

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
INSTITUTO DE BIOLOGIA



SUELI MATILDE DA SILVA COSTA

**“ESTUDO MOLECULAR EM INDIVÍDUOS COM SURDEZ
SENSORIONEURAL NÃO-SINDRÔMICA MONOALÉLICOS
PARA MUTAÇÕES NO GENE *GJB2*”**

Este exemplar corresponde à redação final
da tese defendida pelo(a) candidato (a)
SUELI MATILDE DA SILVA COSTA
[Handwritten Signature]
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
Animal e Evolução.

Orientadora: Prof^a Dr^a Edi Lúcia Sartorato

Campinas, 2009

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA – UNICAMP

Si38e

Silva-Costa, Sueli Matilde da
Estudo molecular em indivíduos com surdez
sensorineural não-sindrômica monoalélicos para mutações
no gene *GJB2* / Sueli Matilde da Silva Costa. – Campinas,
SP: [s.n.], 2009.

Orientadora: Edi Lucia Sartorato.
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de
Campinas, Instituto de Biologia.

1. Perda auditiva. 2. Conexina. 3. Mutação
(Biologia). I. Sartorato, Edi Lucia. II. Universidade
Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.

Título em inglês: Molecular study in subjects with sensorineural nonsyndromic deafness and monoallelic mutations in *GJB2* gene.

Palavras-chave em inglês: Hearing loss; Connexins; Mutation (Biology).

Área de concentração: Genética Animal e Evolução.

Titulação: Mestre em Genética e Biologia Molecular.

Banca examinadora: Edi Lucia Sartorato, Mauricio Kurc, Cláudia Vianna Maurer-Morelli.

Data da defesa: 18/02/2009.

Programa de Pós-Graduação: Genética e Biologia Molecular.

Campinas, 18 de fevereiro de 2009

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Edi Lucia Sartorato (Orientadora)



Assinatura

Profa. Dra. Cláudia V Maurer-Morelli



Assinatura

Prof. Dr. Mauricio Kurc



Assinatura

Prof. Dr. Arthur Menino Castilho



Assinatura

Profa Dra. Mônica Barbosa de Melo



Assinatura

Ao meu grande amor Afonso José

À Amanda e Beatriz,

Filhas minhas.....minha vida.

AGRADECIMENTOS

À Profa. Dra. Edi Lucia Sartorato pela oportunidade, confiança e principalmente pelo carinho e amizade que generosamente atribui a todos os seus alunos.

À Profa. Dra Cláudia V Maurer-Morelli pela contribuição na pré-banca e por fazer parte da banca examinadora desta dissertação de mestrado.

Ao Prof. Dr. Mauricio Kurc por ter gentilmente aceitou participar da banca examinadora.

Ao Prof. Dr. José Andrés Yunes pela oportunidade que me deu e por me apresentar à fascinante e complexa Biologia Molecular.

Ao Prof. Dr. Antonio Xavier de Lima Neto e sua esposa Marisa Sena Xavier pela confiança, amizade e exemplo que são.

À todos os amigos do laboratório de genética humana, Paulo (obrigada pela ajuda no computador), Francine, Renan, José Luiz, Mara, Flavia I, Flavia II, Carol, Carol Lincon, Fer II, Bruna, Reginaldo, Emerson, Diego, Nathalia, Gleice, Vanessa II, Ana Leticia, Denise, Débora, Daiane, Milena e as “irmãs gêmeas” Paula e Jéssica pelos papos descontraídos e visitas a padaria Alemã. Tem sido muito bom trabalhar com vocês.

À Fabiana e Fernanda Coeli pela amizade e por estarem sempre dispostas a ajudar quando as dificuldades surgiam. Vocês têm contribuído muito na minha aprendizagem em Biologia Molecular.

À Profa. Dra. Maricilda pelas conversas na hora do almoço recheadas de estímulo.

À minha querida Vanessa De Moraes, companheira do começo e amiga de sempre. Obrigada pela sua confiança, amizade, alegria e jeito verdadeiro de ser. Vamos “caminhar” muito ainda.

Aos amigos Rosiris, Kátia, Walter e Eduardo pelo apoio, amizade e palavras de incentivo.

Aos amigos Carla e Francisco, Luisa e José Pallone, Irene e Ulrich, Ivone e Paulo, obrigada pela torcida, pela amizade e carinho. Carla você embarcou junto comigo nessa viagem, muito obrigada.

Às primas Leda e Lourdes Mara pelas palavras de sabedoria, pela força e paciência nos momentos mais difíceis.

À minha irmã Solange mesmo distante esteve sempre presente.

À Oneyde e Isaias, Oneisa e Luiz Carlos, Silvia e Álvaro Luís, família que eu herdei, bênçãos de Deus.

Aos pacientes sem os quais esse trabalho não poderia ser realizado.

Aos professores do CBMEG e as garotas da secretaria Tânia e Sandra.

Às agências financiadoras CNPq e FAPESP.

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

Aos meus pais Célia e José Raphael

*Exemplos de amor ao próximo.
Pessoas as quais devo tudo,
meus princípios, minha força, minha
coragem.*

“O ser humano vivencia a si mesmo, seus pensamentos, como algo separado do resto do universo - numa espécie de ilusão de ótica de sua consciência. E essa ilusão é uma espécie de prisão que nos restringe a nossos desejos pessoais, conceitos e ao afeto por pessoas mais próximas. Nossa principal tarefa é a de nos livrarmos dessa prisão, ampliando o nosso círculo de compaixão, para que ele abranja todos os seres vivos e toda a natureza em sua beleza. Ninguém conseguirá alcançar completamente esse objetivo, mas lutar pela sua realização já é por si só parte de nossa liberação e o alicerce de nossa segurança interior”.

Albert Einstein

SUMÁRIO

Lista de Figuras	xiii
Lista de Tabelas	xix
Abreviaturas	xxi
Resumo	xxiv
Abstract	xxvi
I. Introdução	29
1. Perda Auditiva	31
1.1. Classificação da perda auditiva	33
1.1.1. Quanto à localização da anomalia	33
1.1.2. Quanto ao grau	34
1.1.3. Quanto aos sinais clínicos	34
2. Genética da perda auditiva	35
2.1. Perda Auditiva Não-sindrômica	35
2.2. As conexinas	36
2.2.1. As conexinas e a reciclagem de potássio na cóclea	39
2.3. Gene <i>GJB2</i>	42
2.3.1. A mutação 35delG	42
2.3.2. Outras mutações no gene <i>GJB2</i>	44
2.3.3. Indivíduos monoalélicos para mutações na conexina 26	46
2.4. Gene <i>GJB6</i>	47

2.5. Gene <i>GJB3</i>	49
3. Diagnóstico molecular da perda auditiva	50
II. Objetivos	53
1. Principal	55
2. Específicos	55
III. Casuística e Métodos	57
1. Casuística	59
2. Métodos	61
2.1. Extração do DNA genômico de sangue periférico	61
2.2. Rastreamento da mutação 35delG no gene <i>GJB2</i>	62
2.3. Rastreamento de outras mutações no gene <i>GJB2</i>	62
2.3.1 Seqüenciamento.....	64
2.4. Rastreamento da mutação <i>IVS1+1G>A</i> no gene <i>GJB2</i>	65
2.5. Rastreamento das deleções <i>del(GJB6-D13S1830)</i> e <i>del(GJB6-D13S1854)</i> no gene <i>GJB6</i>	67
2.6. Rastreamento da deleção <i>Del3</i>	67
2.7. Técnica de MLPA (Multiplex Ligation-dependent probe amplification).....	68
2.7.1. Desnaturação do DNA genômico e hibridização das Sondas	71
2.7.2. Reação de Ligação	72
2.7.3. Reação da PCR Multiplex	72
2.7.4. Separação dos produtos amplificados por eletroforese capilar.....	72
2.7.5. Análise dos dados	73

IV. Resultados	75
1. Gene <i>GJB2</i>	81
1.1. Rastreamento da mutação <i>IVSI + 1G>A</i>	86
2. Gene <i>GJB6</i>	89
3. Gene <i>GJB3</i>	90
MLPA.....	90
V. Discussão	99
VI. Conclusões	109
VII. Referências Bibliográficas	113
ANEXO 1	123

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Representação esquemática da organização molecular da junção comunicante. As junções comunicantes são caracterizadas pelos conexons (hexâmero de uma molécula protéica, a conexina). Cada canal intercelular possui um canal axial (seta) que interconecta diretamente com o citoplasma da célula adjacente. Modificado de Goodenough & Paul, 2003.....	37
Figura 2 – Posicionamento dos conexons nas células mostrando a organização das conexinas. A seta 1 exemplifica um canal homomérico e homotípico. A seta 2 exemplifica um canal heteromérico e heterotípico. A seta 3 exemplifica um canal homomérico e heterotípico. Modificado de Korkiamäki, 2002.....	38
Figura 3 - Componentes da orelha externa, media e interna. Figura modificada do site www.digitallnet.com.br	40
Figura 4 – Transporte e reciclagem de íons K ⁺ na cóclea. As setas pretas indicam o caminho feito pelos íons potássio (K ⁺) a partir de um estímulo sonoro. Figura modificada do site www.susmedicos.com	41
Figura 5 – Esquema da alteração no quadro de leitura da Cx26 na presença da mutação 35delG.....	43
Figura 6 - Mecanismo normal de <i>splice</i> . Indicação do sítio onde ocorre a mutação IVS1+1G>A.....	46
Figura 7 - Apresentação esquemática da posição das deleções no gene <i>GJB6</i> . Del1= del(<i>GJB6</i> -D13S1830), Del2= del(<i>GJB6</i> -D13S1854).....	49
Figura 8 : Fluxograma mostrando a estratégia de estudo utilizada nas amostras de DNA de pacientes com perda auditiva não-sindrômica	60
Figura 9 – Ciclos utilizados na amplificação do gene <i>GJB2</i>	63
Figura 10 – Ciclos utilizados no seqüenciamento do gene <i>GJB2</i>	64

Figura 11 – Ciclos de PCR utilizados na amplificação da região onde se encontra a mutação <i>IVS1+1G>A</i>	66
Figura 12 – Ciclos de PCR utilizados na amplificação da região onde ocorre a mutação Del3 no gene <i>GJB6</i>	68
Figura 13 - Constituição dos oligonucleotídeos das sondas de MLPA	69
Figura 14 - Anelamento dos oligonucleotídeos na seqüência de DNA genômico e posterior união desses oligonucleotídeos pela enzima ligase dependente de temperatura	70
Figura 15 - Resultado da amplificação dos produtos de ligação através de PCR, com a utilização de <i>primers</i> universais.....	70
Figura 16 - Exemplo de separação e quantificação por eletroforese capilar.....	71
Figura 17 - Gel de agarose 1,5% mostrando os padrões de banda Controle, Mutante e Normal para a mutação 35delG em 5 indivíduos. A : Controle Homozigoto mutante. B : Controle Heterozigoto. 1 e 2 : indivíduos com a mutação 35delG em homozigose. 3, 4 e 5 : indivíduos homozigotos normais	81
Figura 18 - Exemplo dos resultados do seqüenciamento automático no gene <i>GJB2</i> , na região da mutação 35delG.....	82
Figura 19 - Eletroferograma mostrando indivíduo heterozigoto para a mutação M34T. Essa mutação provoca a mudança de uma timina por uma citosina no nucleotídeo 101, levando a troca de uma metionina por uma tirosina no códon 34	82
Figura 20 - Eletroferograma mostrando indivíduo heterozigoto para a mutação K168R. Essa mutação provoca a mudança de uma adenina para uma guanina no nucleotídeo 503, levando a troca de uma lisina por um arginina no códon 37	83

Figura 21 - Eletroferograma mostrando Indivíduo heterozigoto para a mutação V27I. A variação da base guanina para a base adenina na posição 29 do gene *GJB2* provoca a substituição do aminoácido valina por isoleucina no códon 2783

Figura 22 - Eletroferograma mostrando Indivíduo heterozigoto para a mutação V37I. Essa mutação provoca a mudança de uma guanina para uma adenina no nucleotídeo 109, levando a troca de uma valina por um isoleucina no códon 3784

Figura 23 - Eletroferograma mostrando Indivíduo heterozigoto para a mutação W24X. Esta mutação causa a troca de uma G para A na posição 71 do gene levando a mudança do aminoácido triptofano para um códon de terminação na posição 24 levando a síntese de uma proteína truncada.....84

Figura 24 - Eletroferograma mostrando Indivíduo heterozigoto para a mutação L90P. Essa mutação provoca a mudança de uma timina para uma citosina no nucleotídeo 269, levando a troca de uma leucina por uma prolina no códon 37.....85

Figura 25 - Eletroferograma mostrando Indivíduo heterozigoto para a mutação V95M. Esta mutação provoca a mudança de uma guanina para uma adenina (nucleotídeo 283) que leva a substituição do aminoácido valina para metionina no códon 9585

Figura 26 - Eletroferograma mostrando Indivíduo heterozigoto para a mutação R184P. Esta mutação causa a troca da citosina para guanina na posição 551 levando a mudança da serina para uma fenilalanina no códon 184.....86

Figura 27 -Eletroferograma mostrando Indivíduo heterozigoto para a mutação R184W. Ocorre a troca de uma citosina por uma timina na posição 550 levando a substituição da arginina por um triptofano no códon 184.....86

Figura 28 - Eletroferograma mostrando Indivíduo heterozigoto para a mutação *IVS1+1G>A*. Esta mutação causa a troca de uma guanina por uma adenina na posição -3170 no sítio de splice do intron 1 do gene *GJB2* levando a uma alteração no mecanismo de *Splice*87

Figura 29 - Pedigree da família 6 e um gel de agarose 1,5% mostrando os padrões obtidos após digestão com a enzima *Hph* I do fragmento amplificado por PCR. I- 1= Mãe I-2= Pai heterozigoto para a mutação *IVS1+IG>A*, II-1 filho afetado também heterozigoto para a mutação *IVS1+IG>A*, Control= amostra sem digestão88

Figura 30 - Resultado da técnica de PCR Multiplex para detecção das deleções $\Delta(GJB6-D13S1830)$ e $\Delta(GJB6-D13S1854)$ em gel de agarose 1,5%. (L) marcador *ladder* 100pb Gibco BRL®; (1) indivíduo normal; (2) $\Delta(GJB6-D13S1830)/N$; (3) $\Delta(GJB6-D13S1830)/\Delta(GJB6-D13S1830)$ (4 e 5) $\Delta(GJB6-13S1854)/N$ 89

Figura 31 - Resultado da pesquisa da deleção 3 por PCR dos indivíduos 1, 2, 3 e 4. L= Ladder; C= controle heterozigoto enviado pela Dra.Friderici (Michigan-EUA) que relatou o encontro da mutação Del 3.....90

Figura 32 - Eletroferograma do indivíduo 42 e de um controle normal. As setas indicam a amplificação das sondas específicas para as mutações 35delG e *IVS1+1G>A* o que determina a presença dessas mutações nesse indivíduo91

Figura 33 - Gráfico mostrando os resultados obtidos pela análise da amostra de um indivíduo controle negativo (C-) para alterações nos genes estudados, assim como, dos indivíduos 24 e 42.....92

Figura 34 - Setas indicam a ausência de amplificação das sondas do gene *GJB6* e das sondas 35delG e *IVS1+1G>A* no gene *GJB2*. Indivíduo controle homozigoto para mutação del(*GJB6-D13S1830*).....93

Figura 35 - As setas indicam a redução da altura dos picos das sondas do gene *GJB6* e amplificação da sonda 35delG no gene *GJB2*. Indivíduo 40 heterozigoto composto del(*GJB6-D13S1830*)/35delG.....94

Figura 36 - Gráfico mostrando os resultados dos indivíduos controles homozigoto para a mutação del(*GJB6-D13S1830*) (C+), indivíduo 40 heterozigoto composto del(*GJB6-D13S1830*)/35delG e de um indivíduo controle negativo (C-) para ambas as mutações94

LISTA DE FIGURAS

- Figura 37** - Eletroferograma do indivíduo 10. Setas indicam a redução da amplificação de sondas no gene *GJB2*.....95
- Figura 38** - Gráfico mostrando os resultados do indivíduo 10 onde observa-se a redução da altura das barras referentes as sondas *GJB2E1* E *GJB2E1B*. C- : controle negativo96
- Figura 39** - Eletroferograma mostrando o resultado do indivíduo 37. Setas indicam o aumento da altura dos picos das sondas no gene *GJB2* e a amplificação da sonda 35delG96
- Figura 40** - Gráfico do indivíduo 37 apresentando um aumento da altura das barras *GJB2E1B* e *GJB2E1C* podendo significar um aumento do número de cópias nesta região97

LISTA DE TABELAS

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Alguns fatores ambientais causadores de perda auditiva.....	33
Tabela 2 - Prevalência de <i>IVS1+1G>A</i> em paciente com perda auditiva.....	45
Tabela 3 – Seqüência de <i>primers</i> para a amplificação do gene <i>GJB2</i>	63
Tabela 4 - Métodos utilizados nesse estudo	73
Tabela 5 – Resumo dos resultados de todas as amostras estudadas. N= Normal, M = Mutante, Del=deleção.....	79

ABREVIATURAS

ABREVIATURAS

AS-PCR	<i>Allele-Specific Polymerase Chain Reaction</i> (PCR alelo específico)
CBMEG	Centro de Biologia Molecular e Engenharia Genética
CEPRE	Centro de Pesquisas e Estudo em Reabilitação Prof. Dr. Gabriel Porto
Control	Controle
dB	Decibel
delG	deleção da base nitrogenada guanina
DFNA	Perda auditiva Genética Não-sindrômica Autossômica Dominante
DFNB	Perda auditiva Genética Não-sindrômica Autossômica Recessiva
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido Desoxirribonucléico
EDTA	Ácido Etileno Diamono Tetracético
EOAE	Emissões Oto Acústicas Evocadas
GJB	<i>Gap Junction</i> Beta (Junção Comunicante na conformação Beta)
HACF	Hospital de Anomalias Craniofaciais de Bauru
IVS	<i>Intervinient Sequence</i>
L	<i>Ladder</i>
M	Mutante
mL	Mililitro
MLPA	<i>Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification</i>
mM	Milimolar

ABREVIATURAS

N	Normal
ng	Nanograma
OMIM	<i>Online Mendelian Inheritance in Man</i>
OMS	Organização Mundial de Saúde
pb	pares de base
PCR	Polymerase Chain Reaction
K⁺	Potássio
RPM	Rotações Por Minuto
SDS	Dodecil Sulfato de Sódio
TANU	Triagem Auditiva Neonatal Universal
Taq	<i>Thermus aquaticus</i> (enzima polimerase)
TBE	Trisborato EDTA
TE	Tris EDTA
T_m	Temperatura de <i>melting</i> (fusão)
U	Unidade
UTIN	Unidades de tratamento intensivo neonatal
µg	micrograma
µL	microlitro
Δ	deleção

RESUMO

Mutações no gene *GJB2* (Cx26) são as causas mais comuns de perda auditiva não-sindrômica autossômica recessiva. Contudo, 10 a 40% dos casos com mutações no gene da Cx26 são detectadas em apenas um dos alelos, causando um problema no diagnóstico molecular. Estes achados podem ser atribuídos à existência de mutações em regiões não codificantes do gene ou mutações em outros genes cujos produtos protéicos estão envolvidos em interações com a Cx26. O principal objetivo deste trabalho foi esclarecer a causa genética da perda auditiva de 45 pacientes com surdez sensorineural não-sindrômica monoalélicos para mutações patogênicas na região codificante do gene *GJB2*. Mutações incluindo deleções e duplicações nos genes *GJB2*, *GJB3* e *GJB6* foram investigadas nesses pacientes. A mutação *IVSI+1G>A* no sítio de *splice* na região não codificante do gene *GJB2*, que pode contribuir para o fenótipo de surdez, foi também investigada em todos os 45 pacientes. A fim de avaliar a frequência da mutação *IVSI+1G>A* em pacientes brasileiros foram analisados 142 pacientes com perda auditiva sensorineural não-sindrômica que não apresentavam nenhuma mutação patogênica na região codificante do gene *GJB2*. Além disso, o método de MLPA (Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification) foi utilizado neste estudo para avaliar sua eficiência em detectar deleções e duplicações em genes envolvidos na perda auditiva. Analisando todos os pacientes, dez diferentes mutações no gene *GJB2* e uma deleção no gene *GJB6* foram encontradas. Esses achados explicaram a perda auditiva de aproximadamente 27% dos pacientes monoalélicos para mutações no gene *GJB2*. A mutação *IVSI+1G>A* foi encontrada em dois pacientes monoalélicos. Essa alteração não foi encontrada nos pacientes sem mutações na região codificante do gene *GJB2*. Essa mutação parece ser rara entre pacientes surdos brasileiros. Na região promotora do gene, em um paciente, uma deleção foi encontrada e no outro uma duplicação foi observada por meio do método de MLPA. Essas possíveis alterações na região não codificante do gene ainda não foram descritas. Outras análises moleculares e estudos funcionais são necessários para confirmar uma possível associação desses achados com a perda auditiva. A técnica de MLPA se mostrou eficiente para detectar deleções e duplicações no genoma. Portanto, demonstramos no presente estudo que essa técnica pode contribuir para explicar a surdez em pacientes monoalélicos.

