

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*. 1997; 387(6628): 80-3.

KOGNISMARK BW, AMIKURA R, OKADA M. Genetic and metabolic deafness. *W.B. Saunder Co* 1976; 364-365.

KRUTOVSKIKH V & YAMASAKI H. Connexin gene mutation in human diseases. *Mutat Resear* 2000; 462:197-207.

- 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. *Nat Genet.* 2002; 30(3): 277-84.
- LERER I, SAGI M, BEN-NERIAH Z, WANG T, LEVI H, ABELIOVICH D. A deletion mutation in GJB6 cooperating with a GJB2 mutation in trans in non-syndromic deafness: a novel founder mutation in Ashkenasi Jews. *Hum. Mutation* 2001; 18: 460-469.
- 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.* 1998; 18(3): 215-7.
- 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. *Nat genet* 1997; 16:188-190.
- MASMOUDI S, TLILI A, MAJAVA M, GHORBEL AM, CHARDENOUX S, LEMAINQUE A, ZINA ZB, MOALA J, MANNIKKO 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. *Eur J Hum Genet.* 2003; 11(2): 185-8.
- MEDLEJ-HASHIM M, MUSTAPHA M, CHOUERY E, WEIL D, PARRONAUD J, SALEM N, DELAGUE V, LOISELET J, LATHROP M, PETIT C, MEGARBANE A. Non-syndromic recessive deafness in Jordan: mapping of a new locus to chromosome 9q34.3 and prevalence of DFNB1 mutations. *Eur J Hum Genet.* 2002; 10(6): 391-4.

- MIGLIOSI V, MODAMIO-HOYBJOR S, MORENO-PELAYO MA, RODRÍGUEZ-BALLESTEROS M, VILLAMAR M, TELLERÍA D, MENÉNDEZ I, MORENO F, DEL CASTILO I. Q829X, a novel mutation in the gene encoding otoferlin (OTOF), is frequently found in Spanish patients with prelingual non-syndromic hearing loss. *J Med Genet* 2002; 39: 502-506.
- MONTEIRO JM. Negros da terra, índios e bandeirantes nas origens de São Paulo. Companhia das Letras, São Paulo; 1994.
- MORAES CT, SCHON EA, DIMAURO S, MIRANDA AF. Heteroplasmy of mitochondrial genomes in clonal cultures from patients with Kearns-Sayre syndrome. *Biochem Biophys Res Commun.* 1989; 160:765-771.
- MORELL RJ, KIM HJ, HOOD LJ, GOFORTH L, FREDERICI K, FISHER R, VAM CAMP G, BERLIN CI, ODDOUX C, OSTRER H, KEATS B, FRIEDMAN TB,. Mutation in the connexin 26 gene (GJB2) among Askenazi Jews with non syndromic recessive deafness. *N Engl J Med* 1998; 339(21): 1500-1505.
- MORNER M. Race mixture in the history of Latin America. Little, Brown, Boston, 1967.
- MOYNIHAN L, HOUSEMAN M, NEWTON V, MUELLER R, LENCH N. DFN20: a novel locus for autosomal recessive, non-syndromal sensorineural hearing loss maps to chromosome 11q25-qter. *Eur J Hum Genet.* 1999; 7(2): 243-6.
- MURGIA A, POLLI R, MARTELLA M, VINANZI C, OPOCHER G, MURIGIA A. Molecular diagnosis of inherited diseases. *Clin Chim Acta* 1999; 28(1-2): 229.
- NAZ S, GIGUERE CM, KOHRMAN DC, MITCHEM KL, RIAZUDDIN S, MORELL RJ, RAMESH A, SRISAILPATHY S, DESHMUKH D, RIAZUDDIN S, GRIFFITH AJ, FRIEDMAN TB, SMITH RJ, WILCOX ER. Mutations in a novel gene, TMIE, are