ABSTRACT

Mutations in the *GJB2* gene (Cx26) are the most common cause of autosomal recessive non-syndromic hearing loss. However, in 10 to 40% of these cases, mutations in Cx26 gene are detected in only one allele which causes a problem in molecular diagnostic. These findings could be attributed to the existence of mutations in non-coding regions of the gene or mutations in other genes of which protein products are involved in interaction with Cx26. The aim of this study was to clarify the genetic cause of the hearing loss of 45 patients with non-syndromic sensorineural deafness, monoallelics for pathogenic mutations in the coding region of the *GJB2* gene. Mutations including deletions and duplications in the *GJB2*, *GJB3* and *GJB6* genes were investigated in these patients. The *IVSI+1G>A* splice site mutation in the non-coding region of the *GJB2* gene which can contribute to the deafness phenotype was also investigated in all 45 patients. In order to evaluate the frequency of the *IVSI+1G>A* mutation were tested 142 Brazilian patients with non-syndromic sensorineural hearing loss without any pathogenic mutation in the *GJB2* coding region. Furthermore, the MLPA method (Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification) was used to evaluate its usefulness in detecting deletions/duplications in genes involved in hearing loss. Ten different mutations in the *GJB2* gene and one deletion in the *GJB6* gene were found. These findings explained the hearing loss about 27% of *GJB2* monoallelic patients. The *IVSI+1G>A* mutation was found in two monoallelics patients. This alteration was not found in patients without mutations in the *GJB2* coding region. This mutation seems to be rare in deaf Brazilian patients. One patient a deletion was found in the promoter region of *GJB2* gene and in another patients a duplication was observed by the MLPA method. These possible alterations were not described in non-coding region of *GJB2* gene yet. Additional molecular and functional studies are needed to assess a possible association of these findings with hearing loss. MLPA proved to be a highly accurate method to detected deletions and duplications in the genome. Therefore, we have shown in the present study that this technique can explain the deafness in monoallelics patients.

INTRODUÇÃO

1. Perda Auditiva

A surdez é a incapacidade de perceber ou interpretar o som, pode variar desde uma perda auditiva leve até profunda. É um dos distúrbios sensoriais humanos mais comuns e pode se manifestar em qualquer faixa etária. Na criança, se a perda ocorre já ao nascimento ou nos primeiros anos de vida, poderá causar distúrbios ou atrasos na aquisição da linguagem, além de problemas no desenvolvimento intelectual, emocional e de aprendizado. No adulto, pode gerar isolamento, levar à depressão, a problemas no trabalho e de relacionamento.

O diagnóstico realizado durante o primeiro ano de vida da criança, possibilita a intervenção médica e fonoaudiológica, permitindo um prognóstico mais favorável em relação ao seu desenvolvimento.

As Academias Americanas de Audiologia, Otorrinolaringologia e Pediatria reunidas no *JOINT COMMITTEE ON INFANT HEARING* (JCIH), baseados nos benefícios do diagnóstico precoce, recomendam a triagem auditiva neonatal universal (TANU) e, elaboraram uma lista de fatores de risco para a deficiência auditiva para bebês (JCIH-2007 <http://pediatrics.aappublications.org/cgi/content/full/120/4/898>), entre eles:

- preocupação dos pais quanto a audição, fala, linguagem ou demora no desenvolvimento;
- histórico familiar de perda auditiva infantil;
- infecções uterinas (citomegalovírus, herpes, rubéola, sífilis e toxoplasmose);
- terapia intensiva neonatal de mais de 5 dias;
- anomalias craniofaciais;
- medicação ototóxica (aminoglicosídeos, associação com diuréticos, agentes quimioterápicos);
- meningite bacteriana;
- síndromes associadas à perda auditiva;

-doenças neurodegenerativas.

A incidência da perda auditiva nas crianças com indicador de risco, e que permanecem em unidades de tratamento intensivo neonatal (UTIN), pode chegar a 4,4% e naquelas que não têm indicador de risco, a 1,1% (Chapchap, 1996).

No Brasil, de modo geral, o diagnóstico das alterações auditivas ocorre muito tardiamente, por volta dos dois ou três anos de idade, o que prejudica o prognóstico. A TANU, como um programa obrigatório a ser aplicado nos berçários até a alta hospitalar do recém-nascido, é realizada apenas em alguns municípios e estados. No município de Campinas, no dia 16 de fevereiro de 2004, foi regulamentada a Lei nº 14.640, que obriga todos os hospitais a realizarem triagem auditiva neonatal.

Atualmente, o teste mais utilizado para realizar a triagem auditiva neonatal é o teste das emissões otoacústicas evocadas (EOAE). É um teste rápido, não invasivo, de fácil aplicação e já pode ser realizado entre 24 e 48 horas após o nascimento. Para facilitar a divulgação entre a população, os profissionais envolvidos o chamam de “teste da orelhinha”, nome semelhante ao já bastante conhecido método de triagem neonatal de doenças metabólicas, o “teste do pezinho”.

Segundo dados da Organização Mundial de Saúde (OMS), 10% da população mundial apresenta algum déficit auditivo. Em países desenvolvidos 1 em cada 1000 crianças nasce com perda auditiva e pode chegar a 4 em cada 1000 em países subdesenvolvidos. No Brasil, calcula-se que mais de 15 milhões de pessoas tenham algum tipo de perda auditiva.

Em regiões onde o sistema de saúde é adequado, 50% dos casos de perda auditiva são causados por fatores genéticos, 25% por fatores ambientais e 25% permanecem com a etiologia não esclarecida.

No Brasil, devido às condições médico sanitárias da população, a perda auditiva causada por fatores ambientais predomina. Simões & Maciel-Guerra (1992) encontraram uma proporção de 67%, dos casos estudados, com etiologia ambiental. A proporção de casos de

etiologia genética foi de 15%, e os casos de etiologia não esclarecida, de 18,5%. Nóbrega e colaboradores (2005), estudaram a etiologia da perda auditiva em 442 indivíduos brasileiros e demonstraram que, a rubéola é ainda uma importante causa de perda auditiva no Brasil. A tabela I mostra alguns fatores ambientais que podem levar à perda auditiva.

Tabela 1 – Alguns fatores ambientais que podem causar perda auditiva

Pré-Natal	Infecção materna (sífilis, herpes, rubéola, citomegalovírus, toxoplasmose)
	Drogas psicotrópicas na gestação
Peri-Natal	Icterícia
	Trauma de parto
	Anóxia
Pós-Natal	Otites
	Meningites
	Traumatismos

1.1. Classificação da perda auditiva

1.1.1 Quanto à localização da anomalia

- Perda auditiva condutiva : quando a anomalia afeta a orelha externa ou média, impedindo que as ondas sonoras sejam conduzidas para a orelha interna. É a menos freqüente e entre as causas mais comuns estão as otites, otosclerose ou aderências (imobilização de um ou mais ossos da orelha média) e tumores na orelha média. Geralmente os problemas de surdez de condução podem ser resolvidos por tratamento médico ou por cirurgia.

- Perda auditiva sensorineural: quando a anomalia afeta a orelha interna (cóclea), o nervo auditivo, ou regiões auditivas do cérebro, é o tipo de perda mais freqüente, chegando a cerca de 90% entre as crianças com déficit permanente da audição (Parving, 1994). Entre as causas mais comuns estão: exposição a ruído de alta intensidade ou sons altos; presbiacusia (surdez pela idade), meningite, viroses (citomegalovírus, rubéola, caxumba), fatores genéticos, defeitos congênitos, tumores e uso de medicamentos ototóxicos. Devido a grande diversidade etiológica da perda auditiva sensorineural, em muitos casos, é difícil estabelecer a causa da perda.
- Perda auditiva mista: quando há uma alteração na condução do som associado à lesão do órgão sensorial ou do nervo auditivo.

1.1.2 Quanto ao grau

Segundo classificação baseada na OMS (2006), considera-se:

- Perda auditiva leve: limiares entre 26 a 40 dB
- Perda auditiva moderada: limiares entre 41 a 60 dB
- Perda auditiva severa: limiares entre 61 a 80 dB
- Perda auditiva profunda: limiares acima de 81 dB

1.1.3 Quanto aos sinais clínicos

- Síndrômica: quando a perda auditiva é acompanhada por outros sinais clínicos como: mal formações craniofaciais e cervicais, displasias esqueléticas (Osteogênese imperfeita), anomalias cutâneas (Síndrome de Waardenburg), anomalias oculares (Síndrome de Usher) entre outros. Último levantamento realizado mostrou 680 síndromes associadas à perda auditiva, com variadas freqüências, tipos e graus (OMIM- *Online Mendelian Inheritance in Man*- julho 2006).

- Não-sindrômica: quando a perda auditiva se apresenta isoladamente, ou seja, sem associação a outras anomalias congênitas. Causas infecciosas são relativamente freqüentes em países em desenvolvimento, porém, a etiologia de origem genética tende a se tornar mais importante à medida que ocorra melhoria nas condições de saúde pública.

Finalmente, a perda auditiva pode ser ainda classificada como pré-lingual, quando ocorre antes da aquisição da fala e pós-lingual quando ocorre depois. Aproximadamente, 30% dos casos de perda auditiva pré-lingual, de origem genética, são síndrômicos e 70% não síndrômicos (Parker *et al.*, 1999).

2. Genética da perda auditiva

O estudo genético da surdez, além de contribuir para determinar sua etiologia, também proporciona um melhor entendimento da fisiologia da audição, à medida que, por meio de mutações, se pode entender melhor as funções das proteínas envolvidas nesse complexo mecanismo.

2.1. Perda auditiva não-sindrômica

As perdas auditivas hereditárias não-sindrômicas podem ser transmitidas por meio dos padrões de herança autossômico recessivo (DFNB) em 85% dos casos, autossômico dominante (DFNA) em 15%, ligado ao cromossomo X (DFN) em 1 a 3% ou mesmo transmitida maternalmente por herança mitocondrial em 1 a 2% (Kalatzis & Petit, 1998).

Convencionou-se denominar as diferentes localizações cromossômicas das formas não-sindrômicas de surdez genética com a sigla DFN proveniente do inglês *deafness*, acrescida das letras A ou B, significando forma de transmissão autossômica dominante (DFNA) e recessiva (DFNB), respectivamente. Quando se denomina DFN isoladamente, trata-se de surdez de

transmissão ligada ao cromossomo X. Após as letras, há um número inteiro, indicando a ordem da descoberta da doença.

A perda auditiva não-sindrômica é, na sua maioria, monogênica. O diagnóstico etiológico nem sempre é fácil de ser estabelecido, em função de sua grande heterogeneidade.

Atualmente, pelo menos 50 genes estão relacionados com perda auditiva não-sindrômica (*Hereditary Hearing Loss Homepage 2008*). Três desses genes, *GJB2 (Gap junction Beta 2)*, *GJB3* e *GJB6* codificam proteínas chamadas conexinas (conexina 26, 30 e 31 respectivamente) e são os principais genes envolvidos na etiologia da surdez, na maioria das populações estudadas.

2.2. As conexinas

Quase todas as células de mamíferos se comunicam diretamente com suas células vizinhas através de junções comunicantes, ou *gap junctions*. Essas junções são compostas por estruturas oligoméricas conhecidas como conexons. Conexons de células adjacentes unem-se formando canais que interligam o citoplasma de uma célula com o citoplasma da outra. Cada conexon é formado por seis moléculas de proteínas transmembrânicas denominadas conexinas, que mediam as trocas diretas de íons, nutrientes e pequenos metabólitos de até 1000 dalton (Figura 1). As comunicações intercelulares, mediadas pelas junções comunicantes, são fundamentais para homeostase dos tecidos, crescimento e diferenciação celulares (Willecke *et al.*, 2002).

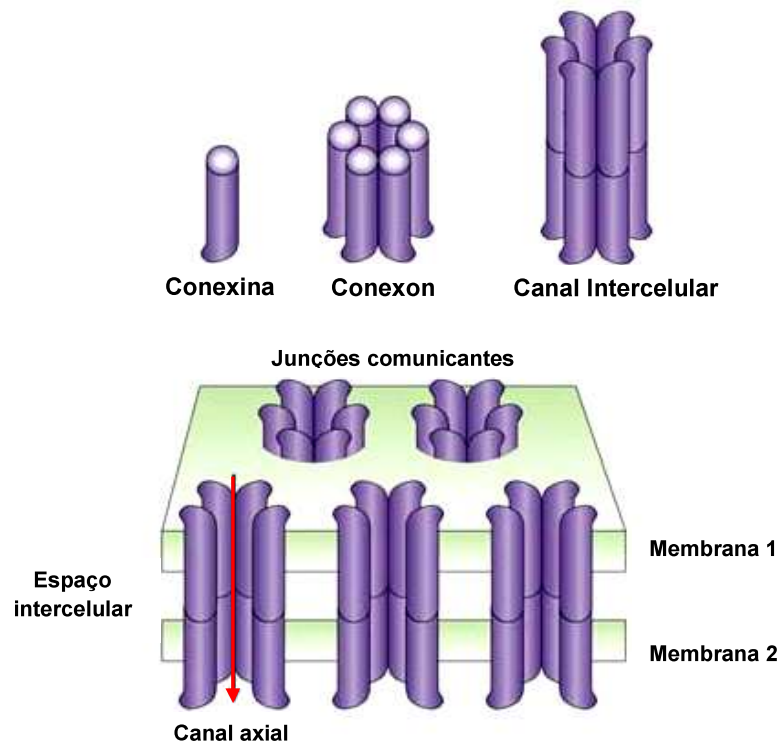


Figura 1 - Representação esquemática da organização molecular da junção comunicante. As junções comunicantes são caracterizadas pelos conexons (hexâmero de uma molécula protéica, a conexina). Cada canal intercelular possui um canal axial (seta) que interconecta diretamente com o citoplasma da célula adjacente. Modificado de Goodenough & Paul, 2003.

Com a evolução dos estudos do genoma humano, pelo menos 21 conexinas já foram identificadas. Algumas apresentam maior expressão em determinadas células ou tecidos do que outras. Na epiderme e em seus anexos, nos epitélios da orelha interna e da córnea e em outros epitélios derivados do ectoderma, encontram-se cerca de dez conexinas diferentes, que são expressas durante o mesmo período de desenvolvimento embrionário e diferenciação epitelial. Contudo, embora duas ou mais conexinas possam ser co-expressas na mesma célula

nem sempre a perda da função de uma conexina alterada é compensada por outro membro da família.

Os conexons podem ser formados por subunidades de conexinas diferentes, formando hemicanais heteroméricos ou por subunidades de uma mesma conexina, formando hemicanais homoméricos (Figura 2), (Di *et al.*, 2001; Forge *et al.*, 2002). Além disto, os canais intercelulares formados podem ser compostos por dois hemicanais similares formados pelo mesmo tipo de conexina (homotípicos) ou por dois hemicanais distintos (heterotípicos).

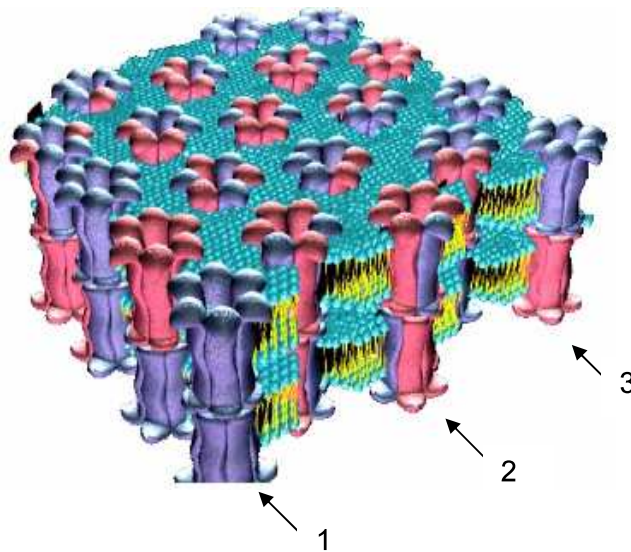


Figura 2 – Posicionamento dos conexons nas células mostrando a organização das conexinas. A seta **1** exemplifica um canal homomérico e homotípico. A seta **2** exemplifica um canal heteromérico e heterotípico. A seta **3** exemplifica um canal homomérico e heterotípico. Modificado de Korkiamäki, 2002.

As conexinas (Cx), em termos evolucionários, podem ser agrupadas em três subfamílias – α , β e γ . Mas, geralmente, a nomenclatura mais comum é baseada no peso molecular da proteína, ou seja, Cx26 (codificada pelo *GJB2*), Cx30 (*GJB6*), Cx31 (*GJB3*) e assim sucessivamente (Krutovskikh & Yamasaki, 2000).

As *gap junctions* são numerosas na cóclea e na porção vestibular, onde a Cx26 é uma das principais conexinas expressas. Mutações em genes de conexinas representam a principal causa de perda auditiva de origem genética. Podem determinar a perda apresentando um padrão de herança autossômico recessivo (*GJB2* e *GJB3*), autossômico dominante (*GJB2*, *GJB3* e *GJB6*) ou mesmo ligado ao cromossomo X (*GJB1*). Além disso, mutações nesses genes são responsáveis tanto por perda auditiva exibindo formas sindrômicas (*GJB2*, queratodermia palmoplantar; *GJB3*, eritrodermia *variabilis*; e *GJB1*, neuropatia periférica), quanto não-sindrômicas (*GJB2*, *GJB3* e *GJB6*) (Rabionet *et al.*, 2000).

2.2.1. As conexinas e a reciclagem de potássio na cóclea

As conexinas são expressas na cóclea, entre as células de suporte das células sensoriais ciliadas, formando um caminho para reciclagem dos íons potássio (K^+) durante a transdução auditiva. O processo auditivo começa quando as ondas sonoras entram no pavilhão externo, percorrem o canal auditivo até o tímpano fazendo-o vibrar juntamente com os três ossículos da orelha média. Esses ossículos fazem com que o som seja amplificado antes de entrar na orelha interna onde está a cóclea (Figura 3).

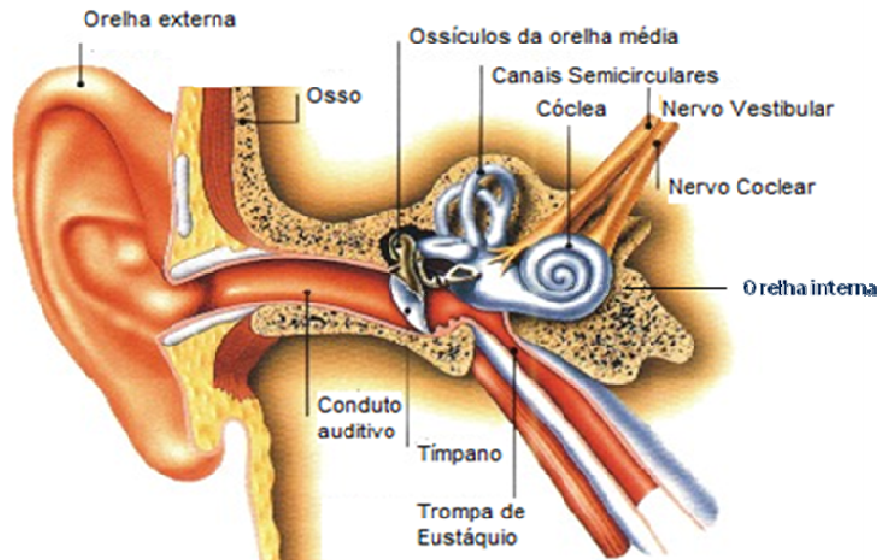


Figura 3 - Componentes da orelha externa, média e interna. Figura modificada do site www.digitallnet.com.br.

A cóclea é o órgão que abriga milhares de células sensoriais ciliadas, responsáveis pela transdução das ondas sonoras em impulsos elétricos. Essas células possuem uma variedade de projeções em suas porções apicais (estereocílios), que contêm filamentos de actina que os enrijecem, de modo que se inclinam como bastões rígidos. Na parte axial dos estereocílios existem canais de K^+ que se abrem quando ocorre deflexão dos mesmos. Os estereocílios tocam a membrana tectórica que está acima deles. Nessa região da cóclea, banhando as células ciliadas, existe um líquido rico em K^+ chamado endolinfa.

Quando vibrações chegam até a cóclea promovem a movimentação das membranas tectóricas e basilar, assim como também dos líquidos que ali se encontram causando a deflexão dos estereocílios seguida da abertura dos canais de K^+ . Os íons K^+ fluem da endolinfa para o interior das células ciliadas, despolarizando as membranas celulares e levando à

transdução mecanoelétrica. Os impulsos elétricos são, então, propagados ao longo do nervo auditivo para o cérebro.

Dessa forma, após o estímulo sonoro, as células ciliadas ficam com alta concentração de potássio intracelular. Para ocorrer nova excitação das células, as mesmas têm que ser repolarizadas, isso ocorre com a passagem do potássio do interior do citoplasma para as células de sustentação da cóclea, através de canais de potássio (Kikuchi *et al.*, 2000).

Os íons potássio se difundem, passivamente, pelas células de sustentação, pelos fibrócitos do ligamento espiral até a estria vascular e pelos fibrócitos do limbo espiral para as células interdentais, chegando à endolinfa por meio das junções comunicantes, conexons (Alberts *et al.*, 1998), reguladas pelos genes codificadores de conexinas (Figura 4).

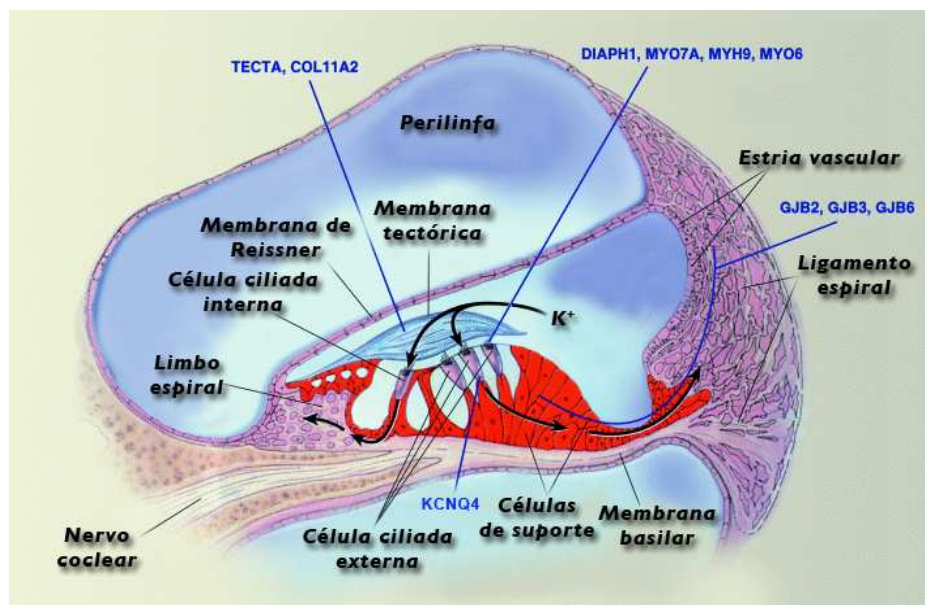


Figura 4 – Transporte e reciclagem de íons K^+ na cóclea. As setas pretas indicam o caminho feito pelos íons potássio (K^+) a partir de um estímulo sonoro. Figura modificada do site www.susmedicos.com.