- associated with hearing loss linked to the DFNB6 locus. *Am J Hum Genet.* 2002; 71(3): 632-6.
- 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. *Eur J Hum Genet.* 1998; 6(3): 245-50.
- 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.* 1998; 6(6): 548-51.
- MUSTAPHA M, CHOUERY E, CHARDENOUX S, NABOULSI M, PARONNAUD J, LEMAINQUE A, MEGARBANE A, LOISELET J, WEIL D, LATHROP M, PETIT C. DFNB31, a recessive form of sensorineural hearing loss, maps to chromosome 9q32-34. *Eur J Hum Genet.* 2002; 10(3): 210-2.
- NEWKIRK JE, TAYLOR RW, HOWELL N, BINDOFF LA, CHINNERY PF, ALBERTI KG, TURNBULL DM, WALKER M. Maternally inherited diabetes and deafness: prevalence in a hospital diabetic population. *Diabet Med* 1997; 14(6):457-460.
- OLIVEIRA CA, MACIEL-GERRA AT, SARTORATO EL. Deafness resulting from mutation in the GJB2 (connexin 26) gene in Brazilian patients. *Clin Genet* 2002; 61: 354-358.
- PALLARE-RUIZ N, BLANCHET P, MONDAIN M, CLAUSTERES M, ROUX AF. A large deletion including most of GJB6 in recessive non syndromic deafness: a digenic effect? *Eur. J. Hum. Genet* 2002; 10: 72-76.
- PARVING A, HAUCH AM. The causes of profound hearing impariments in a school for the deaf a logitudinal study. *J Med Genet* 1994; 36: 125-130.

- PETTY RKH, HARDING AE, MORGAN-HUGHES JA. The clinical features of mitochondrial miopathy. *Brain* 1986; 109: 915-938.
- PREZANT TR, AGAPIAN JV, BOHLMAN MC, BU X, OZATAS S, QUI W-Q, ARNOS KS, CORTOPASSI GA, JABER L, ROTTER JI, SHOHAT M, FISCHER-GODSIAN N. Mitochondrial ribosomal RNA mutation associated with both antibiotic-induced and non syndromic deafness. *Nat Genet* 1993; 4: 289-294.
- 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 non-syndromal sensorineural hearing impairment (DFNB27) on chromosome 2q23-q31. *Eur J Hum Genet* 2000; 8(12): 991-3.
- RABIONET, R.; GASPARINI, P.; ESTIVILL, X. Connexin and deafness Homepage. World wide web URL: <http://www.iro.es/cx26deaf.html> 2000.
- REID FM, VERNHAN GA, JOCOBS HT. A novel mitochondrial point mutation in a maternal pedigree with sensorineural deafness. *Hum Mutation* 1994; 3: 247-247.
- 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. *Nat Genet*. 2000; 26(4): 431-4.
- RIBEIRO D. O povo Brasileiro: a formação e o sentido do Brasil. Companhia de Letras, São Paulo; 1995.
- ROTHROCK CR, MURGIA A, SARTORATO EL, LEONARD E, WEI S, LEBEIS SL, YU LE, ELFENBEIN JL, FISHER RA, FRIDERICI KH. Connexin 26 35delG does not represent a mutational hotspot. *Hum Genet* 2003; 113: 18-23.

- RUSSO ICP. Overview of audiology in Brazil: state of the art. *Audiol* 2000; 39: 202-206.
- SALZ J. Screening for pupil size in prospective refractive surgery patients. *J Cataract Refract Surg*. 1998; 24(3): 292-3.
- SALZANO FM, FREIRE-MAIA. Populações brasileiras, aspectos demográficos, genéticos e antropológicos. Companhia editora nacional, São Paulo; 1967.
- SALZANO FM, FREIRE-MAIA. Problems in human biology: a study of Brazilian populations. Wayne State University Press, Detroit; 1970.
- SARTORATO EL, GOTTARDI E, OLIVEIRA CA. Determination of frequency of 35delG allele in Brazilian neonates. *Clin Genet* 2000; 58(1): 339-340.
- SCHACHT J. Biochemical basis of aminoglycoside ototoxicity. *Otolaryngol Clin North Am* 1993; 26: 845-856.
- SCHUELKE M, BAKKER M, STOLTENBURG G, SPERNER J, VON MOERS A. Epilepsia partialis continua associated with a homoplasmic mitochondrial tRNA(Ser(UCN)) mutation. *Ann Neurol*. 1998; 44(4):700-704.
- SCOTT DA, CARMİ R, ELBEDOUR K, YOSEFSBERG S, STONE EM, SHEFFIELD VC. An autosomal recessive nonsyndromic-hearing-loss locus identified by DNA pooling using two inbred Bedouin kindreds. *Am J Hum Genet*. 1996; 59(2): 385-91.
- SCOTT DA, KRAFT ML, CARMİ R, RAMESH A, ELBEDOUR K, YARI Y, SKIMURARI S, ROSENGREN SS, MARKHAN AF, MUELLER RF, LENCH NJ, VAM CAMP G, SMITH RJH, SHEFFIELD VC. Identification of mutation in connexin 26 gene that cause autosomal recessive nonsyndromic hearing loss. *Hum Mutat* 1998; 11: 387-384.
- 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*. *Nat Genet*. 2001; 27(1): 59-63.
- SEVIOR KB, HATOMOCHI A, STEWART IA. Mitochondrial A7445G mutation in two pedigree with sensorineural deafness. *Am J Med Genet* 1998; 75: 179-185.
- SHOFFNER JM, LOTT MT, LEZZA AM, SEIBEL P, BALLINGER S. W, WALLACE DC. Myoclonic epilepsy and ragged-red fiber disease (MERRF) is associated with a mitochondrial DNA tRNA^{Lys} mutation. *Cell* 1990; 61(6):931-937.
- SILVA EC, DUARTE AR. Surdez genética: uma revisão sucinta. *J Pediatr* 1995; 71: 297-302.
- SIMÕES, A. M & MACIEL-GUERRA, A.T. A surdez evitável: predominância de fatores ambientais na etiologia da surdez neurossensorial profunda. *J Pediatr* 1992; 68: 254-257.
- SOBE T, VREUGDE S, SHAHIN H, BERLIN M, DAVIS N, KANAAN M, YARON Y, ORR-URTREGER A, FRYDMAN M, SHOHAT M, ABRAHAN KB. The prevalence and expression of inherited connexin 26 mutations associated with nonsyndromic hearing loss in the Israeli population. *Hum Genet* 2000; 106: 50-51.
- STEBBINS WC, MCGINN CS, FEITOSA AG. Animal models in the study of ototoxic hearing loss, in LERNER SA, MATZ GL, HAWKINS JE (eds): *Aminoglycoside Ototoxicity* 1981; pp 5-25. Boston, Little Brown and Company.
- STEEL, KP. Genetic deafness: stop closer. *Pediatr* 1999; 103(3): 674.

- SUE CM, TANJI K, HADJIGEORGIOU G, ANDREU A L, NISHINO I, KRISHNA S, BRUNO C, HIRANO M, SHANSKE S, BONILLA E, FISCHER-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. *Neurol* 1999; 52(9):1905-1908.
- TIRANTI V, CHARIOT P, CARELLA F, TOSCANA A, SALIVERE P, GIRLANDA P, CONI F, FRATTA GF, REID FM, MARIOT TI C, ZEVIANI M. Maternaly inherited hearing loss, ataxia and myoclonus associated with a new point mutation in mitochondrial tRNA ser(UCN) .*Hum Mol Genet* 1995, 4:1421-1427 .
- USAMI S, ABE S, KASAI M. Genetic and clinical features of sensorineal hearing loss associated with the1555 mitochondrial mutation. *Luringosc* 1997, 107:483-90.
- USAMI S, ABE S, SHINKAWA H, KIMBERLING W J. Sensorineural hearing loss caused by mitochondrial DNA mutations: special reference to the A1555G mutation. *J Commun Disord* 1998; 31(5):423-434; quiz 434-435.
- USAMI S, ABE S, AKITA J, NAMBA A, SHINKAWA H, ISHII M, IWASAKI S, HOSHINO T, ITO J, DOI K, KUBO T, NAKAGAWA T, KOMIYAMA S, TONO T, KUMUNE S. Prevalence of mitachondrial gene mutations among hearing impaired patients. *J Med Genet* 2000; 37: 38-40.
- VAN CAMP G, SMITH RJH. Hereditary hearing impairment is associated with a mutation in DFNA5. *Nat genet* 1997; 20: 194-197.
- VAN CAMP G, SMITH RJ. Maternally inherited hearing impairment. *Clin Genet.* 2000; 57(6): 409-14.