As mudanças ocorridas no sistema *gap junction* interferem na reciclagem de potássio durante a transdução auditiva, resultando em perda de função das células ciliadas e distúrbio do potencial elétrico endococlear, ou ainda na sobrevivência das células sensoriais do epitélio coclear (Kikuchi *et al.*, 1995).

2.3. Gene *GJB2*

Em 1997 foi isolado e clonado o gene *GJB2* que codifica a proteína conexina 26 (Kelsell *et al.*, 1997), sem dúvida essa descoberta representou um grande avanço no diagnóstico molecular da surdez e mudou as perspectivas do aconselhamento genético das famílias afetadas.

O gene *GJB2* foi o primeiro gene nuclear relacionado com perda auditiva sensorineural não-sindrômica de padrão autossômico recessivo. Está localizado no cromossomo 13q11-q12, no *locus* DFNB1. Possui somente dois exons, um exon 5' não codificante, e um codificante de aproximadamente 682 nucleotídeos (*GenBank*, número de acesso: M86849).

Esse gene está envolvido em 80% dos casos de surdez de herança autossômica recessiva, contudo mutações no gene da conexina 26 também podem determinar perda auditiva com padrão dominante de herança (Denoyelle *et al.*, 1997). Acredita-se que mutações no gene da conexina 26 sejam responsáveis por 20% de todas as perdas auditivas sensorineurais (Wilcox *et al.*, 2000).

2.3.1. A mutação 35delG

A mutação 35delG apresenta padrão de herança autossômico recessivo, é a mais freqüente e, por isso, sua detecção tem alta relevância no rastreamento das causas de deficiência auditiva. Trata-se da simples deleção de uma guanina (G) em uma série de 6 guaninas, que se estendem da posição 30 à posição 35 do gene *GJB2*. Essa deleção leva à

alteração no quadro de leitura de aminoácidos (*frameshift*). Com isso, a glicina é convertida para valina no códon 12 e um códon prematuro de terminação (*stop* códon) é formado no códon 13 (Figura 5). Desse modo, não há a formação correta da proteína e conseqüentemente há um prejuízo na formação dos conexons, gerando o fenótipo da surdez (Cohn & Kelley, 1999).

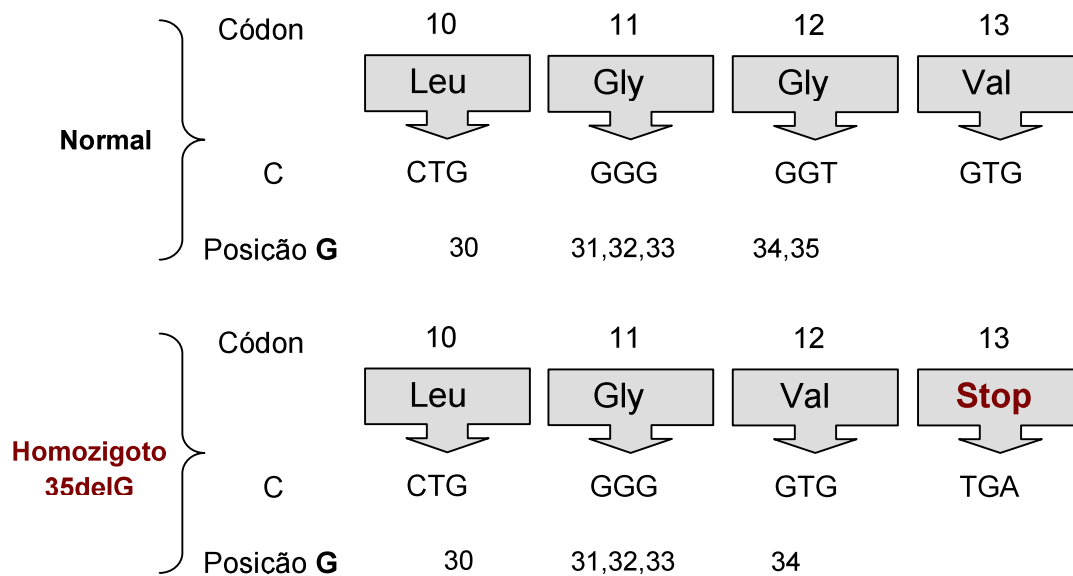


Figura 5 – Esquema da alteração no quadro de leitura da Cx26 na presença da mutação 35delG.

De acordo com Van Laer e colaboradores (2001), a mutação 35delG provavelmente surgiu na população do norte da Europa, há cerca de 500 gerações ou, aproximadamente, há 10.000 anos. Essa mutação existiu na população caucasóide por algum tempo e depois se propagou por todas as outras populações, alcançando níveis altos de portadores, contudo sua incidência difere significativamente entre populações européias.

A incidência da mutação 35delG na população geral caucasóide é de 2 a 4%, esses achados têm gerado um crescente interesse relacionado à triagem da mutação 35delG como causa de surdez congênita.

A mutação 35delG está envolvida em 70% dos casos de perda auditiva com herança autossômica recessiva em caucasóides (Snoeckx *et al.*, 2005).

A pesquisa dessa mutação em 620 recém-nascidos de uma cidade do interior do estado de São Paulo revelou a presença de 6 heterozigotos, o que permitiu estimar uma frequência de aproximadamente 1:100 (Sartorato *et al.*, 2000). Estudos posteriores mostraram que entre 100 brasileiros caucasóides dois eram heterozigotos (2%), entre brasileiros de descendência africana a frequência foi de 1%, em brasileiros de origem asiática, a mutação não foi encontrada (Oliveira *et al.*, 2004). Em 2007, Oliveira e colaboradores rastrearam a mutação 35delG em recém nascidos de 10 cidades brasileiras, de diferentes regiões, encontrando uma frequência média de heterozigotos de 1:74.

Pacientes homozigotos para 35delG geralmente apresentam uma perda auditiva pré-lingual, não progressiva, prevalentemente severa a profunda, contudo o grau de perda pode variar entre os grupos estudados e até mesmo dentro de famílias afetadas (Denoyelle *et al.*, 1999; Santos *et al.*, 2005). Essa variabilidade sugere que outros fatores possam modificar os efeitos da mutação, possivelmente variações em outros genes de conexinas que compensariam a inatividade da conexina 26 na cóclea (Steel, 1999). Essas prováveis modificações dos efeitos da mutação poderiam também explicar o encontro de indivíduos surdos, que são monoalélicos para mutações no gene *GJB2*, com herança comprovadamente autossômica recessiva.

2.3.2. Outras mutações no gene *GJB2*

Mais de 100 mutações diferentes têm sido descritas no gene *GJB2*, e as frequências das mutações variam de acordo com a população estudada (Tang *et al.*, 2006). Em populações não caucasóides outras mutações são predominantes, como o caso da alta frequência da mutação 167delT entre judeus Ashkenazitas, a R143W em africanos e a 235delC em asiáticos (Morel *et al.*, 1998; Martin *et al.*, 1999; Park *et al.*, 2000).

A maioria das mutações recessivas no gene *GJB2* ocorre na região codificante do gene, poucos estudos das regiões não codificantes têm sido relatados. A mutação *IVS1+1G>A* no

íntron, também chamada -3170 G para A, foi inicialmente detectada por Denoyelle e colaboradores (1999) e tem sido encontrada em várias populações onde é investigada (Tabela 2).

Tabela 2 - Prevalência de *IVS1+1G>A* em paciente com perda auditiva

Fonte	País	Ocorrência	Genótipo
Denoyelle <i>et al.</i> , 1999	França	1/140*	35delG/ <i>IVS1+1G>A</i>
Green <i>et al.</i> , 1999	EUA	1/52	Não relatado
Shahin <i>et al.</i> , 2002	Palestina	1/48	35delG/ <i>IVS1+1G>A</i>
Snoeckx <i>et al.</i> , 2005	Egito	1/159	35delG/ <i>IVS1+1G>A</i>
Santos <i>et al.</i> , 2005	Holanda	2/222	35delG/ <i>IVS1+1G>A</i>
Tang <i>et al.</i> , 2006	EUA	3/610	<i>IVS1+1G>A</i> / wt (2) S139N/ <i>IVS1+1G>A</i>
Hismi <i>et al.</i> , 2006	Turquia	2/63	35delG/ <i>IVS1+1G>A</i>
Seeman <i>et al.</i> , 2006	República Tcheca	9/20	35delG/ <i>IVS1+1G>A</i>

* Total de indivíduos analisados.

Essa mutação consiste na troca da guanina do sítio de *splice* doador do íntron 1 para uma adenina (Figura 6). Shahin e colaboradores (2002), estudando o efeito da mutação na transcrição do gene, demonstraram que esta troca causa uma alteração no mecanismo de *splice* levando a um RNA mensageiro não detectável. A mutação *IVS1+1G>A* é encontrada mais freqüentemente em heterozigotos compostos com a mutação 35delG, causando surdez pré-lingual severa-profunda.

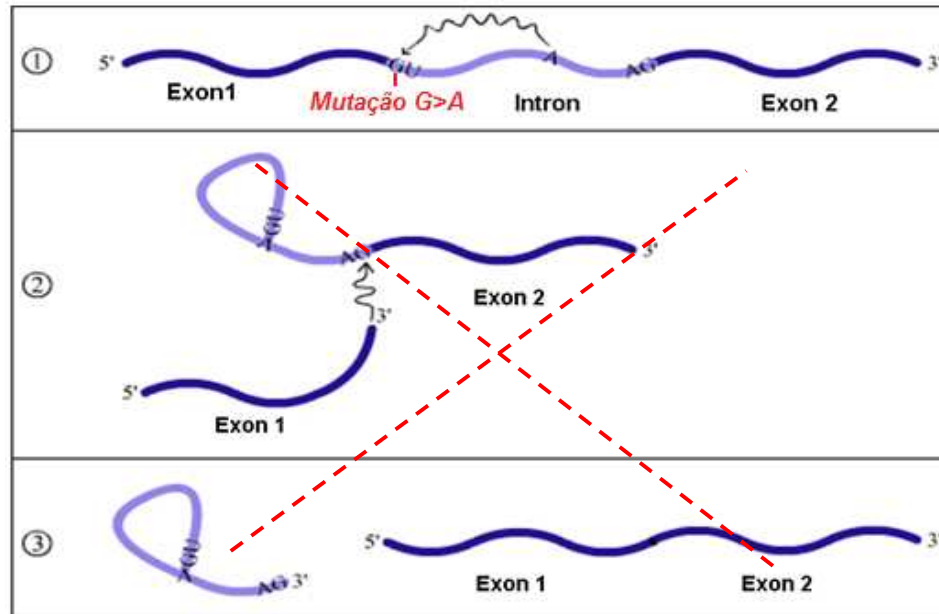


Figura 6 – Indicação do sítio onde ocorre a mutação *IVS1+1G>A*. A mutação impede o mecanismo normal de *splice*.

2.3.3. Indivíduos monoalélicos para mutações na Conexina 26

Uma das maiores dificuldades, com relação ao aconselhamento genético de indivíduos portadores de mutações no gene da conexina 26, deve-se ao fato de que em aproximadamente 10 a 40% dos casos, mutações patogênicas no gene da conexina 26, com padrão de herança autossômico recessivo, são detectadas em apenas um dos alelos, tornando o aconselhamento genético dessas famílias extremamente problemático. Nesses casos, ao estudar o outro alelo do gene *GJB2*, nenhuma mutação é encontrada na região codificante.

Várias hipóteses foram formuladas para explicar a surdez associada à mutação em somente um dos alelos: (1) existência de mutações em regiões não codificantes do gene *GJB2*, afetando sua expressão; (2) mutações em outros genes (incluindo genes da família das

conexinas) interagindo com o alelo normal do gene *GJB2* e, portanto, resultando no fenótipo deficiente; (3) relação casual, e não causal, entre a mutação no gene *GJB2*, que não estaria, portanto, relacionado à surdez nesses casos. Acredita-se que essa última hipótese seja pouco provável, uma vez que já foi observada segregação do suposto alelo normal com a surdez. É possível, também, que haja interação entre genes nucleares e/ou mitocondriais, suprimindo a expressão do alelo normal (Wilcox *et al.*, 2000).

Em 2002, um grupo espanhol (Del Castillo *et al.*, 2002) pôde explicar o fenótipo de surdez de parte desses casos, pois encontraram uma deleção próxima ao gene *GJB2*, envolvendo agora o gene *GJB6*, segregando com a perda auditiva em diversas famílias.

2.4. Gene *GJB6*

O gene *GJB6* codifica a proteína conexina 30 e está localizado no mesmo *locus* do gene *GJB2* (DFNB1), na região cromossômica 13q12.

Del Castillo e colaboradores (2002), estudando 33 indivíduos com surdez pré-lingual não-sindrômica, que apresentavam mutação no gene *GJB2* em somente um dos alelos, encontraram uma deleção de 309kb que se estende da região proximal ao gene *GJB2* até parte do gene contíguo *GJB6*. Esta deleção, denominada del(*GJB6*-D13S1830), não provoca alteração no gene *GJB2*, mas resulta no gene *GJB6* defeitivo.

Posteriormente, uma segunda deleção na mesma região do gene *GJB6* foi encontrada (Del Castillo *et al.*, 2005). Essa deleção, denominada del(*GJB6*-D13S1854) remove uma seqüência de 232kb e explica o fenótipo de surdez em alguns pacientes. As duas deleções são geralmente encontradas em heterozigose composta com mutações no gene *GJB2*, causando perda auditiva severa.

Um estudo multicêntrico (Del Castillo *et al.*, 2005) revelou uma significativa diferença na frequência de cada deleção e também diferentes padrões de distribuição geográfica. A mutação del(*GJB6*-D13S1830) é mais freqüente do que a del(*GJB6*-D13S1854) e é a segunda

mutação mais freqüente na Espanha, tendo sido encontrados inclusive indivíduos homozigotos para a deleção. Apresenta também alta incidência na França, Reino Unido, Israel e Brasil (Del Castillo *et al.*, 2003).

A estrutura genômica do gene *GJB6* é muito mais complexa do que em outras conexinas, apresentando muitos exons 5' não codificantes, que podem sofrer *splice* de diversas maneiras. Desse modo, vários estudos têm sido realizados para esclarecer a interação entre os dois genes, e algumas hipóteses vêm sendo desenvolvidas. Uma delas explica essa interação como um padrão complexo de herança digênica, determinado pela atuação conjunta dos genes, já que os dois tipos de conexina são expressos nas mesmas estruturas da orelha interna (Lautermann *et al.*, 1998). Supõe-se que a perda da Cx26 ou da Cx30 possa levar à redução do número de hemicanais heterotípicos ou alterar a taxa entre conexons homoméricos e heteroméricos, formados pelas Cx26 e Cx30 (Xia *et al.*, 2001; Forge *et al.*, 2002). Esses canais, com isoformas de conexina 26 e 30, apresentaram sinalização intercelular catiônica duas vezes mais rápida que a efetuada por canais homotípicos (Sun *et al.*, 2005).

Outra hipótese seria, a inativação do gene *GJB2* pela deleção de hipotéticos elementos regulatórios desse gene presentes nas regiões deletadas do gene *GJB6* sendo que, trabalhos envolvendo ensaios imunohistoquímicos, análise bioinformática de possíveis elementos regulatórios e avaliações audiológicas corroboram com essa teoria (Common *et al.*, 2005; Snoeckx *et al.*, 2005). Ambas as hipóteses podem, porém, se combinar, e podem também existir interações epistáticas, quando a ação de um gene é modificado por um ou diversos genes que se associam independentemente, ainda não conhecida, entre mutações no gene *GJB2* e outros genes, ou outras mutações não identificadas no *locus* DFNB1 (Del Castillo *et al.*, 2005).

Wilch e colaboradores (2006), estudando uma família americana descendente de alemães, encontraram uma nova deleção segregando com a surdez em pacientes com mutação 35delG. Uma hipótese sugerida, para explicar tal evento seria, a perda de um elemento *cis* regulador não conhecido que controlaria a co-expressão dos dois genes. Tal elemento, segundo a autora, pode estar localizado dentro do intervalo comum deletado pelas mutações del(*GJB6*-

D13S1830) e $\text{del}(GJB6\text{-}D13S1854)$. Essa deleção, que neste trabalho será denominada como Del3, causa a perda de um fragmento de 131 Kb. No Brasil, essa mutação ainda não foi relatada.

A figura 7 abaixo mostra a localização das deleções na região DFNB1.

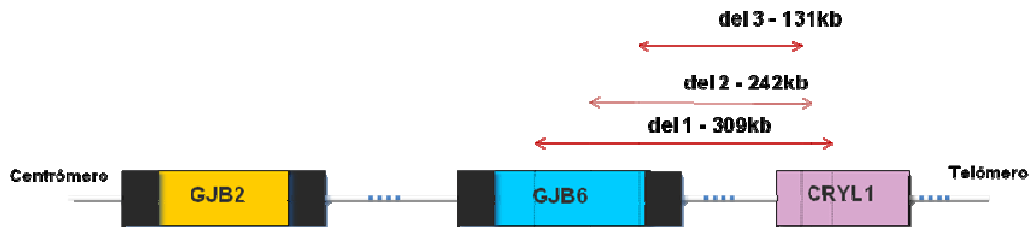


Figura 7 - Apresentação esquemática das posições das deleções no gene *GJB6*. Del1= $\text{del}(GJB6\text{-}D13S1830)$, Del2= $\text{del}(GJB6\text{-}D13S1854)$, Del3.

2.5. Gene *GJB3*

O gene *GJB3*, que codifica a proteína conexina 31 (Cx31), está localizado no cromossomo 1p35.1. Mutações nesse gene podem causar tanto perda auditiva não-sindrômica como sindrômica (surdez associada à doença de pele). Mutações associadas à perda auditiva não-sindrômica apresentam principalmente padrão de herança autossômico dominante. Contudo, foram detectados portadores de mutações no gene *GJB3* em heterozigose com audição normal, em contraste com outros heterozigotos que apresentavam surdez progressiva (Xia *et al.*, 1998; Richard *et al.*, 2000). Liu e colaboradores (2000), estudando indivíduos com surdez autossômica recessiva, encontraram duas mutações no mesmo aminoácido (I141) em heterozigose composta, em duas famílias chinesas. A Isoleucina 141 no terceiro domínio

transmembrânico da proteína parece ser crítico para a formação da parede do canal *gap junction*.

Alexandrino e colaboradores, (2004) encontraram a mutação Y177D em dois indivíduos brasileiros com perda auditiva profunda e sem lesões na pele, entretanto a patogênicidade dessa mutação não pôde ser confirmada. A baixa incidência de mutações no gene *GJB3* (0,97%) sugere que mutações na Cx31 não são uma freqüente causa de perda auditiva no Brasil (Oliveira *et al.*, 2007). Não se sabe ainda sobre mutações na Cx31 que poderiam contribuir para esclarecer a perda auditiva de indivíduos heterozigotos para mutações na Cx26.

Mutações no gene *GJB3* podem, portanto, resultar em diferentes fenótipos, com diferentes formas de surdez transmitidas de modo recessivo ou dominante.

3. Diagnóstico molecular da perda auditiva

O estudo das causas genéticas da perda auditiva avançou significativamente nos últimos 15 anos, e nesse período vários genes foram relacionados a tal manifestação. Contudo, apenas um pequeno número de genes é rotineiramente investigado e, dessa forma, uma grande porcentagem de pessoas com perda auditiva de causa genética permanece com etiologia não esclarecida.

Isso se deve, em parte, ao fato de que ainda não existem técnicas de diagnóstico que permitam um rastreamento completo de todos os genes envolvidos na surdez com baixo custo e resultado rápido.

A técnica de MLPA (Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification), introduzida por MRC-Holland em janeiro de 2002, permite a quantificação relativa de até 45 seqüências de ácidos nucleicos em uma única reação, sendo capaz de detectar, dessa maneira, deleções ou duplicações de diversos genes.

O kit MLPA P163-B1 (MRC-Holland) permite a análise dos principais genes envolvidos na perda auditiva não-sindrômica, além do gene *WFS1* que causa a síndrome de Wolfram que inclui a perda auditiva como um dos sinais clínicos. O kit foi desenhado para detecção de deleções e duplicações de um ou mais exons dos genes *GJB2*, *GJB3*, *GJB6* e as mutações pontuais 35delG e *IVS1+1G>A*, que ocorrem no gene *GJB2*. A análise simultânea desses três genes pode ser uma estratégia eficiente de triagem inicial no diagnóstico molecular da perda auditiva (Gurtler *et al.*, 2008).

Mutações encontradas em heterozigose, seja a 35delG ou outras já descritas, em famílias com padrão de herança autossômico recessivo não justificam o fenótipo de surdez nos indivíduos afetados. Portanto, o estudo desses indivíduos, seja pela procura de outras alterações na região codificante e não codificante do gene *GJB2*, assim como também nos genes *GJB3* e *GJB6* pode esclarecer a etiologia genética da perda auditiva nesses casos. Além disso, esse estudo pôde avaliar a eficiência da técnica de MLPA em rastrear mutações em diferentes genes relacionados à surdez não-sindrômica, para posterior implantação no Laboratório de Genética Humana do Centro de Biologia Molecular e Engenharia Genética-CBMEG.

OBJETIVOS

Principal

Determinar a causa genética da perda auditiva em indivíduos com surdez não-sindrômica apresentando mutação com padrão recessivo de herança em somente um dos alelos do gene *GJB2*.

Específicos

I - Rastreamento de mutações nos genes:

A - *GJB2*

- Rastreamento da mutação 35delG
- Seqüenciamento do exon 2 (região codificante)
- Rastrear e estabelecer a frequência da mutação *IVS1+1G>A* no sítio de *splice* doador do intron 1.

B - *GJB6*

- Rastreamento das deleções *del(GJB6-D13S1830)* e *del(GJB6-D13S1854)*
- Rastreamento da deleção *Del3*

II - Validação da técnica de MLPA utilizando controles normais e alterados (heterozigotos para mutações no gene *GJB2*).