- VAN DEN OUWELAND JMW, LEMKS HHPJ, RUITENBEEK W, SANDKUIJL LA, DE VIJLDER MF, STRUYVENBERG PAA, VAN DE KAMP JJP, MASSEN JA. Mutation in mitochondrial tRNA^{Leu}(UUR) gene in a large pedigree with maternally transmitted Type II diabetes mellitus and deafness. *Nat Genet* 1992; 1: 368-371.
- VERHOEVEN K, ENSINK RJH, TIRANTI V, HHUYGEN P, JOHNSON DF, SHATTEMAN I, VAN LAER L, VERTREKEN M, VAN DE HEYNIG P, FISCHELGHODSIAN N, ZEVIANE M, CREMERS CWRJ, WILLEMS PJ, VAN CAMP G. Different penetrance of neurological symptom associated with a mutation in the mitochondrial tRNA^{ser}(UCN) gene. *Eur J Hum Genet* 1999.
- VESKE A, OEHLMANN R, YOUNUS F, MOHYUDDIN A, MULLER-MYHSOK B, MEHDI SQ, GAL A. Autosomal recessive non-syndromic deafness locus (DFNB8) maps on chromosome 21q22 in a large consanguineous kindred from Pakistan. *Hum Mol Genet*. 1996; 5(1): 165-8.
- WALLACE DC, BROWN MD, LOTT MT. Mitochondrial DNA variation in human evolution and disease. *Gene*. 1999; 238(1): 211-30.
- WANG A, LIANG Y, FRIDELL RA, PROBST FJ, WILCOX ER, TOUCHMAN JW, MORTON CC, MORELL RJ, NOBEN-TRAUTH K, CAMPER SA, FRIEDMAN TB. Association of unconventional myosin MYO15 mutations with human nonsyndromic deafness DFNB3. *Science*. 1998; 280(5368): 1447-51.
- WEIL D, KUSSEL P, BLANCHARD S, LEVY 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. *Nat Genet*. 1997; 16(2): 191-3.

- WILCOX AS, SAUNDERS K, OSBORN AH, ARNOLD A, WUNDERLICH J, KELLY T, COLLINS V, WILCOLIX LJ, GARDNER RJMC, KAMARINOS M, CONE-WESSON B, WILLIANSON R, DAHL HHM – High frequency hearing loss correlated with mutation in the GJB2 gene. *Hum. Genet* 2000; 106(4): 399-405.
- 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*. 2001; 104(1): 165-72.
- 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. *Nat Genet*. 1999; 21(4): 363-9.
- YASUNAGA S, GRATI M, CHARDENOUX S, SMITH CT, FRIEDMAN TB, LALWANI AK, WILCOX ER, PETTIT C. OTOF encodes multiple long and short isoforms: Genetic evidence that the long ones underlie recessive deafness DFNB 9. *Am J Hum Genet* 2000; 67: 591-600.
- ZELANTE L, GASPARINE P, ESTIVILL X, MELCHIONDA S, D'AGRUMA L, GOVEA N, MILÁ M, DELLA MONICA M, LUTIF J, SHOHAT M, MANSFIELD E, DELGROSSO K, RAPPAPORT E, SURREY S, FORTINA P. Connexin 26 mutation associated with the most common form of non syndromic neurosensory autosomal recessive deafness (DFNB1) in Mediterranean. *Hum mol genet* 1997; 6(9): 1605-1609.

ZEVIANI M. Nucleus-driven mutation of human mitochondrial DNA. *J Inher Metab Dis* 1992; 15: 456-471.

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. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002; 99(9) :6240-5.

8 – ANEXO

8.1 - Consentimento pós-informação

Projeto: Estudo da frequência de mutações mitocondriais em brasileiros portadores de deficiência auditiva neurossensorial não-sindrômica de etiologia não esclarecida

Responsáveis: *Profa. Dra. Edi Lúcia Sartorato*

(Centro de Biologia Molecular e Engenharia Genética - CBMEG - UNICAMP)

Profa. Dra. Andréa Trevas Maciel-Guerra

(Departamento de Genética Médica - FCM - UNICAMP)

Mestranda Mitsue Taukeuti Brianti

(Centro de Biologia Molecular e Engenharia Genética - CBMEG - UNICAMP)

Nome do paciente: _____

Registro hospitalar (HC): _____

Endereço: _____

_____ Cidade: _____ Estado _____

CEP: _____ Fone: (____) _____

Responsável: _____ Idade: _____

RG: _____ Grau de parentesco: _____

Justificativa e objetivos do estudo

Este trabalho investigará a presença das mutações mitocondriais: A1555G, A7445G. A casuística será composta de pacientes que apresentam deficiência auditiva não-sindrômica com histórico de complicações neonatais e possível exposição a medicamentos

aminoglicosídeos (grupo A), com ausência de exposição a esses medicamentos (grupo B) e sem avaliação genético-clínica (grupo C).