▪ Rastreamento de deleções e duplicações nos genes *GJB2*, *GJB3* e *GJB6* em indivíduos heterozigotos para mutações no gene *GJB2* utilizando a técnica de MLPA.

CASUÍSTICA E MÉTODOS

1. Casuística

De acordo com as normas regulamentadoras de pesquisa em seres humanos, resolução 196/96 do Ministério da Saúde, o projeto referente ao presente estudo foi encaminhado e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Médica-UNICAMP (Parecer 396/2006, Anexo 1).

Indivíduos com perda auditiva provenientes dos ambulatórios de audiologia do Hospital das Clínicas-UNICAMP, Hospital de Anomalias Craniofaciais de Bauru (HACF), Centro de Pesquisas e Estudo em Reabilitação Prof. Dr. Gabriel Porto (CEPRE) e de ambulatórios da região sudeste do Brasil foram avaliados clinicamente a fim de excluir a influência de fatores ambientais na etiologia da perda auditiva assim como também foram submetidos a exames físicos e audiológicos que comprovaram a perda auditiva sensorineural não-sindrômica.

Após essa primeira triagem, as amostras foram enviadas ao laboratório de genética humana do CBMEG, para investigação da causa genética da surdez. Todos foram então inicialmente analisados quanto a presença da mutação 35delG, mutação mais frequentemente encontrada nos casos de surdez sensorineural não-sindrômica com padrão recessivo de herança. As amostras positivas em homozigose foram excluídas do estudo já que a etiologia da perda auditiva foi determinada. As amostras negativas e as que apresentavam a mutação 35delG em heterozigose foram analisadas em busca de outras mutações no gene *GJB2*.

Desta forma, durante o período de janeiro de 2005 a janeiro de 2008 foram selecionados 45 indivíduos que apresentaram a mutação 35delG ou outra mutação recessiva na região codificante do gene *GJB2* (Cx26) em apenas um dos alelos (heterozigotos) e que permaneciam portanto, sem diagnóstico molecular definido. Essas amostras foram então analisadas quanto a presença da mutação intrônica *IVS1+1G>A* bem como quanto a presença das deleções *del(GJB6-D13S1830)* e *del(GJB6-D13S1854)* no gene *GJB6*. Deleções e duplicações nos genes *GJB2*, *GJB3* e *GJB6* foram também investigadas por meio da técnica de MLPA (Figura 8).

Para estimar a incidência da mutação *IVS1+1G>A* foram analisadas 142 amostras de DNA de indivíduos com perda auditiva sensorioneural não-sindrômica. Foram selecionados indivíduos que não apresentavam mutações na região codificante do gene *GJB2* e negativos para as deleções *del(GJB6-D13S1830)* e *del(GJB6-D13S1854)* no gene *GJB6*. A figura 8, a seguir, apresenta um esquema da estratégia de análise usada no estudo.

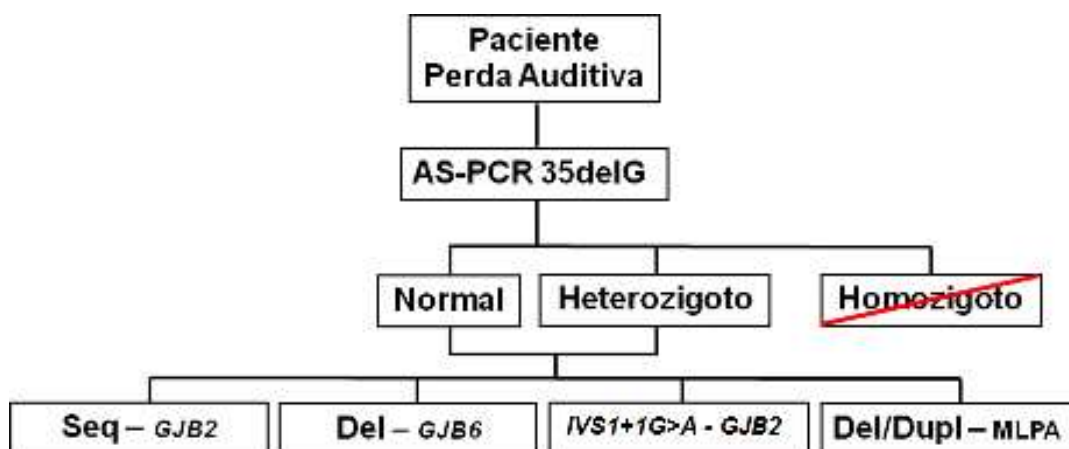


Figura 8 : Fluxograma mostrando a estratégia de estudo utilizada nas amostras de DNA de pacientes com perda auditiva não-sindrômica.

2. Métodos

2.1. Extração do DNA genômico de sangue periférico

A extração do DNA genômico foi feita a partir de leucócitos, obtidos em 10 a 15mL de sangue periférico, coletado em tubos *Vacutainer* contendo EDTA 10%, de acordo com o método fenol-clorofórmio adaptado pelo laboratório de Genética Humana do CBMEG, descrito a seguir:

Adicionou-se ao sangue coletado 35mL da solução A (Triton-X 100 a 1%; $MgCl_2$ 5mM; Sacarose 0,32M; Tris-HCl 10mM pH 8,0) e, após homogeneização, a mistura foi colocada em gelo por 30 minutos para ocorrer lise das hemácias. Em seguida, centrifugou-se a 2500 rpm por 15 minutos a 4°C, retirou-se o sobrenadante e ressuspendeu-se o *pellet* em 20 mL de solução A, centrifugou-se novamente por 15 minutos a 2500 rpm em temperatura ambiente e retirou-se o sobrenadante. Depois ressuspendeu-se o *pellet* em 1mL da solução B 2X concentrada (NaEDTA 20mM; NaCl 20mM; Tris-HCl 20mM pH 8,0), e adicionou-se 250µL de solução C preparada na hora; para 1mL de solução C: 0,5mL de solução B, 1mg de Proteinase K (*Boehringer Mannheim GmbH, Mannheim, Alemanha*) e 0,5mL de SDS 10%. Incubou-se a amostra em banho-maria a 37°C por aproximadamente 18 horas a 56°C durante 2 horas.

Após esse período de incubação, procedeu-se à purificação do DNA genômico com fenol/clorofórmio, que permite a remoção de peptídeos e proteínas de soluções aquosas. Acrescentou-se às amostras a mesma proporção (volume/volume) de fenol saturado com tampão Tris-HCl 10mM pH 8,0, homogeneizou-se por inversão lenta os tubos por 5 minutos e centrifugou-se a 2500 rpm por 15 minutos em temperatura ambiente. Em seguida, coletou-se o sobrenadante em um novo tubo, descartando o precipitado e esta etapa de extração com fenol foi repetida por mais uma vez. À fase aquosa coletada anteriormente acrescentou-se igual volume de clorofórmio/álcool isoamílico na proporção 24:1 e centrifugou-se novamente a 2500 rpm por 15 minutos em temperatura ambiente, para a separação da fase aquosa.

O DNA, presente na fase aquosa, foi precipitado ao se adicionar 0,1 volume de acetato de sódio 3M, pH 5,5 e 2 volumes de etanol absoluto gelado. Após inversão lenta do tubo obteve-se a precipitação do DNA, o qual foi coletado com o auxílio de um bastão e em seguida lavado com etanol 70% para retirar o excesso de sal. Dependendo do volume de DNA precipitado, ressuspendeu-se em um volume de 200 a 500 μ L de TE 1X (TE 10X Tris-HCl 10mM pH 8,0 e EDTA 1mM pH 8,0). Os tubos foram mantidos à temperatura ambiente para que o DNA entrasse em solução.

Em seguida, esse DNA foi submetido à eletroforese em gel de agarose 0,8%, em tampão Tris-Borato-EDTA (TBE) 1X, (TBE 10X é composto de Tris Base a 0,089M, Ácido Bórico a 0,089M e EDTA a 0,002 e em pH 8,0) e corado com brometo de etídio (concentração final 0,5 μ g/mL), a partir de uma solução estoque a 10mg/mL e visualizado sob luz ultravioleta.

2.2. Rastreamento da mutação 35delG no gene *GJB2*

A mutação 35delG foi analisada pela técnica de *AS-PCR* (*allele-specific polymerase chain reaction*), desenvolvida pelo Laboratório de Genética Molecular Humana – CBMEG, patenteada (patente nº P10005340-6; Método de teste para surdez de origem genética – UNICAMP, 2002).

2.3. Rastreamento de outras mutações no gene *GJB2* por seqüenciamento automático

O gene *GJB2* foi amplificado pela técnica de PCR, usando seqüências de *primers* descritos na tabela 3. O exon codificante desse gene (682pb) foi dividido em duas partes (332pb e 547pb), a fim de não se perder nenhuma região do gene.

PAR	PRIMERS 5' → 3'	TAMANHO (pb)
1	Cx261F – CTC CCT GTT CTG TCC TAG C	332
	Cx261R – GAC ACG AAG ATC AGC TGC	
2	Cx262F – GCT ACG ATC ACT ACT TCC C	547
	Cx262R – GGT TGC CTC ATC CCT C	

Tabela 3 – Sequência de *primers* para a amplificação do gene *GJB2*.

A reação de PCR consistiu de 200 a 500ng de DNA genômico, 200 μ M de cada desoxinucleotídeo trifosfato (dATP, dCTP, dGTP, dTTP), 200mol de cada *primer* (direto e reverso), 2,5U de enzima *Taq* DNA polimerase em tampão de PCR 10X (Tris-HCl 10mM pH 8,8) e 1,5mM de MgCl₂, em um volume final de reação de 50 μ L.

Na amplificação dos fragmentos foram utilizados 30 ciclos segundo Kelsell *et al.* (1997) e Denoyelle *et al.* (1997) e de acordo com a *Tm* de cada *primer* utilizado como mostra a figura 9.

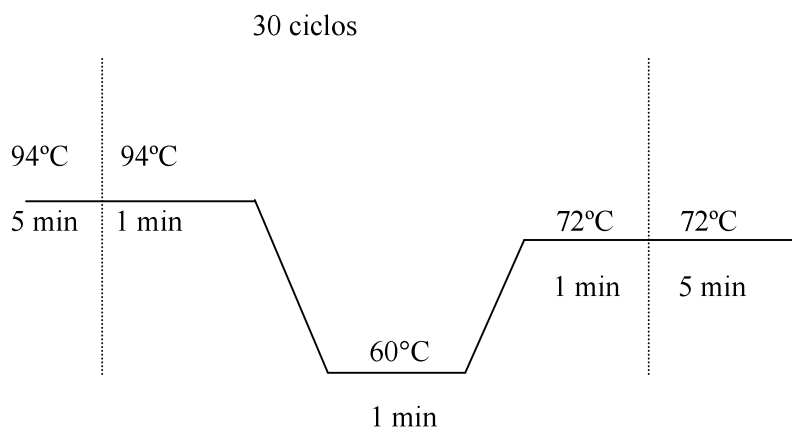


Figura 9 – Ciclos utilizados na amplificação do gene *GJB2*.

Os produtos de amplificação foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1,5% em tampão, TBE 1X (Tris-Borato-EDTA). O gel foi posteriormente corado com brometo de etídeo e os fragmentos amplificados foram visualizados sob iluminação ultravioleta e fotografados. Para detecção das mutações foi realizada a reação de seqüenciamento diretamente do produto de PCR.

2.3.1 Seqüenciamento

As reações de seqüenciamento foram realizadas no seqüenciador automático ABI PRISM® 3700 DNA Analyzer, utilizando o *BigDye™ Terminator Cycle Sequencing Kit V3.0 Ready Reaction* (ABI PRISM/PE Biosystems) e, constituíram-se de:

40-80ng de DNA

2µL do *mix BigDye*

1µL do *primer* direto ou reverso (5pmol/µL)

H2O deionizada para completar 10µL

O ciclo utilizado foi o apresentado na figura 10 abaixo.

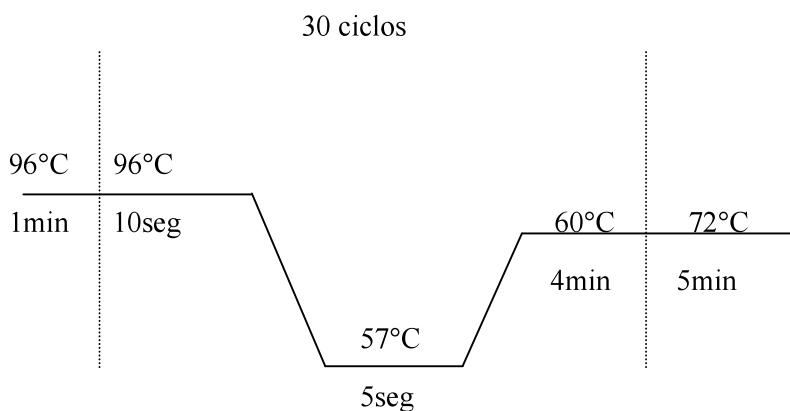


Figura 10 – Ciclos utilizados no seqüenciamento do gene *GJB2*.

As amostras foram purificadas e liofilizadas de acordo com as seguintes etapas:

- adicionou-se 80µL de etanol 80%;
- centrifugou-se por 45 minutos a 3.700 rpm;
- descartou-se o etanol em papel absorvente;
- adicionou-se 150µL de etanol 70%;
- centrifugou-se por 10 minutos a 3.700 rpm;
- descartou-se o etanol da mesma forma;
- *spin* com a placa invertida

Antes da colocação da placa no seqüenciador, as seguintes etapas foram seguidas:

- adicionou-se 10µL de formamida;
- a placa foi vortexada e em seguida centrifugada rapidamente;
- desnaturou-se a amostra (5 minutos a 95°C)
- em seguida a amostra foi colocada por 10 minutos no gelo;
- colocou-se a placa no seqüenciador

As seqüências obtidas foram analisadas e comparadas com a seqüência normal com o auxílio dos *softwares Chromas Lite 2.01 e Generunner*.

2.4. Rastreamento da mutação IVS1+1G>A no gene GJB2

A mutação foi rastreada inicialmente por meio da técnica de PCR utilizando *primers* previamente descritos por Denoyelle e colaboradores (1999).

A região onde ocorre a mutação IVS1+1G>A no gene *GJB2* foi amplificada da seguinte forma: 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 (Invitrogen, Brasil) em tampão de PCR 10X (Tris-HCL 10mM pH 8,8), 1,5mM de MgCl₂, 2,5µL de DMSO em um volume final de reação de 50µL. O ciclo utilizado foi o apresentado na figura 11 abaixo.

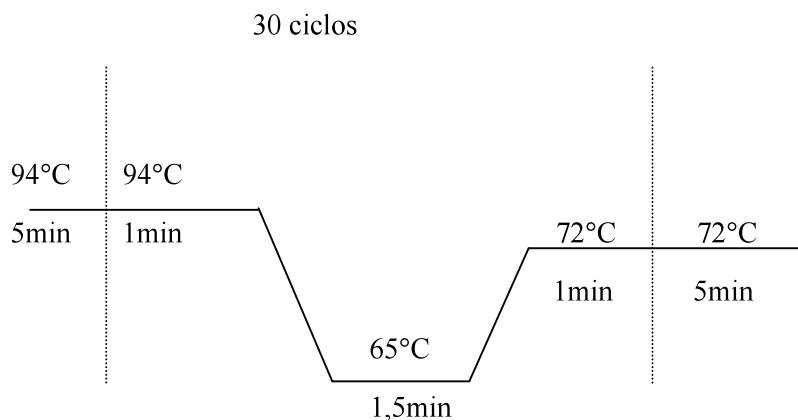


Figura 11 – Ciclos de PCR utilizados na amplificação da região onde se encontra a mutação *IVS1+1G>A*.

O produto amplificado foi submetido a eletroforese em gel de agarose 1,5% em tampão TBE 1x, corado com brometo de etídeo (na concentração final 0,5µg/mL) e visualizado sob luz ultravioleta. A seguir o fragmento foi digerido com a enzima de restrição *Hph* I, a 37°C por 3 horas, da seguinte forma: 17,5µL de produto de PCR; 2,0µL de tampão da enzima; 0,5µL da enzima *Hph* I (5000U/µL). Os fragmentos foram submetidos a eletroforese em gel de agarose 1,5% , corados e visualizados sob luz ultravioleta.

Após a digestão, na ausência da mutação, 2 fragmentos são obtidos: um de 117pb e outro de 244pb. A mutação leva a uma perda do sítio de restrição, portanto quando está presente, apenas um fragmento de 361 pb é observado. Nos indivíduos nos quais a mutação foi detectada os pais foram também analisados. Para confirmar a presença da mutação, os fragmentos de PCR dos pacientes portadores da mutação *IVS1+1G>A* foram seqüenciados utilizando os mesmos *primers* usados no PCR.

2.5. Rastreamento das deleções del(*GJB6*-D13S1830) e del(*GJB6*- D13S1854) no gene *GJB6*

A estratégia de análise destas deleções foi previamente descrita por del Castillo e colaboradores (2005), que desenvolveu um único teste diagnóstico envolvendo as duas deleções em um mesmo PCR.

Utilizou-se um conjunto de três pares de *primers* para amplificar os segmentos que contêm a junção do ponto de quebra de cada uma das deleções del(*GJB6*-D13S1830) e del(*GJB6*-D13S1854), assim como um par de *primers* para amplificar um segmento controle dentro do éxon 1 para checar a eficiência da PCR e distinguir os alelos heterozigoto e homozigoto para qualquer das duas deleções. Após amplificação dois fragmentos de diferentes tamanhos podem ser obtidos: 333pb referente controle; 460pb ou 564pb relacionados as deleções del(*GJB6*-D13S1830) e del(*GJB6*-D13S1854), respectivamente.

O produto amplificado foi testado em gel de agarose 1,5% em tampão TBE 1x, corado com brometo de etídeo (na concentração final 0,5µg/mL) e visualizado sob luz ultravioleta.

2.6. Rastreamento da deleção Del3

O rastreamento da deleção 3 foi realizada por meio da técnica de PCR, utilizando *primers* descritos por Wilch e colaboradores (2006). *Primers* direto e inverso próximos à região de quebra amplificam um fragmento de 628pb, e *primers* internos amplificam um fragmento de 836pb na ausência da mutação. A reação foi realizada da seguinte forma: 200 a 500ng de DNA genômico, 20pmol de cada *primer* Del F, Del R, Int.F e Int.R; 1,5mM de MgCl₂, 200µM de cada desoxinucleotídeo trifosfato (dATP, dCTP, dGTP e dTTP) e 2,5U de enzima *Taq* DNA polimerase (Invitrogen, Brasil) em tampão de PCR 10X (Tris-HCL 10mM pH 8,8) em um volume final de 20 µL. Foi utilizado o ciclo representado na figura 12.

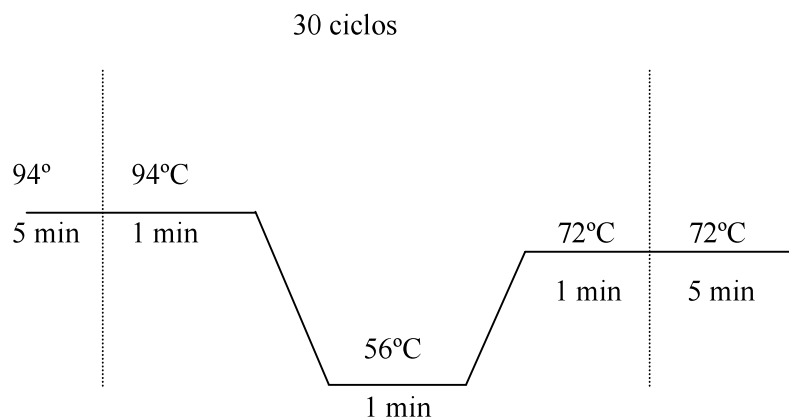


Figura 12 – Ciclos de PCR utilizados na amplificação da região onde ocorre a mutação Del3 no gene *GJB6*.

O produto amplificado foi analisado em gel de agarose 1,5% em tampão TBE 1x, corado com brometo de etídeo (na concentração final 0,5µg/mL) e visualizado sob luz ultravioleta.

2.7. Técnica de MLPA (Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification)

A técnica de MLPA (Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification) introduzida por MRC-Holland em janeiro de 2002 permite a quantificação relativa de até 45 seqüências de ácidos nucleicos em uma única reação, sendo capaz de detectar dessa maneira, deleções ou duplicações de diversos genes.

O kit MLPA P163-B1 (MRC-Holland) permite a análise dos principais genes envolvidos na perda auditiva não-sindrômica além do gene *WFS1* que causa a síndrome de Wolfram que inclui a perda auditiva como um dos sinais clínicos. O kit foi desenhado para detecção de deleções e duplicações de um ou mais exons dos genes *GJB2*, *GJB3*, *GJB6* e mutações pontuais 35delG e *IVS1+1G>A* que ocorrem no gene *GJB2*. A análise simultânea desses três genes parece ser uma estratégia eficiente de triagem inicial no diagnóstico molecular da perda auditiva (Gurtler *et al.*, 2008).

A técnica MLPA é constituída de 4 etapas: desnaturação, hibridização, ligação e amplificação.

Desnaturação e Hibridização: O DNA genômico é desnaturado por uma dada temperatura e então hibridizado a uma mistura de sondas. Cada sonda é formada por dois oligonucleotídeos: 1- oligonucleotídeo Y que possui um tamanho variável de 50-60pb contendo um marcador fluorescente (para posterior reconhecimento), seguido de uma seqüência homóloga ao *primer* universal Y (correspondendo à região pela qual esses *primers* universais serão anelados, posteriormente), e uma seqüência de hibridação homóloga ao DNA-alvo. 2- oligonucleotídeo X possui um tamanho variável entre 60-450pb, contém uma seqüência homóloga ao *primer* universal X, seguido de uma seqüência-coringa (com extensão diferente para cada sonda, o que definirá o tamanho a partir do qual o fragmento final poderá ser diferenciado dos demais) e uma seqüência de hibridização homóloga ao DNA-alvo, (Figura 13).



Figura 13 - Constituição dos oligonucleotídeos das sondas de MLPA.

Ligação: Após hibridização das sondas nas seqüências complementares no DNA alvo, os oligonucleotídeos são unidos em temperatura ambiente por uma enzima ligase dependente de temperatura, formando um fragmento único com a seguinte disposição: fluoróforo – região de ligação ao *primer* universal – seqüência complementar ao DNA alvo – seqüência coringa – região de ligação ao *primer* universal (Figura 14).

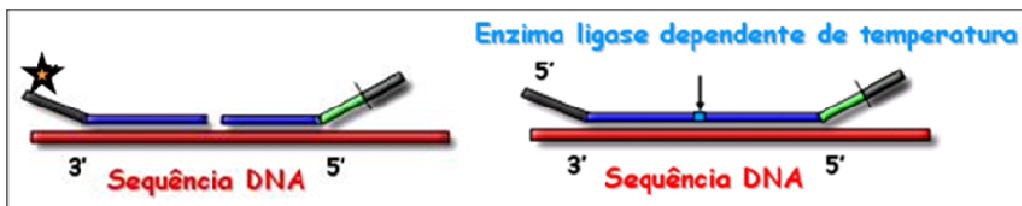


Figura 14 - Anelamento dos oligonucleotídeos na sequência de DNA genômico e posterior união desses oligonucleotídeos pela enzima ligase dependente de temperatura.

Amplificação: Os fragmentos formados pelas duas sondas, agora unidas, são amplificados por PCR utilizando-se *primers* universais que se anelam nas sequências situadas nas duas extremidades dos produtos de ligação (Figura 15).

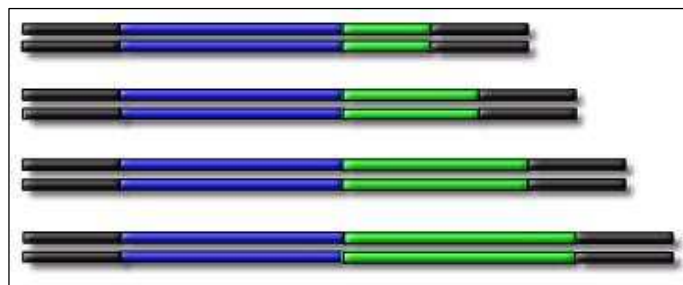


Figura 15 - Resultado da amplificação dos produtos de ligação através de PCR, com a utilização de *primers* universais.

Em seguida, tais produtos são separados por eletroforese em seqüenciador automático e podem ser analisados em relação aos controles (Figura 16). A área do pico de cada produto de amplificação reflete o número relativo de cópias de cada sequência-alvo, permitindo que aquelas que sofreram deleção ou duplicação sejam identificadas.

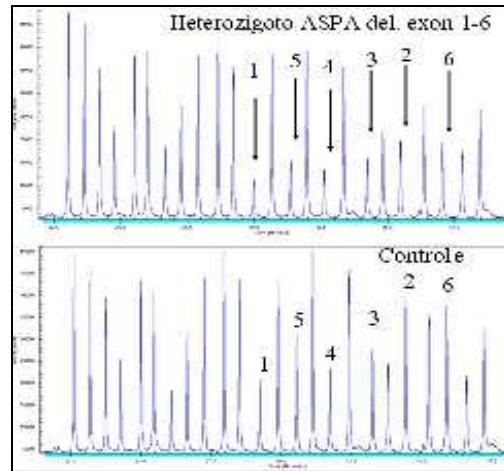


Figura 16 - Exemplo de separação e quantificação por eletroforese capilar.

O kit utilizado nesse estudo foi o SALSA MLPA Kit P163-B1 *GJB-WFS1*, composto por 41 sondas que geram fragmentos de 124 a 428pb. Esse kit contém: sondas para todos os exons dos genes *GJB2* e *GJB6*, inclusive regiões promotoras, várias sondas para região 13q11-q12, sondas para os exons 1, 2 e 3 do gene *GJB3*, várias sondas para o gene *WFS1* que está envolvido com perda auditiva síndrômica além de 7 sondas referência. Estão também incluídos nesse kit, 2 sondas específicas para as mutações de ponto 35delG e *IVS1+1G>A* que só serão amplificadas na presença das mesmas. A reação é detalhada a seguir.

2.7.1. Desnaturação do DNA genômico e hibridização das sondas

A amostra de DNA de todos os indivíduos heterozigotos para mutações no gene *GJB2*, bem como de 5 controles normais (amostras de indivíduos ouvintes, negativos para mutações no gene *GJB2* e deleções no gene *GJB6*) e 1 controle homozigoto para mutação del(*GJB6*-D13S1830) foram diluídos em TE, na proporção de 250ng para 5 μ L e mantida em termociclador em temperatura de 98°C por 5 minutos e, posteriormente, a 25°C. A seguir foram acrescentados 1,5 μ l de SALSA *Probe-mix* e 1,5 μ l de *MLPA buffer*. Após ressuspensão, são mantidos a 95°C por 1 minuto e incubados a 60°C durante 16 horas.

2.7.2. Reação de Ligação

A temperatura do termociclador foi reduzida a 54°C, quando 32µl de *Mix Ligase-65* são acrescentados a cada amostra, com posterior ressuspensão. Para a obtenção do *Mix Ligase* foram misturados 3µl de *Ligase-65 buffer A*, 3µl *Ligase-65 buffer B*, 25µl de H₂O e 1µl *Ligase-65*.

Em seguida, as amostras permaneceram incubadas a uma temperatura de 54°C por 15 minutos e a 98°C por 5 minutos.

2.7.3. Reação da PCR Multiplex

Foram adicionados 4µL 10X SALSALSA PCR *buffer*, 26 µl de H₂O, 10µl da reação de ligação de MLPA a novos tubos, que foram mantidos em termociclador a 60°C.

Em seguida, 10µL de *Mix Polymerase* foram acrescentados a cada tubo, para assim inicializar a reação de PCR segundo o protocolo de 30 segundos-95°C; 30 segundos-60°C; 60 segundos-72°C, por 35 ciclos. Por fim, as amostras foram incubadas a 72°C, durante 20 minutos. Para o *Mix Polymerase* foram necessários 2µL de SALSALSA PCR-*primers*, 2µL SALSALSA *Enzyme Dilution buffer*, 5,5µL de H₂O e 0,5µL de SALSALSA *Polymerase*.

2.7.4. Separação dos produtos amplificados por eletroforese capilar

Posteriormente à reação de PCR foram misturados a 0,75µL do produto de PCR, 0,75µL de água, 0,5µL de 500 ROX, 13,5µL Formamida *Hi-Di*, em seguida, desnaturados a 94°C por 2 minutos e resfriados em gelo. Os produtos de PCR foram identificados utilizando o equipamento de eletroforese capilar ABI-Prism 310 Genetic Analyser (Applied, Biosystems), com filtros de fluorescência específicos, seguindo o protocolo desenvolvido por *MRC Holland b. v2; 1-6-2007: Salsa 6-FAM PCR primer-dNTP mix*.

Os fragmentos foram visualizados e analisados utilizando os *Software GeneScan e Genotyper* (Applied Biosystems).

2.7.5. Análise dos dados

Para a análise dos dados é utilizada uma planilha específica. Essa planilha é baseada em programa *Excel* que pode ser usado com a versão 2003+ ou superior do *Microsoft Office version 2003+*. Tecnicamente, os dados são normalizados, dividindo-se a área do pico de cada sonda pela soma dos picos de todas as sondas na amostra. Em seguida, esse valor normalizado é dividido pela área do pico da sonda correspondente, obtida a partir do DNA controle. Quando da presença de deleções e duplicações em heterozigose, os valores serão, respectivamente, de 0,5 e 1,5, se comparados com o valor normal de 1,0.

A tabela abaixo resume as técnicas utilizadas como estratégia de análise no rastreamento de mutações nos principais genes envolvidos com perda auditiva sensorioneural não-sindrômica.

Tabela 4 - Métodos utilizados nesse estudo

GENE	MUTAÇÕES	MÉTODO
GJB2	35delG	ASPCR, Seqüenciamento, MLPA
	IVS1+1G>A	PCR, Análise de Restrição, Seqüenciamento, MLPA
	Del e Duplicações	MLPA
GJB3	Del e Duplicações	MLPA
GJB6	del(GJB6-D13S1830)	PCR Multiplex
	del(GJB6-D13S1854)	
	Del3	PCR
	Outras Del e Duplic	MLPA

RESULTADOS

Os indivíduos com perda auditiva sensorineural não-sindrômica foram previamente analisados quanto a presença da mutação 35delG. As amostras positivas em homozigose foram excluídas do estudo. As amostras com resultados negativos e as que apresentavam a mutação 35delG em heterozigose foram analisadas em busca de outras mutações no gene *GJB2*, assim como nos genes *GJB3* e *GJB6* (Figura 8). Foram estudados 45 indivíduos, a tabela 5 a seguir, mostra um resumo dos resultados de todas as amostras estudadas. Além disso, a mutação *IVSI+1G>A* foi rastreada em 142 amostras de indivíduos surdos, que não apresentaram alterações na região codificante do gene *GJB2* assim como também não apresentaram deleções no gene *GJB6*.

RESULTADOS

Tabela 5-Resumo dos resultados de todas as amostras estudadas.N=Normal,M=Mutante,Δ=deleção.

N	GJB2		GJB6			GJB3	Genótipo	MLPA
	35delG	Outras	Δ(GJB6-D13S1830)	Δ(GJB6-D13S1854)	Del 3			
1	M/N	V27I	N/N	N/N	N/N	N/N	35delG/V27I	35delG/N
2	M/N	N	N/N	N/N	N/N	N/N	35delG/N	35delG/N
3	M/N	N	N/N	N/N	N/N	N/N	35delG/N	35delG/N
4	M/N	N	N/N	N/N	N/N	N/N	35delG/N	35delG/N
5	M/N	N	N/N	N/N	N/N	N/N	35delG/N	35delG/N
6	M/N	I/S1+1G>A	N/N	N/N	N/N	N/N	35delG / I/S1+1G>A	35delG / I/S1+1G>A
7	M/N	M34T	N/N	N/N	N/N	N/N	M34T/N	N/N
8	M/N	V37I	N/N	N/N	N/N	N/N	35delG/V37I	35delG/N
9	M/N	N	N/N	N/N	N/N	N/N	35delG/N	35delG/N
10	M/N	K188R	N/N	N/N	N/N	N/N	K188R/N	Alteração GJB2 (del)
11	M/N	N	N/N	N/N	N/N	N/N	35delG/N	35delG/N
12	M/N	N	N/N	N/N	N/N	N/N	35delG/N	35delG/N
13	M/N	N	N/N	N/N	N/N	N/N	35delG/N	35delG/N
14	M/N	N	N/N	N/N	N/N	N/N	35delG/N	35delG/N
15	M/N	N	N/N	N/N	N/N	N/N	35delG/N	35delG/N
16	M/N	N	N/N	N/N	N/N	N/N	35delG/N	35delG/N
17	M/N	W24X	N/N	N/N	N/N	N/N	35delG/W24X	35delG/N
18	M/N	N	N/N	N/N	N/N	N/N	35delG/N	35delG/N
19	M/N	N	N/N	N/N	N/N	N/N	35delG/N	35delG/N
20	M/N	N	N/N	N/N	N/N	N/N	35delG/N	35delG/N
21	M/N	N	N/N	N/N	N/N	N/N	35delG/N	35delG/N
22	M/N	L90P	N/N	N/N	N/N	N/N	35delG/L90P	35delG/N
23	M/N	N	N/N	N/N	N/N	N/N	35delG/N	35delG/N
24	M/N	V95M	N/N	N/N	N/N	N/N	35delG/V95M	35delG/N
25	M/N	R184P	N/N	N/N	N/N	N/N	35delG/R184P	35delG/N
26	M/N	N	N/N	N/N	N/N	N/N	35delG/N	35delG/N
27	M/N	N	N/N	N/N	N/N	N/N	35delG/N	35delG/N
28	M/N	N	N/N	N/N	N/N	N/N	35delG/N	35delG/N
29	M/N	L90P	N/N	N/N	N/N	N/N	35delG/L90P	35delG/N
30	M/N	N	N/N	N/N	N/N	N/N	35delG/N	35delG/N
31	M/N	N	N/N	N/N	N/N	N/N	35delG/N	35delG/N
32	M/N	N	N/N	N/N	N/N	N/N	35delG/N	35delG/N
33	M/N	N	N/N	N/N	N/N	N/N	35delG/N	35delG/N
34	M/N	N	N/N	N/N	N/N	N/N	35delG/N	35delG/N
35	M/N	N	N/N	N/N	N/N	N/N	35delG/N	35delG/N
36	M/N	N	N/N	N/N	N/N	N/N	35delG/N	35delG/N
37	M/N	N	N/N	N/N	N/N	N/N	35delG/N	Alteração GJB2
38	M/N	N	N/N	N/N	N/N	N/N	35delG/N	35delG/N
39	M/N	N	N/N	N/N	N/N	N/N	35delG/N	35delG/N
40	M/N	N	Δ(GJB6-13S1830)/N	M/N	M/N	M/N	35delG/Δ(GJB6-13S1830)	35delG/Δ(GJB6-13S1830)
41	M/N	V95M	N/N	N/N	N/N	N/N	35delG/V95M	35delG/N
42	M/N	I/S1+1G>A	N/N	N/N	N/N	N/N	35delG / I/S1+1G>A	35delG / I/S1+1G>A
43	M/N	N	N/N	N/N	N/N	N/N	35delG/N	35delG/N
44	M/N	R184W	N/N	N/N	N/N	N/N	35delG/R184W	35delG/N
45	M/N	M34T	N/N	N/N	N/N	N/N	35delG/M34T	35delG/N

1. Gene *GJB2*

A principal mutação 35delG, foi inicialmente rastreada pela técnica de PCR alelo específico (AS-PCR) (Figura 17) sendo selecionadas 43 amostras que apresentaram essa mutação em heterozigose (35delG/N). Em seguida, todas as 43 amostras foram também analisadas por seqüenciamento automático da região codificante do gene. Os resultados obtidos confirmaram a presença da mutação 35delG (Figura 18) e revelaram em alguns indivíduos, a presença de outras mutações associadas a mutação 35delG. As amostras que não apresentaram a mutação 35delG na primeira triagem (AS-PCR) foram também analisadas por seqüenciamento e entre elas, duas amostras foram selecionadas. A amostra do indivíduo 7 apresentou apenas a mutação M34T (M34T/N) (Figura 19), e do indivíduo 10 apresentou a mutação K168R (K168R/N) (Figura 20). Portanto, 45 amostras monoalélicas para mutações no gene *GJB2* fizeram parte do presente estudo.

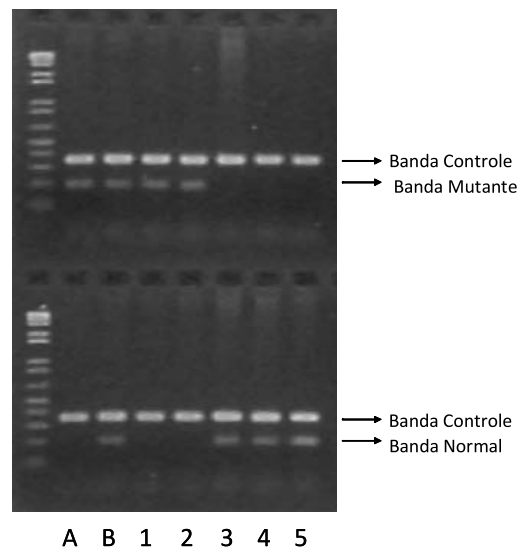


Figura 17 - Gel de agarose 1,5% mostrando os padrões de banda Controle, Mutante e Normal para a mutação **35delG** em 5 indivíduos. **A**: Controle Homozigoto mutante. **B**: Controle Heterozigoto. **1 e 2**: indivíduos com a mutação **35delG** em homozigose. **3, 4 e 5**: indivíduos homozigotos normais.

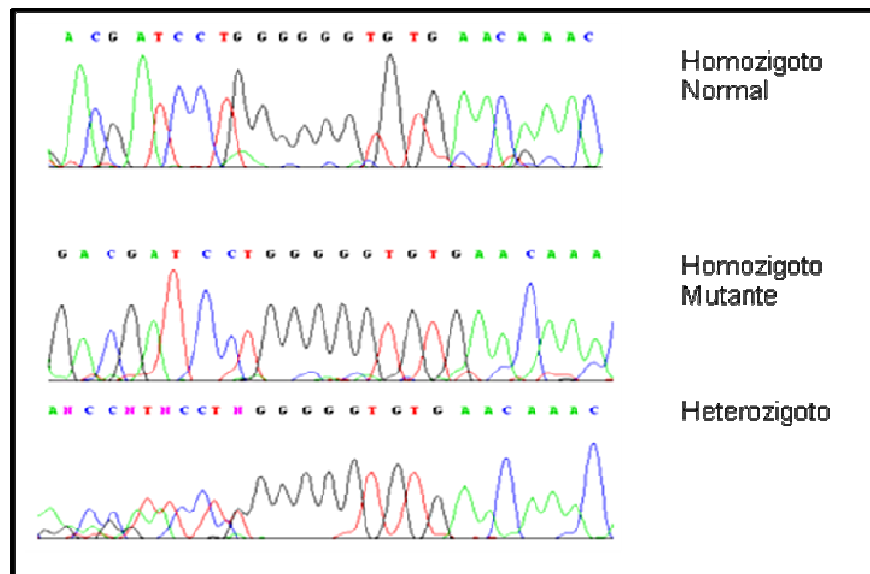


Figura 18 - Exemplo dos resultados do seqüenciamento automático no gene *GJB2*, na região da mutação 35delG.

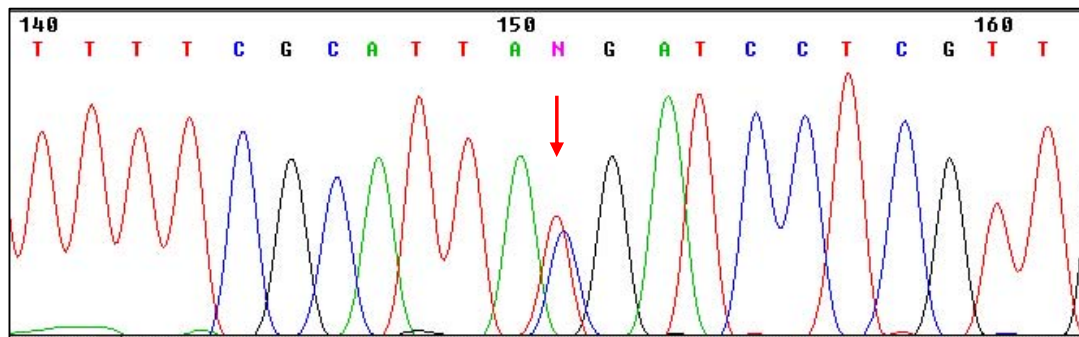


Figura 19 - Eletroferograma mostrando indivíduo heterozigoto para a mutação M34T. Essa mutação provoca a mudança de uma timina por uma citosina no nucleotídeo 101, levando a troca de uma metionina por uma tirosina no códon 34.

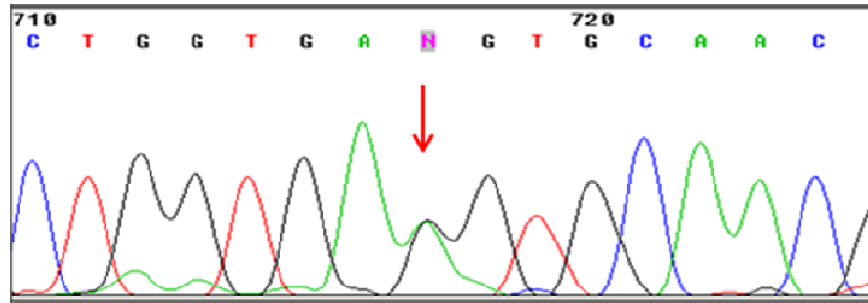


Figura 20 - Eletroferograma mostrando indivíduo heterozigoto para a mutação K168R. Essa mutação provoca a mudança de uma adenina para uma guanina no nucleotídeo 503, levando a troca de uma lisina por um arginina no códon 37.

Dentre as 43 amostras com a mutação 35delG em heterozigose, 10 apresentaram outras mutações na região codificante do gene *GJB2*, formando heterozigotos composto. O indivíduo 1 apresentou a alteração V27I considerada um polimorfismo (Figura 21). No indivíduo 45 foi encontrada a mutação M34T que já havia sido encontrada sem associação com nenhuma outra mutação no indivíduo 7 (Figura 19).

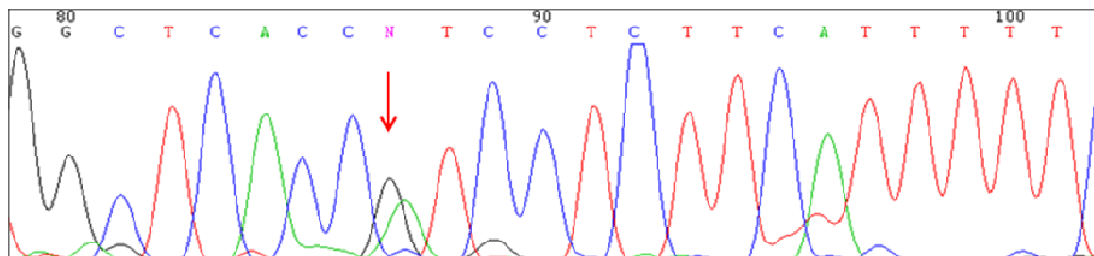


Figura 21 - Eletroferograma mostrando Indivíduo heterozigoto para a alteração V27I. A variação da base guanina para a base adenina na posição 29 do gene *GJB2* provoca a substituição do aminoácido valina por isoleucina no códon 27.

O indivíduo 8 e o indivíduo 17 apresentaram a mutação V37I e W24X respectivamente (Figuras 22 e 23).