O DNA será extraído de amostras de sangue periférico. Inicialmente será investigada a presença de mutação no gene da conexina 26; e as famílias que portarem alteração neste gene serão descartadas deste estudo.

Dois métodos serão utilizados: análise do tamanho de fragmentos gerados por enzimas de restrição e sequenciamento das regiões onde ocorrem as mutações. Estimando, dessa forma, as porcentagens de mutações mitocondriais entre os indivíduos portadores de DA não-sindrômica sem alterações no gene da conexina 26.

Deste modo, será possível não só contribuir para o conhecimento global na área da ototoxicidade, mas também atuar em nível individual na investigação diagnóstica e no aconselhamento genético.

Procedimentos a que serão submetidos os pacientes

As mutações mitocondriais: A1555G, A7445G; serão analisadas a partir de amostras de sangue doadas pelos pacientes (5 ml). A detecção das mutações será realizada através de do método enzimas de restrição (RFLP).

Risco e Desconforto

Para a realização do exame serão necessários cerca de 5ml de sangue venoso, que poderá ser obtido em uma única coleta. Os riscos associados a esse procedimento são mínimos, podendo ocorrer dor e manchas roxas (equimoses) no local da coleta do sangue. O desconforto será mínimo, pois, em geral essa coleta será realizada pela veia do braço, por profissional treinado e devidamente habilitado para realizá-la.

Benefícios esperados

Nos casos em que for detectada alguma mutação mitocondrial relacionada à surdez, serão fornecidas informações ao paciente quanto ao padrão de herança da mutação detectada e seus riscos.

Garantimos aos pacientes e suas famílias resposta a qualquer pergunta e esclarecimento de qualquer dúvida acerca dos assuntos relacionados com esta pesquisa, sendo proporcionadas ainda informações atualizadas durante o estudo.

Será mantido o sigilo e o caráter confidencial das informações, e a identificação dos pacientes não será exposta nas conclusões ou publicações.

Recusa ou descontinuação da participação

Aceito que a participação nesse projeto de pesquisa, do paciente pelo qual sou responsável, é voluntária e que eu posso recusar ou retirar meu consentimento, a qualquer momento (incluindo a retirada da amostra de sangue), sem comprometer os cuidados médicos que o paciente recebe atualmente, ou receberá no futuro.

Caso seja necessário contactar-nos:

Comitê de Ética	(019) 3788-8936
Profª. Dra. Edi Lúcia Sartorato	CBMEG - (019) 3788-1147
Profª. Dra. Andréa T. Maciel Guerra	Depto. de Genética Médica - (019) 3788-8907
Mestranda Mitsue T. Brianti	CBMEG - (019) 3788-1147

Local e data: _____

Ambulatório: _____

Paciente ou responsável: _____

Médico responsável: _____

8.2 – Metodologia da análise molecular do gene GJB2

A análise molecular do gene da conexina 26 foi realizada conforme as técnicas que seguem:

Extração de DNA

A extração de DNA foi realizada a partir de leucócitos obtidos em 10 a 15 ml de sangue periférico coletado em tubos *Vacutainer* contendo EDTA 10%, de acordo com o protocolo adaptado no laboratório de Genética Humana – CMEG.

Ao sangue coletado adicionou-se 35 ml de solução A (Triton-X 100 a 1%; MgCl₂ 5mM; Sacarose 0,32M; Tris-HCl 10mM pH 8,0). Após homogeneização a mistura foi colocada em gelo por 30 minutos para lisar as hemácias. Em seguida, centrifugou-se a 2500 rpm por 15 minutos a 4°C; após, retirou-se o sobrenadante. Ressuspendeu-se o *pellet* (aglomerado de células e restos celulares formado com o processo de centrifugação) novamente em 20 ml de solução A, agitou-se por inversão até o *pellet* se desprender do fundo do tubo, e após centrifugou-se novamente por 15 minutos a 2500 rpm em temperatura ambiente. Terminado o processo de centrifugação, desprezou-se o sobrenadante. Esta etapa realizou-se consecutivamente até o *pellet* estar limpo.

Para continuar o procedimento, ressuspendeu-se o *pellet* em 1 ml de solução B, 2x concentrada (Na₂EDTA 29 mM; NaCl 20 mM; Tris-HCl 20 mM pH 8,0); em seguida, adicionou-se 250 µl de solução C preparada na hora (para 1 ml de solução C: 0,5 ml de solução B, 1 mg de Proteinase K- *Boehringer Mannheim GmbH, Mannheim, Germany* , 0,5ml de SDS 105). Incubou-se em banho-maria a 37 °C por aproximadamente 12 horas.

Após o período de incubação, procedeu-se à purificação do DNA genômico com fenol/clorofórmio. O fenol permite a remoção de peptídeo e proteínas de solução aquosa.

Acrescentou-se às amostras o mesmo volume de fenol saturado com tampão Tris-HCl 10 mM pH 8,0 que o contido em cada uma delas, homogeneizou-se por inversão lenta dos tubos durante 5 minutos, e em seguida centrifugou-se a 2500 rpm por 15 minutos em temperatura ambiente. Terminada a centrifugação, coletou-se o sobrenadante em um novo tubo, e descartou-se o precipitado. Repetiu-se mais uma vez esta etapa de extração com fenol.

À fase aquosa coletada acrescentou-se igual volume de clorofórmio/álcool isoamílico na proporção 24:1. Novamente os tubos foram centrifugados a 2500 rpm por 15 minutos em temperatura ambiente, e separou-se a fase aquosa.

O DNA foi precipitado na fase aquosa adicionando-se 0,1 volume de acetato de sódio 3 M, pH 5,5 e 2 volumes de etanol absoluto gelado. O precipitado de DNA foi obtido após inversão lenta dos tubos. Com o auxílio de um bastão, o DNA foi coletado e em seguida lavado com etanol 70% para retirada do excesso de sal.

O DNA foi ressuspenso em 200 a 500 μ l de TE ix (TE 10x Tris-HCl 10 mM pH 8,0 e EDTA 1 mM pH 8,0), dependendo do volume de material obtido. Os tubos foram mantidos em temperatura ambiente por aproximadamente 12 horas para que o DNA entrasse em solução. A concentração final de DNA foi estimada por leitura de absorção óptica a 260 nm em espectrofotômetro e sua integridade foi verificada através de eletroforese em gel de agarose 0,8% com tampão Tris-Borato -EDTA, ou TBE 1x, (TBE 10x é composto de Tris Base 0,89 M; Ácido Bórico 0,89 M e EDTA 0,002 M em pH 8,0).

o gel foi corado com brometo de etídeo (na concentração final 0,5 µ/ml) e visualizado sob luz ultravioleta.

Amplificação do gene GJB2

O Gene GJB2 compõe-se de apenas um exon codificante (GenBank, número de acesso: M86849), o qual foi amplificado pela reação em cadeia da polimerase (PCR- *polymerase chain reaction*). Para esta reação foram sintetizados iniciadores de acordo com KELSELL *et al* (1997) e DENOYELLE *et al* (1997). Os iniciadores ou *primers* são oligonucleotídeos sintéticos a partir dos quais os desoxinucleotídeos trifosfato (dNTPs) são incorporados, ou seja, onde se inicia a síntese de DNA. As seqüências dos *primers* construídos (direito CxF e inverso CxR), a posição de anelamento e o tamanho (em pares de bases) dos fragmentos amplificados por cada par de oligonucleotídeo são mostrados na tabela XII.

Tabela XII - Posições de anelamento, seqüências e tamanhos dos fragmentos gerados pelos *primers* utilizados na amplificação do gene GJB2.

Par	Posição	<i>Primers 5' → 3'</i>	Tamanho (pb)
1	-32	Cx1F- TCT TTT CCA GAG CAA ACC GC	284
	254	Cx1R- GAC ACG AAG ATC AGC TGC AG	
2	172	Cx2F- CCA GGC TGC AAG AAC GTG TG	520
	692	Cx2R- GGG CAA TGC GTT AAA CTG GC	

A amplificação do gene GJB2 foi realizada em 30 ciclos utilizando 200 a 500 ng de DNA genômico, 200 µM de cada desoxinucleotídeo trifosfato (dATP, dCTP, dGTP e

dTTP), 20pmol de cada *primer* (direto e inverso), 2,5 U de enzima *Taq* DNA polimerase em tampão de PCR 10x (Tris-HCl 10 mM pH 8,8) e 1,5 mM de MgCl₂, em volume final de reação de 50 µl.