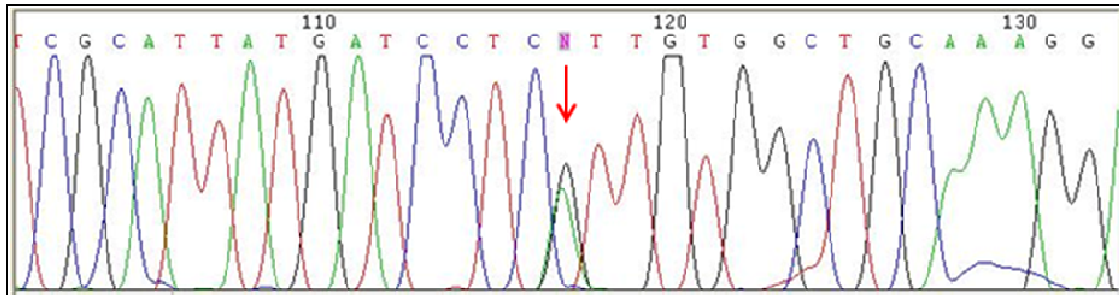


Figura 22 - Eletroferograma mostrando Indivíduo heterozigoto para a mutação V37I. Essa mutação provoca a mudança de uma guanina para uma adenina no nucleotídeo 109, levando à troca de uma valina por um isoleucina no códon 37.

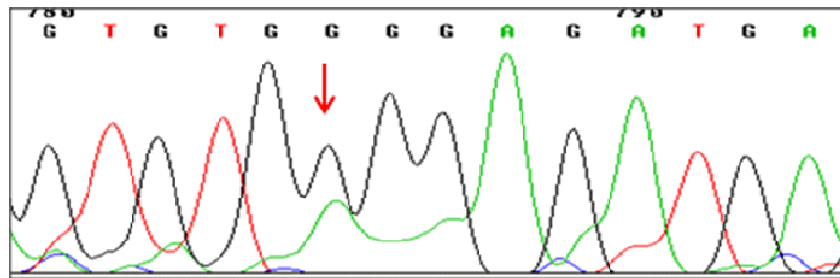


Figura 23 - Eletroferograma mostrando Indivíduo heterozigoto para a mutação W24X. Essa mutação causa a troca de uma G para A na posição 71 do gene, levando a mudança do aminoácido triptofano para um códon de terminação na posição 24 gerando a síntese de uma proteína truncada.

Os indivíduos 22 e 29 apresentaram a mutação L90P (Figura 24).

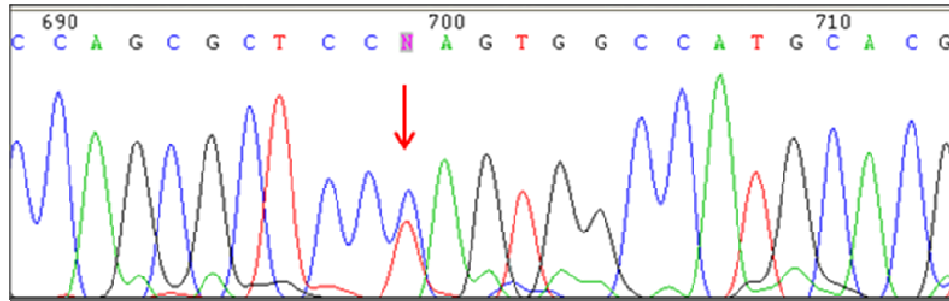


Figura 24 - Eletroferograma mostrando Indivíduo heterozigoto para a mutação L90P. Essa mutação provoca a mudança de uma timina para uma citosina no nucleotídeo 269, levando a troca de uma leucina por uma prolina no códon 37.

Os indivíduos 24 e 41 apresentaram a mutação V95M (Figura 25).

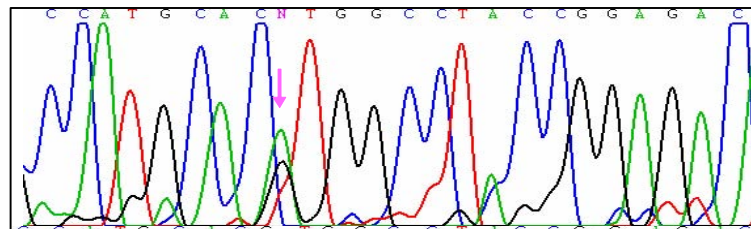


Figura 25 - Eletroferograma mostrando Indivíduo heterozigoto para a mutação V95M. Esta mutação provoca a mudança de uma guanina para uma adenina (nucleotídeo 283) que leva a substituição do aminoácido valina para metionina no códon 95.

O indivíduo 25 apresentou a mutação R184P (Figura 26) e o indivíduo 44 apresentou a mutação R184W (Figura 27).

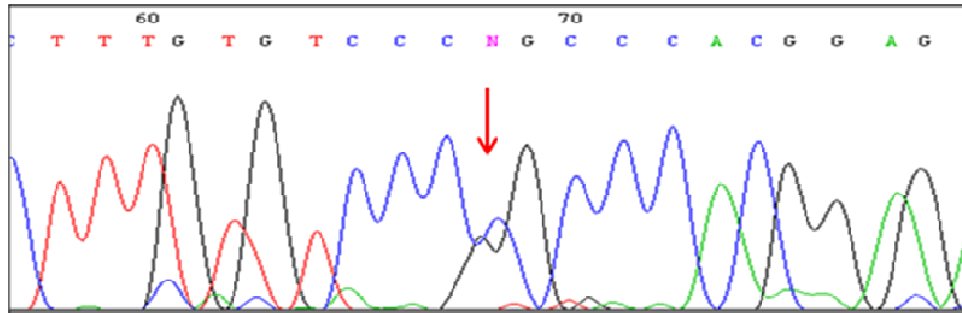


Figura 26 - Eletroferograma mostrando Indivíduo heterozigoto para a mutação R184P. Esta mutação causa a troca da citosina para guanina na posição 551 levando a mudança da serina para fenilalanina no códon 184.

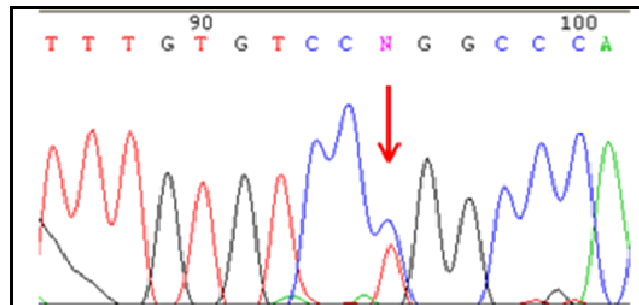


Figura 27 - Eletroferograma mostrando Indivíduo heterozigoto para a mutação R184W. Ocorre a troca de uma citosina por uma timina na posição 550 levando a substituição da arginina por um triptofano no códon 184.

1.1. Rastreamento da mutação *IVSI + 1G>A*

Para o rastreamento da mutação *IVSI+1G>A* um fragmento contendo a junção exon1/intron1 na região não codificante do gene, onde ocorre a mutação, foi amplificada pela

técnica de PCR. Os fragmentos foram submetidos a análise de restrição utilizando a enzima *Hph* I. Após a digestão, na ausência da mutação, são obtidos um fragmento de 117pb e outro de 244pb. A mutação leva à uma perda do sítio de restrição sendo assim, na sua presença apenas um fragmento de 361pb é formado. Os fragmentos foram também analisados por seqüenciamento automático e, posteriormente, pela técnica de MLPA. Essa mutação foi encontrada nos indivíduos 6 e 42, os quais apresentaram a mutação *IVS1+1G>A* (Figura 28) em heterozigose associada a mutação 35delG. Os pais desses indivíduos foram também avaliados quanto à presença dessa mutação. O pai do indivíduo 6 apresentou a mutação *IVS1+1G>A* em um dos alelos, sua mãe não possui essa mutação porém, é heterozigota para a mutação 35delG. O mesmo resultado foi observado no indivíduo 42 (Figura 29).

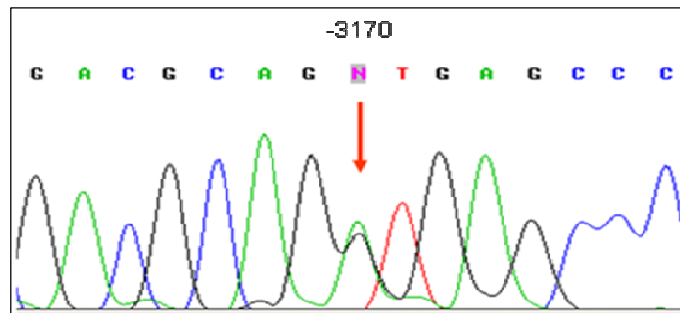


Figura 28 - Eletroferograma mostrando Indivíduo heterozigoto para a mutação *IVS1+1G>A*. Esta mutação causa a troca de uma guanina por uma adenina na posição -3170 no sítio de splice do intron 1 do gene *GJB2* levando a uma alteração no mecanismo de splice.

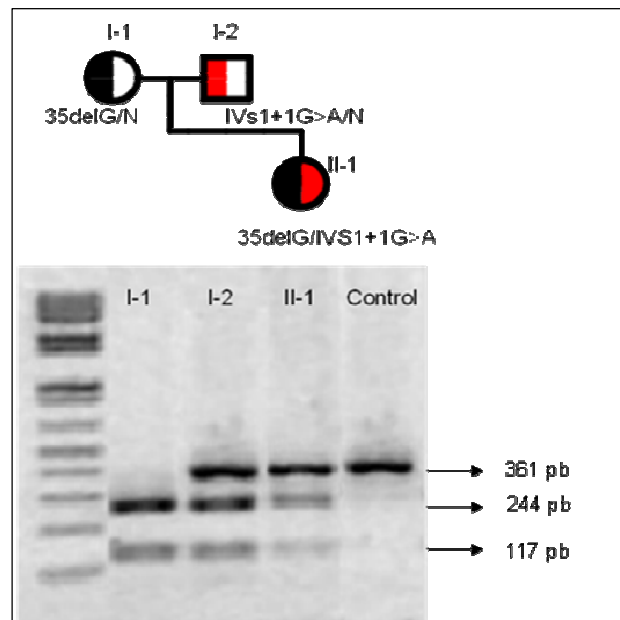


Figura 29 - Pedigree da família 6 e um gel de agarose 1,5% mostrando os padrões obtidos após digestão com a enzima *Hph* I do fragmento amplificado por PCR. I- 1= Mãe I-2= Pai heterozigoto para a mutação *IVS1+1G>A*, II-1 filho afetado também heterozigoto para a mutação *IVS1+1G>A*, Control= amostra sem digestão.

Esta alteração ainda não havia sido descrita no Brasil. Dessa forma, para investigar sua incidência, foram analisados 142 indivíduos com perda auditiva sensorineural não-sindrômica que não apresentavam mutações na região codificante do gene *GJB2*. Nenhum dos indivíduos avaliados apresentou a mutação *IVS1+1G>A*.

2. Gene *GJB6*

Para o rastreamento das deleções no gene *GJB6*, $\text{del}(GJB6-13S1830)$ e $\text{del}(GJB6-13S1854)$, utilizou-se a técnica de PCR Multiplex que permite a detecção de ambas as alterações em uma única reação de PCR. Das 45 amostras analisadas, heterozigotas para mutações no gene *GJB2*, apenas o indivíduo 40 apresentou a deleção $\text{del}(GJB6-13S1830)$ ($35\text{delG}/\text{del}(GJB6-13S1830)$). A figura 30 exemplifica resultados obtidos no PCR Multiplex. A mutação $\text{del}(GJB6-13S1854)$ não foi identificada em nenhuma das amostras estudadas.

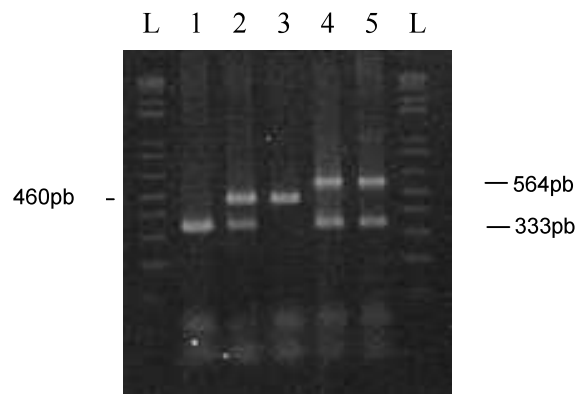


Figura 30 - Resultado da técnica de PCR Multiplex para detecção das deleções $\Delta(GJB6-D13S1830)$ e $\Delta(GJB6-D13S1854)$ em gel de agarose 1,5%. (**L**) marcador *ladder* 100pb Gibco BRL®; (**1**) indivíduo normal; (**2**) $\Delta(GJB6-D13S1830)/N$; (**3**) $\Delta(GJB6-D13S1830)/\Delta(GJB6-D13S1830)$ (4 e 5) $\Delta(GJB6-13S1854)/N$.

Para o rastreamento da deleção Del3 no gene *GJB6* utilizou-se a técnica de PCR. Na ausência da mutação, fragmentos de 836pb são obtidos, na presença são amplificados fragmentos de 628 pb. Nenhuma das amostras estudadas apresentaram a deleção Del3 (Figura 31)

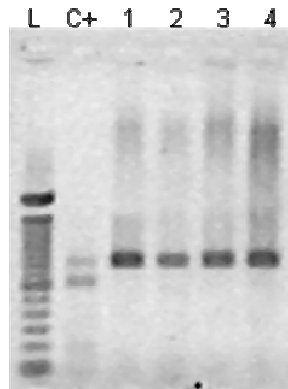


Figura 31 - Resultado da pesquisa da deleção 3 por PCR dos indivíduos 1, 2, 3 e 4.

L= Ladder; C= controle heterozigoto enviado pela Dra.Friderici (Michigan-EUA) que relatou o encontro da mutação Del 3.

3. Gene *GJB3*

O gene *GJB3* foi investigado pela técnica de MLPA que contém 4 sondas específicas para essa região permitindo o rastreamento de deleções e duplicações do exon 1 ao exon 3 do gene. Nenhuma alteração foi observada nas amostras analisadas nesse estudo.

4. MLPA

A técnica de MLPA (*Multiplex Ligation-dependent probe amplification*- Amplificação de Múltiplas Sondas Dependente de Ligação) foi utilizada para rastrear deleções e duplicações nos genes *GJB2*, *GJB3* e *GJB6* e as mutações 35delG e *IVS1+1G>A*.

Nesse estudo, todas as amostras foram submetidas à análise pela técnica de MLPA cujos resultados podem ser observados na tabela 4. Das 45 amostras estudadas foi possível a detecção da mutação 35delG por meio da técnica de MLPA, em 43 indivíduos, confirmando os resultados obtidos pelas técnicas de AS-PCR e seqüenciamento automático.

A mutação *IVS1+1G>A* foi detectada utilizando a técnica de MLPA em 2 indivíduos (6 e 42), resultado também concordante com os obtidos por outras técnicas utilizadas. A figura 32

apresenta o dado bruto obtido no programa *Genotyper*, onde pode-se visualizar os diferentes picos que correspondem a cada sonda amplificada.

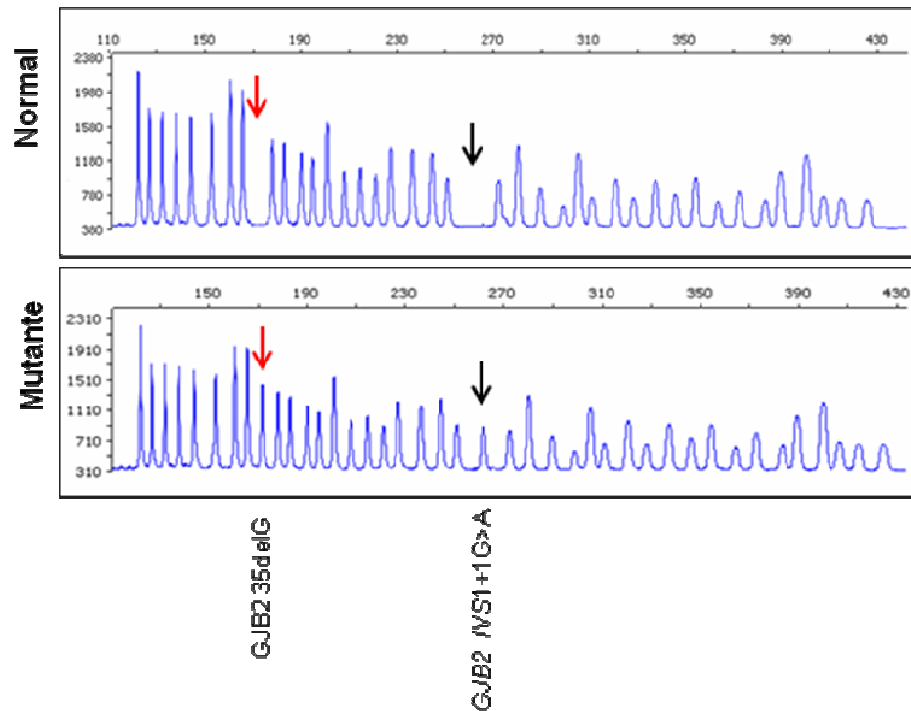


Figura 32 - Eletroferograma do indivíduo 42 e de um controle normal. As setas indicam a amplificação das sondas específicas para as mutações 35delG e IVS1+1G>A o que determina a presença dessas mutações nesse indivíduo.

Os resultados obtidos no programa *Genotyper*, foram normalizados em planilha específica Excel. Os gráficos obtidos apresentam todas as sondas utilizadas para a análise dos genes *GJB2*, *GJB3* e *GJB6*. Dessa forma, o número de cópias dos genes é correspondente a altura das barras. A ausência de barras indica uma deleção da região de hibridização da sonda no DNA do indivíduo analisado. Para as alterações 35delG e IVS1+1G>A a estratégia

utilizada é diferente, ou seja, a presença das barras indicam que o indivíduo é portador das mutações.

No gráfico abaixo (Figura 33), observa-se na primeira linha o resultado de um indivíduo controle, no qual as mutações 35delG e *IVS1+1G>A* estão ausentes. Na segunda linha está representado os resultados da análise do indivíduo 24, o qual é heterozigoto para a mutação 35delG, e finalmente na terceira linha os resultados do indivíduo 42, heterozigoto composto para as mutações 35delG e *IVS1+1G>A*.

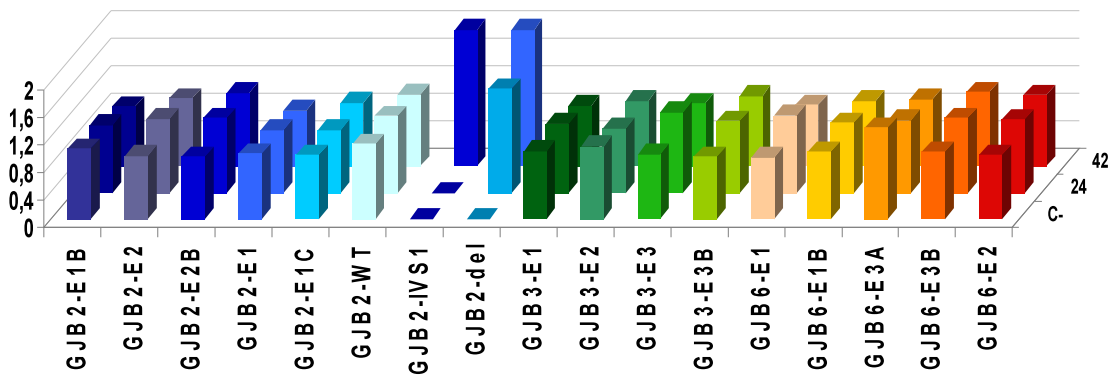


Figura 33 - Gráfico mostrando os resultados obtidos pela análise da amostra de um indivíduo sem alterações nos genes estudados (C-), assim como, dos indivíduos 24 e 42.

A figura 34 mostra o eletroferograma de um indivíduo utilizado como controle, o qual é homozigoto para a deleção del(*GJB6-D13S1830*). Nesse caso observa-se a ausência dos picos que representam a amplificação das sondas *GJB6Ex1*, *GJB6Ex1B*, *GJB6Ex2* e *GJB6Ex3A* localizadas na região da deleção. A deleção del(*GJB6-D13S1830*) resultou na não hibridização dessas sondas.

No eletroferograma da figura 35 que apresenta os resultados obtidos pela análise de amostra do indivíduo 40, observa-se uma redução da altura dos picos nesta mesma região, revelando a presença da deleção del(*GJB6*-D13S1830) em heterosigose. Além disso, observa-se também que ocorreu a amplificação da sonda *GJB235delG* indicando a presença da mutação 35delG nesse mesmo indivíduo. Portanto, o indivíduo 40 é heterozigoto composto del(*GJB6*-D13S1830)/35delG. Na figura 36 esses resultados estão apresentados gráficamente.

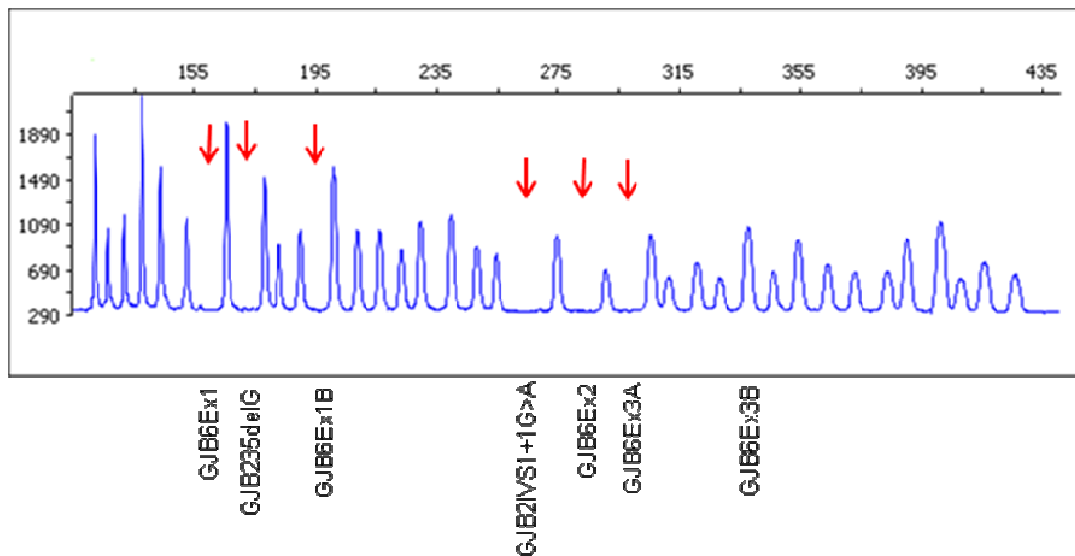


Figura 34 - Setas indicam a ausência de amplificação das sondas do gene *GJB6* e das sondas 35delG e *IVS1+1G>A* no gene *GJB2*. Indivíduo controle homozigoto para mutação del(*GJB6*-D13S1830).