Os ciclos usados na amplificação dos fragmentos foram determinados segundo KELSELL *et al* (1997) e DENOYELLE *et al* (1997), não desrespeitando a temperatura (TM) de cada *primer* utilizado (figura 10).

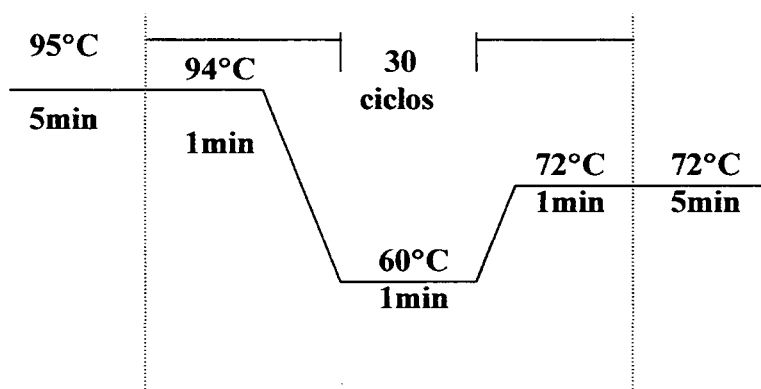


Figura 10 - Ciclos utilizados na amplificação do gene GJB2.

Os produtos da amplificação foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1% em tampão Tris-Borato-EDTA, ou TBE 1x (TBE 10x é composto de Tris Base 0,089M; Ácido Bórico 0,089M e EDTA 0,002M em pH 8,0). O gel foi corado com brometo de etídio (na concentração final de 0,5 g/ml), os fragmentos amplificados foram visualizados sob iluminação ultravioleta e fotografados.

Seqüenciamento

O seqüenciamento foi realizado a fim de detectar mutações no gene GJB2. Para isso foram utilizados os produtos de PCR conseguidos através da etapa descrita anteriormente. O método utilizado foi o de terminação de cadeias (Sanger *et al.*, 1976), através do uso do kit *Thermo sequenase Radiolabeled termination cycle sequencing* (AMERSHAN *Life Science*). Este método se baseia na incorporação de nucleotídeos terminadores da reação em cadeia da polimerase. Estes didesoxinucleotídeos terminadores (ddGTP, ddATP, ddTTP e ddCTP), uma vez incorporados na fita em síntese, interrompem o processo de incorporação de outros nucleotídeos.

Foram utilizados 10 µl do produto da PCR, sendo 5 µl para cada uma das reações (direta e reversa). Cada 5 µl do produto de amplificação foi previamente tratado com 10 U de Exonuclease I (EXO I) e 2 U de Fosfatase Alcalina de Camarão (SAP). Esta solução contendo 5 µl do produto de PCR, 1 µl de EXO I (10 U/µl) e 1 µl de SAP (2 U/µl) foi incubada a 37 °C por 15 minutos e 80°C por 15 minutos (para ativação das enzimas). Neste tratamento são eliminados os DNA em fita simples (*primers*, fragmentos inespecíficos) e os nucleotídeos não incorporados durante a reação de PCR.

- Reação [α^{33} -P] – ddNTPs

A mistura de reação para seqüenciamento foi a seguinte:

- 7 µl da reação de pré-tratamento do produto da PCR
- 1 µl do *primer* (direto ou inverso) ~ 2 pmoles
- 2 µl de *reaction buffer* 10X (260 mM Tris-HCl, pH 9,5; 65 mM MgCl₂)
- 8 µl de H₂O

- 2 µl enzima Thermo Sequenase (4 U/µl)

Foram distribuídos 4,5µl dessa reação para cada um dos 4 tubos já contendo uma mistura de terminação que compõe-se de:

- 2 µl dGTP *termination master mix* (7,5 µM/µl dATP, dCTP, dTTP, dGTP)
- 0,5 µl (0,3 µM/µl) de cada ddNTP marcado com α^{33} -P: ddGTP - 0,3µM [α^{33} -P] ddLTP (1500 Ci/mmol, 450 µCi/ml), 11,25 µCi; ddATP - 0,3 µM [α^{33} -P], ddATP (1500Ci/mmol, 450 µCi/ml), 11,25 µCi; ddTTP - 0,3 µM [α^{33} -P] ddTTP (1500Ci/mmol, 450 µCi/ml), 11,25 µCi; ddCTP - 0,3 µM [α^{33} -P] ddCTP (1500Ci/mmol, 450 µCi/ml), 11,25 µCi.