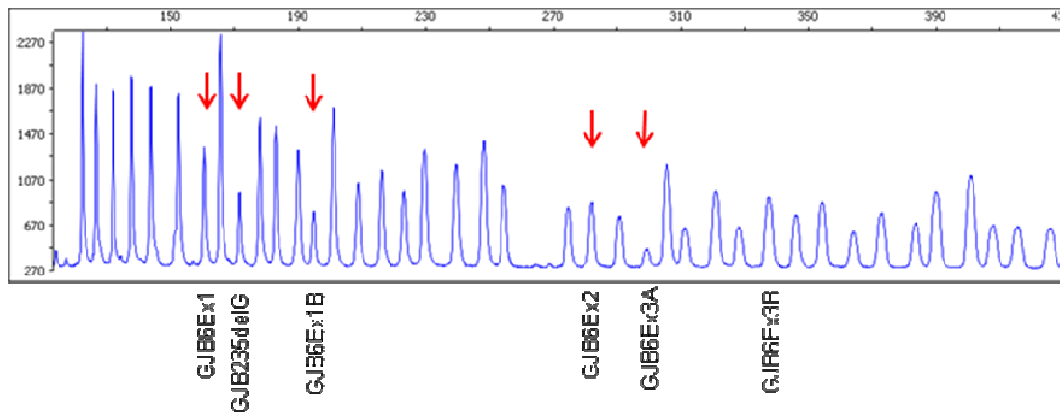


Figura 35 - As setas indicam a redução da altura dos picos das sondas do gene *GJB6* e amplificação da sonda 35delG no gene *GJB2*. Indivíduo 40 heterozigoto composto del(*GJB6*-D13S1830)/35delG.

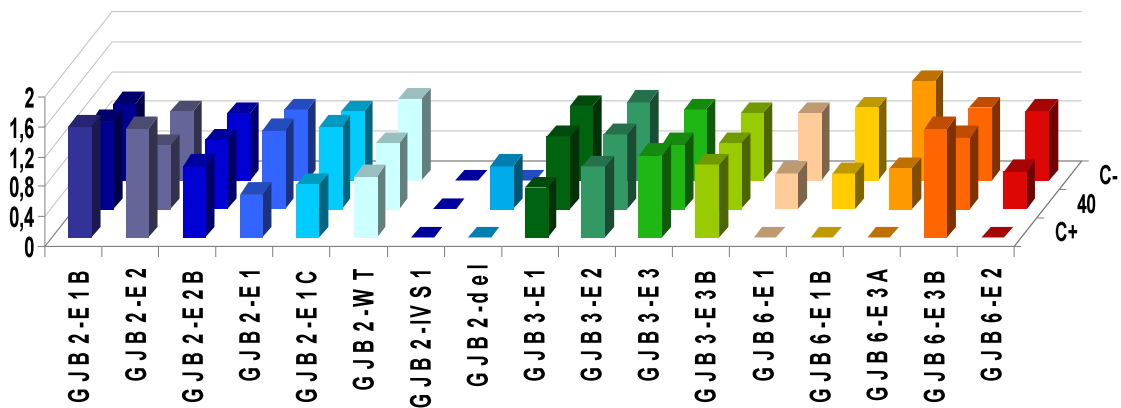


Figura 36 - Gráfico mostrando os resultados dos indivíduos controle homozigoto para a mutação del(*GJB6*-D13S1830) (C+), indivíduo 40 heterozigoto composto del(*GJB6*-D13S1830)/35delG e de um indivíduo controle negativo (C-) para ambas mutações.

O indivíduo 10, no qual foi encontrado apenas a mutação K168R no seqüenciamento automático, apresentou na técnica de MLPA uma redução da amplificação das sondas *GJB2E1* e

*GJB2*E1B. Essas sondas hibridizam, e detectam regiões próximas entre si no gene *GJB2*, especificamente onde se localiza o promotor do gene (Figuras 37 e 38). Esses resultados podem indicar a perda de uma cópia nessa região devido a uma deleção em heterozigose. Para descartar a possibilidade de ter ocorrido um anelamento imperfeito entre as referidas sondas e o DNA molde gerando um resultado falso positivo, a reação foi repetida, mas os resultados se confirmaram.

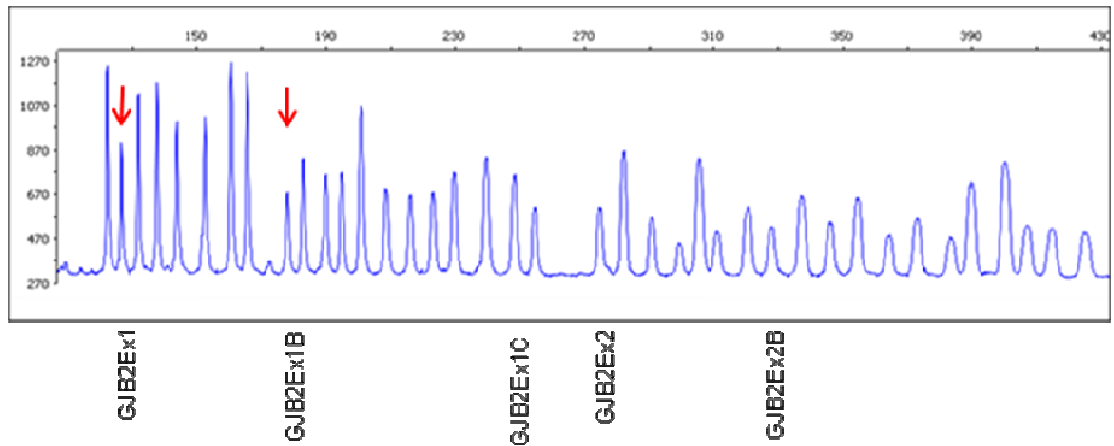


Figura 37 - Eletroferograma do indivíduo 10. Setas indicam a redução da amplificação de sondas no gene *GJB2*.

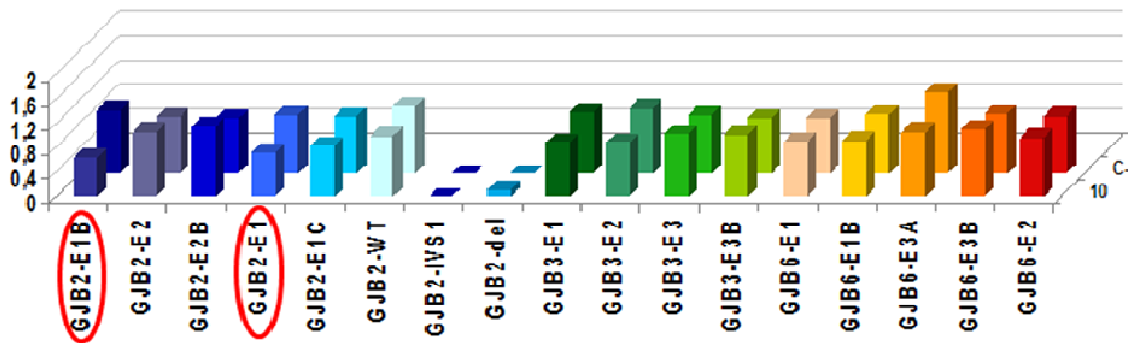


Figura 38 - Gráfico mostrando os resultados do indivíduo 10 onde observa-se a redução da altura das barras referentes as sondas *GJB2E1* e *GJB2E1B*. C- : controle negativo.

A análise da amostra do indivíduo 37, o qual é heterozigoto para a mutação 35delG apresentou o resultado mostrado na figura 39. Foi observado um aumento da altura dos picos referentes a sondas *GJB2Ex1B* e *GJB2Ex1C*. Essas sondas hibridizam em seqüências localizadas no exon 1 (região não codificante) do gene *GJB2* e esse aumento pode indicar uma duplicação desta região.

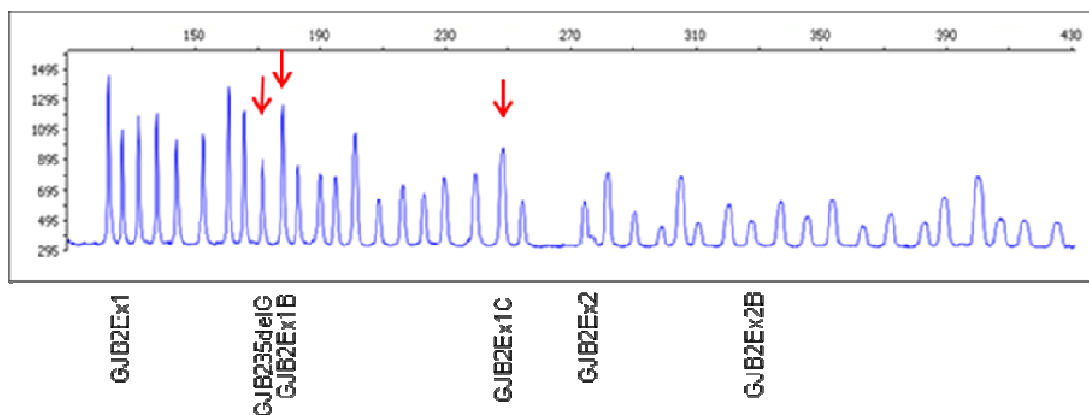


Figura 39 - Eletroferograma mostrando o resultado do indivíduo 37. Setas indicam o aumento da altura dos picos das sondas no gene *GJB2* e a amplificação da sonda 35delG.

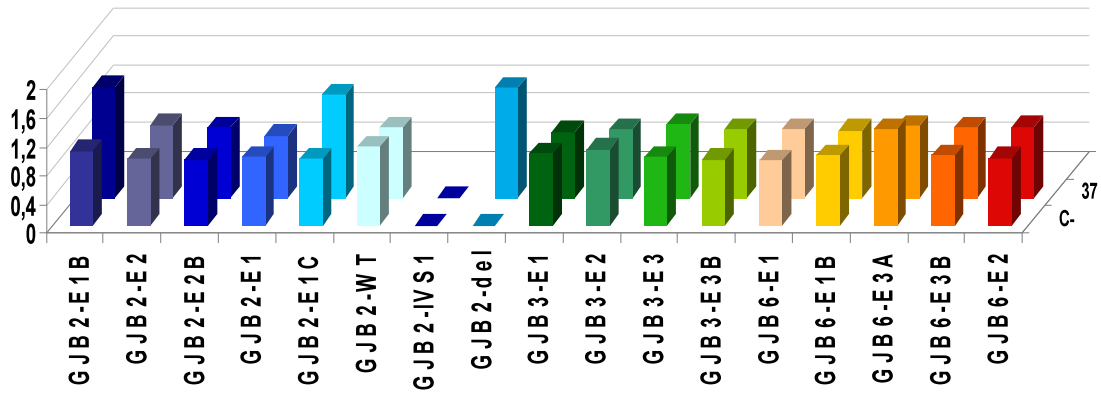


Figura 40 - Gráfico do indivíduo 37 apresentando um aumento da altura das barras *GJB2E1B* e *GJB2E1C* podendo significar um aumento do número de cópias nesta região.

DISCUSSÃO

O número de indivíduos com perda auditiva, apresentando mutação de herança autossômica recessiva no gene *GJB2* em um único alelo, como mencionado anteriormente, chega a ser observado em 40% das famílias. Dessa forma, muitas pesquisas têm sido realizadas a fim de determinar a etiologia genética da surdez nesses casos. Inicialmente, o que se busca no DNA desses indivíduos é uma segunda mutação no outro alelo, uma vez que, a associação dessas mutações pode impedir a expressão das duas cópias do gene, causando o fenótipo de surdez. Os achados de Del Castilho e colaboradores (2003 e 2005), foram de extrema importância porque explicaram vários casos de indivíduos monoalélicos para mutações no gene *GJB2*.

Nesse estudo, 11 mutações diferentes foram encontradas, 9 na região codificante e 1 na região não codificante do gene *GJB2*, além de uma deleção no gene *GJB6*. Dez delas foram encontradas em heterozigose composta juntamente com a mutação 35delG, que é a mais freqüente em várias populações. Com esses resultados, foi possível concluir o diagnóstico molecular da perda auditiva em 12 casos dos 45 estudados (aproximadamente 27%).

As mutações encontradas já haviam sido previamente descritas e associadas com a surdez sensorineural não-sindrômica. Entre essas estão as mutações V37I, encontrada no paciente 8, e a mutação V95M encontrada nos indivíduos 24 e 41, ambas inicialmente descritas por Kelley e colaboradores em 1998. Essas mutações causaram, durante algum tempo, controvérsias quanto ao efeito de sua patogenicidade na proteína conexina.

A mutação V37I foi originalmente descrita como um polimorfismo neutro (Kelley *et al.*, 1998; Abe *et al.*, 2000). Oliveira e colaboradores (1999) relataram no Brasil dois indivíduos irmãos com perda auditiva progressiva sensorineural profunda, cujo genótipo apresentava as mutações V37I/V95M. Estudos posteriores da mutação V37I, segregando com a surdez em homozigose ou heterozigose composta com a mutação 35delG (Wilcox *et al.*, 2000; Piatto *et al.*, 2004; Cheng *et al.*, 2005; Daahl *et al.*, 2006; Pollak *et al.*, 2006), estabeleceram a natureza patogênica da mutação.

O efeito da mutação V95M na proteína ainda não foi determinado, visto que o aminoácido metionina já foi encontrado nessa posição em α (alfa) conexinas. Entretanto, o aminoácido valina é encontrado em β (beta) conexinas nessa posição, como é o caso da conexina 26 (Cx26). Desse modo, o aminoácido metionina substitui uma valina invariante em β conexinas, como ocorre a troca de um aminoácido hidrofóbico por outro com o mesmo carácter, provavelmente a importância dessa troca é devido a diferença de conexinas. Entretanto, estudos funcionais são necessários.

A mutação M34T foi primeiramente descrita por Kelsell e colaboradores em 1997. Essa mutação foi, inicialmente, considerada um polimorfismo neutro sem efeito no fenótipo, contudo estudos funcionais sugerem que a mutação M34T causa uma redução na permeabilidade do conexon (Oshima *et al.*, 2003). Posteriormente, Bicego e colaboradores (2006), avaliando o efeito dessa mutação por estudos eletrofisiológicos e bioquímicos, confirmaram a sua patogenicidade. No indivíduo 7, essa alteração foi encontrada em heterozigose sem associação com nenhuma outra alteração. Como a mutação M34T apresenta um padrão de herança recessivo, apenas este achado não pôde explicar a perda auditiva nesse indivíduo, sendo assim necessárias outras investigações. No indivíduo 45, a mutação M34T foi encontrada em heterozigose composta com a mutação 35delG esclarecendo, portanto, a etiologia molecular da surdez nesse caso.

No indivíduo 1, heterozigoto 35delG, foi observada a alteração V27I no gene *GJB2*. Estudos populacionais indicam que não há correlação entre a alteração V27I e a perda auditiva, uma vez que é observada na população normal. Sendo assim, essa alteração é considerada um polimorfismo neutro e, portanto, não contribui para concluir a etiologia da surdez no indivíduo 1 (Abe *et al.*, 2000).

No indivíduo 10, foi encontrada a mutação K168R sem associação com outra mutação na região codificante do gene. Essa mutação foi descrita recentemente com significância indeterminada em indivíduos com perda auditiva sensorineural (Samanich *et al.*, 2007, Oliveira *et al.*, 2007). Samanich descreveu três indivíduos heterozigotos para a alteração, sendo que um deles apresentava audição normal.

A mutação W24X, observada no indivíduo 17, foi pela primeira vez encontrada em uma família Paquistanesa (Kellsell *et al.*, 1997). Essa mutação causa a troca do aminoácido triptofano para um códon de terminação na posição 24, levando à síntese de uma proteína truncada. Um estudo multicêntrico (Snoeckx *et al.*, 2005), correlacionando genótipo-fenótipo, demonstrou que mutações que causam esse efeito na proteína levam à perda auditiva mais grave do que as mutações com sentido trocado (missense). O indivíduo 17 heterozigoto composto 35delG/W24X apresentou nos exames audiológicos surdez profunda.

A mutação L90P, encontrada nos indivíduos 22 e 29, ocorre no segundo domínio transmembrânico da proteína e foi descrita inicialmente por Murgia e colaboradores (1999). A mutação R184W (indivíduo 44) foi encontrada pela primeira vez por Wilcox e colaboradores (2000) em associação com a mutação M34T. A mutação L90P assim como a mutação R184W, tem sido encontrada freqüentemente segregando com perda auditiva de grau leve (Cryns *et al.*, 2004; Snoeckx *et al.*, 2005). Contudo, as mutações encontradas no gene *GJB2* apresentam manifestação clínica muito variável, não sendo possível determinar uma relação genótipo/fenótipo.

O indivíduo 25 apresentou a mutação R184P. Thonnissen e colaboradores (2002) estudaram as conseqüências desta mutação na conexina 26 utilizando método de transfecção em células *HeLa* humana. Esse estudo demonstrou que essa mutação provoca uma alteração na proteína, a qual impede a formação de hemicanais, levando à degradação dos conexons.

A mutação *IVS1+1G>A* ocorre na região não codificante do gene *GJB2* e é considerada rara. Contudo, essa alteração tem sido observada em várias populações (Santos *et al.*, 2005, Tang *et al.*, 2006). Na República Tcheca é a terceira mutação mais freqüente entre os indivíduos com perda auditiva pré-lingual (Seeman *et al.*, 2006). Até o momento, não havia nenhum relato a respeito dessa mutação na população brasileira. No presente estudo a mutação *IVS1+1G>A* foi encontrada associada a mutação 35delG nos indivíduos 6 e 42. O fato do indivíduo 6 ter ascendência norte americana e a ausência dessa mutação em 142 amostras analisados de indivíduos com perda auditiva não-sindrômica, demonstra que a mutação *IVS1+1G>A* parece ser rara no nosso meio, mas de qualquer forma, essa deve ser investigada

principalmente nos casos de indivíduos monoalélicos para mutações de herança autossômica recessiva no gene *GJB2*.

A deleção no gene *GJB6*, *del(GJB6-D13S1830)*, foi encontrada apenas no indivíduo 40 associada com a mutação 35delG. A associação das deleções no gene *GJB6* com a mutação 35delG parece se tratar de uma possível interação gênica levando ao fenótipo de surdez. Algumas observações têm levado a hipótese de que se trata de uma herança digênica. A Cx26 assim como a Cx30, são expressas nas mesmas estruturas da orelha interna. Dessa forma, conexons compostos de Cx26 podem se ligar a conexons compostos de Cx30 para formar canais híbridos (heteroméricos e heterotípicos). Portanto, a deleção afetando um gene de uma das conexinas levaria a um número insuficiente de canais funcionais causando a perda auditiva. No entanto, o fato de que mutações de ponto no gene *GJB6* não foram ainda descritos nos casos de surdez sensorineural não-sindrômica autossômica recessiva impede que esta hipótese seja completamente aceita. Além disso, Cx26^{+/-} / Cx30^{+/-} em ratos duplos heterozigotos apresentam apenas perda auditiva moderada, ao contrário do fenótipo observado no homem, onde a maioria dos duplos heterozigotos (*GJB2/GJB6*) apresentam perda auditiva severa ou profunda (Dahl *E et al.*, 1996; Del Castillo *et al.*, 2005).

Outra hipótese postula a existência de um elemento *cis* regulador que ativaria a expressão do gene *GJB2*. Esse elemento regulador seria removido pelas deleções *del(GJB6-D13S1830)* e *del(GJB6-D13S1854)* abolindo a expressão do gene *GJB2*. Seria uma co-regulação na transcrição e/ou tradução de tal forma que uma mutação deletéria em um dos genes impediria a expressão do outro (Ahmad *et al.*, 2003). Common e colaboradores (2005) estudando síndromes cutâneas e a expressão da Cx26, que também se expressa na pele (*gap junction*), demonstraram evidências imunohistoquímicas que a expressão da Cx26 é afetada pela mutação *del(GJB6-D13S1830)*. Contudo, o possível elemento regulador ainda não foi determinado.

Estudos multicêntricos realizados por Del Castillo e colaboradores (2003, 2005), determinaram a incidência das deleções *del(GJB6-D13S1830)* e *del(GJB6-D13S1854)* entre indivíduos heterozigotos, para mutações no gene *GJB2*, em diversos países. Segundo

resultados obtidos por esse grupo, a deleção del(*GJB6*-D13S1830), esclarece a etiologia da surdez em indivíduos monoalélicos para mutações no *GJB2* em 43% dos casos na Espanha, 38% na França, 32% no Reino Unido e 22% no Brasil. A deleção del(*GJB6*-D13S1854) no entanto, explica a surdez em 25% dos casos na Espanha, em 22% no Reino Unido, 6% no Brasil e não foi encontrada na França. De acordo com esses resultados portanto, essas deleções explicam aproximadamente 80% dos casos de indivíduos monoalélicos na Espanha e aproximadamente 30% no Brasil.

Contudo, Oliveira e colaboradores (2007) encontraram uma incidência menor quando analisaram 645 indivíduos com perda auditiva sensorineural e encontrou a del(*GJB6*-D13S1830) e a del(*GJB6*-D13S1854) em 4 e 2,9% dos alelos mutados respectivamente.

No presente estudo, a associação da deleção del(*GJB6*-D13S1830) com a mutação 35delG determinou o diagnóstico molecular de 2% dos casos anteriormente sem etiologia definida, entretanto, essa frequência não pode ser considerada, uma vez que, as amostras não foram selecionadas ao acaso. A deleção del(*GJB6*-D13S1854), por sua vez, não foi encontrada entre as amostras estudadas.