Uma gota de óleo mineral foi acrescentada a cada tubo para evitar evaporação. A reação de sequenciamento foi feita em 40 ciclos nas condições especificadas na figura 10.

Após a reação foram acrescentados 4 µl de *stop solution* (95% formamida, 20 mM EDTA, 0,05% azul de bromofenol, 0,05% xileno cianol) para interromper o processo.

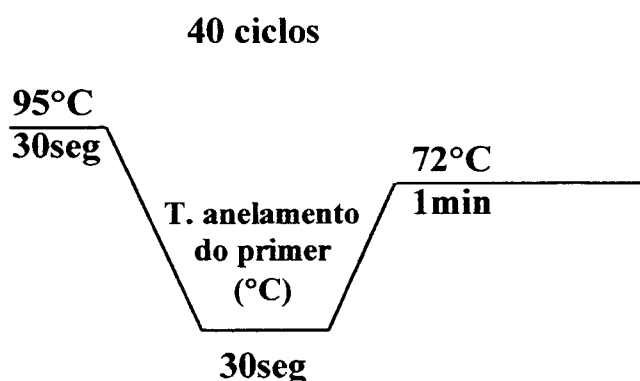


Figura 10 – Ciclos utilizados no sequenciamento do gene GJB2. A temperatura de anelamento é correspondente ao *primer* utilizado.

-Preparo do gel de acrilamida

O gel utilizado foi de poliacrilamida a 6%, composto por 10,5ml de solução estoque

de acrilamida a 40% contendo 3% de bisacrilamida, 7ml de tampão TBE 10X, 29,4g de uréia e água destilada para um volume final de 70ml. Para a polimerização, foram adicionados 500 μ l de persulfato de amônio 10% e 50 μ l de TEMED (Tetrametiletilenodiamino). A solução foi vertida em um aparato montado entre duas placas de vidro (com as dimensões de 42cm x 33,5cm e 39,5cm x 33,5cm) emparelhadas e tendo entre elas espaçadores sem gradiente de espessura. As placas foram previamente lavadas com detergente, acetona e etanol absoluto e somente a placa maior sofreu um tratamento com 3ml de Repel-Silane (substância repelente à base de silicone). Antes da aplicação das amostras no gel de sequenciamento, foi realizada uma pré-corrída em tampão TBE 1X para um aquecimento prévio do gel.

As amostras foram previamente desnaturadas a 95°C por 5 minutos e 2 μ l de cada tubo foram aplicadas no gel de sequenciamento sendo posteriormente submetidos a uma corrida eletroforética nas condições de 2000V, 50W e 50mA. O tempo de corrida foi estipulado de acordo com o tamanho de cada fragmento sequenciado.

Decorrido o tempo necessário da corrida eletroforética, as placas foram desmontadas. Em função do *Repel-Silane* a placa maior separou-se sem dificuldade do gel, o qual permaneceu na placa menor. Um papel filtro 3MM com as mesmas dimensões da placa menor foi colocado sobre o gel, transferindo assim o gel para o papel. Em seguida o papel foi envolto em filme de PVC para embalagem e deixado para secar por 1 hora a 80°C num ambiente a vácuo. Uma vez seco, o papel foi exposto a um filme sensível (Kodak Biomax) durante aproximadamente 12 horas a -70°C (com intensificador).

8.3 Resultado da análise molecular do gene GJB2

Os resultados da análise molecular do gene da conexina 26 encontram-se na tabela XIII.

Tabela XIII – Mutações rastreadas no gene GJB2 dos indivíduos estudados.

Local de origem dos pacientes	Número de pacientes estudados	Pacientes que apresentaram mutação
CEPRE (grupo A e B)	83	5 (35delG/35delG) - homozigoto 5 (35delG/N) - heterozigoto
HC-UNICAMP (grupo C)	102	2 (35delG/35delG) - homozigoto 2 (35delG/N) - heterozigoto
ABRAE (grupo C)	30	2 (35delG/35delG) - homozigoto 1 (35delG/N) - heterozigoto