Na região do gene *GJB6* onde as deleções del(*GJB6*-D13S1830) e a del(*GJB6*-D13S1854) são encontradas, existe uma sequência *Alu* que parece contribuir para a ocorrência de deleções devido a recombinação homóloga com outras repetições similares ao longo do locus DFNB1. Recombinação *Alu/Alu* causa deleção e é um mecanismo comum nos organismos (Deininger *et al.*, 1999). De fato, outras deleções têm sido encontradas como, por exemplo, a Del 3 (não detectada nesse estudo), relatada por Wilch e colaboradores (2006) e uma quarta deleção ainda não publicada encontrada por Del Castillo e colaboradores (Del Castillo, comunicação pessoal).

No Brasil, essas deleções parecem não ser tão frequentes quanto em outras populações, ainda restando muitos casos sem etiologia esclarecida. Sendo assim, pode de fato haver outras alterações, sejam essas, deleções ou inserções ainda não detectadas, que poderiam causar o fenótipo de surdez em indivíduos monoalélicos para mutações no gene *GJB2*. A técnica de

MLPA se apresentou como um método bastante interessante para investigação dessas alterações na região DFNB1 onde estão os genes *GJB2* e *GJB6*. Esse método tem sido utilizado no estudo de outras doenças genéticas envolvendo deleções/inserções, duplicações e inversões gênicas.

No presente trabalho, a técnica de MLPA, apresentou resultados do rastreamento da mutação 35delG (43 heterozigotos) e das deleções já descritas no gene *GJB6*, concordantes com os obtidos previamente por outras técnicas de análises.

No indivíduo 40, heterozigoto composto 35delG/del(*GJB6*-D13S1830), observou-se uma redução na amplificação das sondas *GJB6*Ex1, *GJB6*Ex1B, *GJB6*Ex2 e *GJB6*Ex3A por meio da técnica de MLPA. Essa redução é causada pela presença da deleção del(*GJB6*-D13S1830) em um dos alelos que elimina a região de hibridização dessas sondas. Além disso, ocorreu a amplificação da sonda 35delG, indicando a presença da mutação no mesmo indivíduo. Não houve nenhuma amplificação dessas mesmas sondas no caso controle homozigoto para a deleção del(*GJB6*-D13S1830), resultado já esperado já que nesse caso as duas cópias da região onde as sondas se hibridizam não estão presentes.

O resultado do MLPA foi também concordante com os resultados obtidos do rastreamento da mutação *IVS1*+1G>A no gene *GJB2*, presente nos indivíduos 6 e 42. A sonda *IVS1*+1G>A foi amplificada, assim como também a sonda 35delG, nos dois casos, ambos heterozigotos compostos 35delG/*IVS1*+1G>A.

Com esses resultados, a técnica de MLPA demonstrou alta especificidade e alta sensibilidade para a detecção dessas mutações estudadas. Além disso, pela técnica de MLPA foram encontradas duas outras alterações ainda não descritas.

No indivíduo 10, que apresenta a mutação K168R em heterozigose, pôde-se observar alterações em algumas das sondas utilizadas (*GJB2*E1 e *GJB2*E1B) no experimento da técnica de MLPA, que pode indicar uma deleção nessa região, também em heterozigose. O resultado do MLPA foi repetido para se ter certeza da redução, pois poderia ter ocorrido um anelamento imperfeito entre sonda e seqüência alvo no DNA, produzindo um resultado falso positivo.

Contudo, o resultado foi confirmado. O fabricante alerta sobre a possibilidade de ocorrer alguma mutação de ponto na região de hibridização de maneira que a ligação entre a sonda e o fragmento (DNA alvo) não se dê com total homologia, sendo assim, é necessário refinar o estudo, realizando o mapeamento dessa região envolvida. A região onde estão localizadas as sondas *GJB2E1* e *GJB2E1B*, trata-se de uma região não codificante do gene, provavelmente região promotora e que ainda não foi seqüenciada nesse paciente. Diante disso, será necessário um estudo mais aprofundado utilizando-se microssatélites para se estabelecer os pontos de quebra, se é que eles existem.

Por outro lado, no indivíduo 37, heterozigoto para a mutação 35delG, foi observado pela técnica de MLPA, um aumento da amplificação das sondas *GJB2EB* e *GJB2E1C*. Essas sondas estão localizadas próximas às sondas que apareceram alteradas no paciente 10, ou seja, também na região não codificante do gene, sendo que uma das sondas é comum para ambos os casos. Esse achado pode indicar um aumento no número de cópias dessa região. Pretende-se ampliar o estudo, utilizando-se microssatélites ou outras técnicas para se determinar exatamente a seqüência duplicada e qual seria o seu efeito na transcrição e/ou tradução da proteína.

Utilizando a técnica de MLPA não foi detectada nenhuma alteração no gene *GJB3* em todas as amostras estudadas. Alterações nesse gene parecem não serem freqüentes como causa de perda auditiva sensorineural não-sindrômica (Alexandrino *et al.*, 2004).

A técnica de MLPA permite a análise simultânea de vários genes e demonstrou ser um bom método de rastreamento de alterações associadas às sondas utilizadas no kit. Contudo, é necessário ainda a confirmação dos achados utilizando seqüenciamento automático ou outras técnicas freqüentemente utilizadas para diagnóstico em laboratório de biologia molecular. A presente técnica se encontra em validação, não sendo portanto indicada pelos idealizadores como suficiente para diagnóstico genético, mas sim como sendo uma técnica de rastreamento. Além disso, o kit para detecção de alterações associadas à surdez genética, disponível pelos fabricantes, detecta alterações já conhecidas. Seria interessante o desenvolvimento de novas

sondas em outras regiões importantes a serem estudadas, principalmente para rastreamento de deleções possivelmente presentes em indivíduos monoalélicos DFNB1.

Esse trabalho apresenta resultados interessantes no estudo de indivíduos monoalélicos para mutações no gene *GJB2*, indicando achados que podem ser inéditos nessa área de estudo. Foram resolvidos aproximadamente 30% dos casos estudados contribuindo para um aconselhamento genético e prognóstico mais preciso. Além disso, os resultados demonstraram a grande heterogeneidade da perda auditiva de causa genética e a necessidade de se investigar outras alterações nos indivíduos heterozigotos para mutações no gene *GJB2*.

CONCLUSÕES

1 – Foi possível explicar a causa da surdez em aproximadamente 27% dos 45 indivíduos estudados, nos quais foram encontradas alterações no outro alelo na região DFNB1.

2 – A mutação *IVS1+1G>A* no sítio de *splice* doador do intron 1 foi encontrada em dois indivíduos estudados. Apesar desses achados, essa alteração parece ser rara em nosso meio. A alteração não foi observada em nenhuma amostra de 142 indivíduos com surdez sensorineural de etiologia não esclarecida e com ausência de mutações no gene *GJB2*.

3 – A técnica de MLPA se mostrou eficiente no rastreamento das alterações 35delG e *IVS1+1G>A*, assim como da deleção Del(GJB6-D13S1830).

4 – Foram observadas duas alterações pela técnica de MLPA em dois indivíduos estudados em sondas localizadas em região não codificante do gene *GJB2*.

5 – Para confirmação das possíveis alterações ainda não descritas, encontradas por meio da técnica de MLPA nos indivíduos 10 e 37, será necessário o mapeamento das regiões envolvidas. Entretanto, tais resultados poderão trazer informações de extrema importância no estudo de indivíduos monoalélicos para alterações na região DFNB1, assim como para os estudos funcionais dos genes *GJB2* e *GJB6*.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABE, S.; USAMI, S.; SHINKAWA, H.; KELLEY, P.M.; KIMBERLING, W.J. Prevalent connexin 26 gene (GJB2) mutations in Japanese. **J Med. Genet.** **37**: 41-43, 2000
- AHMAD, S.; CHEN, S.; SUN, J.; LIN, X. Connexins 26 and 30 are co-assembled to form gap junctions in the cochlea of mice. **Biochem Biophys Res Commun.** **Jul 25 307(2)**: 362-8, 2003.
- ALBERTS, B.; BRAY, D.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WATSON, J.D. Molecular biology of the cell. Barcelona, **Ediciones Omega S.A.**, 1998.
- ALEXANDRINO, F.; OLIVEIRA, C.A.; REIS, F.C.; MACIEL-GUERRA, A.T.; SARTORATO, E.L. Screening for mutations in the GJB3 gene in Brazilian patients with nonsyndromic deafness. **J Appl Genet** **45(2)**: 249-54, 2004.
- BICEGO, M.; BELTRAMELLO, M.; MELCHIONDA, S.; CARELLA, M.; PIAZZA, V.; ZELANTE, L.; BUKAUSKAS, F.F; ARSLAN, E.; CAMA, E.; PANTANO, S.; BRUZZONE, R.; D'ANDREA, P.; MAMMANO, F. Pathogenetic role of the deafness-related M34T mutation of Cx26. **Hum Mol Genet** **15**: 2569-2587, 2006.
- CHAPCHAP, M.K. Potencial evocado auditivo de tronco cerebral (PEATC) e das emissões otoacústicas evocadas (EOAE) em unidade neonatal. In: ANDRADE, C.R.F. organizadora. Fonoaudiologia em berçário normal e de risco. São Paulo: LOVISE, p. 169-199, 1996.
- CHENG, X.; LI L.; BRASHEARS, S.; MORLET, T.; NG, S.S.; BERLIN, C.; HOOD, L.; KEATS, B. Connexin 26 variants and auditory neuropath/ Dys-Synchrony among children in schools for the deaf. **Am J Med Genet** **139A**:13-18, 2005.
- COHN, E.S.; KELLEY, P.M.; FOWLER, T.W.; GORGA, M.P.; LEFKOWITZ, D.M., *et al.* Clinical studies of families with hearing loss attributable to mutations in the connexin 26 gene (*GJB2* / *DFNB1*). **Pediatrics** **(103)**: 546- 550, 1999.
- COMMON, J.E.A.; BITNER-GLINDZICZ M.; O'TOOLE, E.A.; BARNES, M.R.; JENKINS, L.; FORGE, A.; KELSELL, D.P. Specific loss of connexin 26 expression in ductal sweat gland epithelium associated with the deletion mutation *del(GJB6-D13S1830)*. **Clinical and Experimental Dermatology**, **30**:688–693, 2005.
- COX, S.; KOTHIYAL, P.; DEPALMA, S.R; EBERT, J; THOMPSON, F; KENNA, M.A; SELDMAN, J.G; ARONOW, B; GREINWALD, J.H; REHM, H. An integrated approach to molecular diagnostic testing for hearing loss and related syndromes, (abstract P80), in: **6th Molecular Biology of Hearing & Deafness Conference**, Hinxton, UK, 2007

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- CRYNS, K.; ORZAN, E.; MURGIA, A.; HUYGEN, P.L.M.; MORENO, F.; DEL CASTILLO, I., *et al.* Genotype-phenotype correlation for GJB2 (connexin 26) deafness. **J. Med. Genet.** (41): 147-154, 2004.
- DAAHL, H.H.; TOBIN, S.E.; POULAKIS, Z.; RICKARDS, F.W.; XU, X.; GILLAM, L.; WILLIAMS, J.; SAUNDERS, K.; CONE-WESSON, B.; WAKE, M. The contribution of GJB2 mutations slight or mild hearing loss in Australian elementary school children. **J Med Genet** 43: 850-855, 2006.
- Dahl, E.; Manthey, D.; Chen, Y.; Schwarz, H.J.; Chang, Y.S.; Lalley, P.A.; Nicholson, B.J. & Willecke, K. Molecular cloning and functional expression of mouse connexin-30, a gap junction gene highly expressed in adult brain and skin. **J Biol Chem** 271: 17903-10, 1996.
- DEL CASTILLO, I.; MORENO-PELAYO, M. A.; DELCASTILLO, F. J.; BROWNSTEIN, Z.; MARLIN, S.; ADINA, Q.; *et al.*- Prevalence and Evolutionary origins of the del(GJB6-D13S1830) mutation in the DFNB1 locus in hearing impairment subjects: a multicenter study. **Am. F. Hum. Genet.**, 73(6): 1452-8, 2003.
- DEL CASTILLO, F.J.; DELCASTILLO, F.J.; HUTCHIN, T.; LEONARDI, E.; OLIVEIRA, C.A.; AZAHIN, H.; SIEMERING, K.R.; WEIL, D.; WUYTS, W.; AGUIRRE, L.A.; MARTIN, Y.; MORENO-PELAYO, M.A.; VILLAMAR, M.; AVRAHAM, K.B.; DAHL, H.H.; KANANN, M.; NANCE, W.E.; PETIT, C.; SMITH, R.J.; VAN CAMP, G.; SARORATO, E.L.; MURGIA, A.; MORENO, F.; DELCASTILLO, I.- A novel deletion involving the connexin 30 gene del(GJB6-D13S1854) , found in trans with mutations in the GJB2 gene (connexin 26) in subjects with DFNB1 nonsyndromic hearing impairment. **J. Med. Genet.**, 42: 588-94, 2005.
- DEININGER P.L.; BATZER M.A. Alu repeats and human diseases. **Mol Genet Metab** 67: 183-93, 1999.
- DENOYELLE, F.; WEIL, D.; MAW, M.A.; WILCOX, A.S.; LENCH, N.J.; ALLEN-POWELL, D.R.; OSBORN, A.H.; DAHL, H.H.M.; MIDDLETON, A.; HOUSEMAN, M.J.; DODÉ, C.; MARLIN, S.; BOULILA-ELGAÏED, A.; GRATI, M.; AYADI, H.; BENARAB, S.; BITOUN, P.; LINA-GRANAE, G.; GODET, J.; MUSTAPHA, M.; LOISELET, J.; EL-ZIR, É.; AUBOIS, A.; JOANNARD, A.; LEVILLIERS, J.; GARABÉDIAN, E.N.; MUELLER, R.F. Prelingual deafness: high prevalence of a 35delG mutation in the connexin 26 gene. **Hum. Mol. Genet.** 6(12):2173-77, 1997.
- DENOYELLE, F.; MARLIN, S.; WEIL, D.; MOATTI, L.; CHAUVIN, P.; GARABÉDIAN, E.N.; PETIT, C. Clinical features of the prevalent form of childhood deafness, DFNB1, due to a connexin 26 gene defect: implication for genetic counseling. **Lancet** (17): 1298- 1303, 1999.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- DI, W.L.; RUGG, E.L.; LEIGHT, I.M.; KELSELL, D.P. Multiple epidermal connexins are expressed in different keratinocyte subpopulations including connexin 31. **Invest Dermatol**, 117: 958-964, 2001.
- FORGE, A.; BECKER, D.; CASALOTTI, S.; EDWARDS, J.; MARZIANO, N.; NICKEL, R. – Connexins and gap junctions in the inner ear. **Audiol Neuro-Otol**, 7: 141-145, 2002.
- GOODENOUGH D.A; PAUL D.L. Beyond the gap: functions of unpaired connexon channels. **Nat Rev Mol Cell Biol** Apr 4(4): 285-94. Review, 2003.
- GREEN G.E.; SCOTT, D.A.; MCDONALD, J.M.; SHEFFIELD, V.C.; SMITH, R.J.H. Carrier rates in the midwestern United States of *GJB2* mutations causing inherited deafness. **JAMA** 281: 2211-2216, 1999
- GURTLER, N.; EGENTER, C.; BOSCH, N.; PLASILOVA, M. Mutation analysis of the Cx26, Cx30, and Cx31 genes in autosomal recessive nonsyndromic hearing impairment. **Acta Otolaryngol. Oct;128(10):**1056-62, 2008.
- HEREDITY HEARING LOSS HOMEPAGE. <http://webh01.ua.ac.be/hhh/> , consultado em Fevereiro de 2008.
- HIŞMI, B.O.; YILMAZ, S.T.; INCESULU, A.; TEKIN, M. Effects of GJB2 genotypes on the audiological phenotype: variability is present for all genotypes. **Int J Pediatr Otorhinolaryngol** 70(10): 1687-94, 2006.
- JOINT COMMITTEE OF INFANT HEARING. Year 1994 Position Statement. **ASHA (36):** 38-41, 1994.
- JOINT COMMITTEE OF INFANT HEARING. Year 2000 Position Statement: principles and guidelines for early hearing detection and intervention programs. **Pediatrics** 106 (4): 798-817, 2000.
- KALATZIS, V. & PETIT, C. The fundamental and medical impacts of recent progress in research on hereditary hearing loss. **Hum. Mol. Genet. Rev.** 7(10):1589-97, 1998.
- KELLEY, P.M.; HARRIS, D.J.; COMER, B.C.; ASKEW, J.W.; FOWLER, T.; SMITH, S.D.; KIMBERLING, W.J. Novel mutations in the connexin 26 gene (GJB2) that cause autosomal recessive (DFNB1) hearing loss. **Am. J. Hum. Genet.** 62(4):792-99, 1998.
- KIKUCHI, T.; KIMURA, R.S.; PAUL, D.L.; ADAMS, J.C. Gap junctions in the rat cochlea: immunohistochemical and ultrastructural analysis. **Anat. Embryol. (Berl.)** 191(2):101-18, 1995.
- KIKUCHI, T.; ADAMS, J.C.; MIYABE, Y.; SO E.; KOBAYASHI T. Potassium ion recycling pathway via gap junction systems in the mammalian cochlea and its

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- interruption in hereditary nonsyndromic deafness. **Med Electron Microsc.** **33(2):**51-6, 2000.
- KRUTOVSKIKH, V.; YAMASAKI, H. Connexin gene mutations in human genetic diseases. **Mutat Res. Apr;** **462(2-3):** 197-207. Review, 2000.
- LAUTERMANN, J.; FRANK, TEN CATE, W.J.; ALTENHOFF, P.; GRUMMER, R.; TRAUB, O., et al. Expression of the gap-junction connexins 26 and 30 in the rat cochlea. **Cell Tissue Res** **294:** 415-420, 1998.
- LIU, X.Z.; XIA, X.J.; XU, L.R.; PADYA, A; LIANG, C.Y.; BLANTON, S.H.; BROWN, S.D.M.; SEES, K.P.; NANCE, W.E. Mutation in connexin31 underlie recessive as well as dominant non-syndromic hearing loss. **Hum Mol Genet** **9:** 63-67, 2000.
- DE NOBREGA M.; WECKX L.L.; JULIANO Y. Study of the hearing loss in children and adolescents, comparing the periods of 1990-1994 and 1994-2000. **Int J Pediatr Otorhinolaryngol.** **69(6):**829-38, 2005.
- MARTIN, P.E.M.; COLEMAN, S.L.; CASALOTTI, S.O.; FORGE, A.; EVANS, W.H. - Properties of connexin 26 gap junctional proteins derived from mutations associated with non-syndromal hereditary deafness. **Hum. Mol. Genet.**, **8(13):**2369-76, 1999.
- MORELL, R. J.; KIM, H.J.; HOOD, L.J.; GOFORTH, L.; FRIDERICI, K.; FISHER, R. et al. Mutations in the connexin 26 gene (GJB2) among Askenazi Jews with nonsyndromic recessive deafness. **N Engl J Med**, **339(21):** 1500-1505, 1998.
- OKOU, D.T.; STEINBERG, K.M.; MIDDLE, C.; CUTLER, D.J.; ALBERT, T.J.; ZWICK, M.E.; Microarray-based genomic selection for high-throughput resequencing. **Nature Methods** **4** 907-909, 2007.
- OLIVEIRA, C.A.; CASTRO, S. C. P.; MACIEL-GUERRA, A. T.; SARTORATO, E. L. Report of two siblings with progressive sensorineural hearing loss bearing V37I/V95M mutations in the connexin 26 gene (GJB2). **The Braz. J. Dysmorph. Speech Hear. Disord., Bauru, São Paulo, Brazil (2) n. 3:** 15-18, 1999.
- OLIVEIRA, C.A.; ALEXANDRINO, F.; SANDES, K.A.; SILVA, W.A.; MACIEL-GUERRA, A. T.; MAGNA, L. A.; SARTORATO, E. L. Frequency of the 35delG mutation in the GJB2 gene in samples of European, Asian and African Brazilians. **Human Biology, Detroit (76) n. 2:** 313-316, 2004.
- OLIVEIRA, C.A.; ALEXANDRINO, F.; CHRISTIANI, T.V.; STEINER, C.E; CUNHA, J.L.; GUERRA, A.T.; SARTORATO, E.L. Molecular genetics study of deafness in Brazil: 8-year experience. **Am J Med Genet A.:** **143(14):**1574-9, 2007.
- OLIVEIRA, C.A; PIMPINATI, C.J.; ALEXANDRINO, F.; MAGNA, L.A.; MACIEL-GUERRA, A.T.; SARTORATO, E.L. Allelic frequencies of the 35delG mutation of the GJB2 gene in different Brazilian regions. **Genet Test.** **11(1):**1-3, 2007.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- OSHIMA, A.; DOI, T.; MITSUOKA, K.; MAEDA, S.; FUJIYOSHI, Y. Roles of Met-34, Cys-64, and Arg-75 in the assembly of human connexin 26. Implication for key amino acid residues for channel formation and function. **J Biol Chem.** Jan 17;278(3):1807-16, 2003.
- PARK, H.; HOUN HAHN, S.; CHUN, Y.; PARK, K.; KIM, H. Connexin 26 mutations associated with non-syndromic hearing loss. *Laryngoscope*, 110(9):1535-1538, 2000.
- PARKER, M.J.; FORTNUM, H.; YOUNG, I.D.; DAVIS, A.C. Variations in genetic assessment and recurrence risks quoted for childhood deafness: a survey of clinical geneticists. **J Med Genet.** Feb;36(2):125-30, 1999.
- PARVING A, HAUCH AM. The causes of profound hearing impairment in a school for the deaf--a longitudinal study. **Br J Audiol.** Apr;28(2): 63-9 1994.
- PIATTO, V.B.; BERTOLLO, E.M.G.; SARTORATO, E.L.; MANIGLIA, J.V. Prevalence of the *GJB2* mutations and the del(*GJB6*-d13s1830) mutation in Brazilian patients with deafness. **Hearing Research:** 196: 87-93, 2004.
- POLLAK, A.; SKÓRKA, A.; MUELLER-MALESINSKA, M.; KOSTRZEWA, G.; KISIEL, B.; WALIGÓRA, J.; KRAJEWSKI, P.; OLDAK, M.; KORNISZEWSKI, H.; PLOSKI, R. M34T and V37I mutations in *GJB2* associated hearing impairment: Evidence for pathogenicity and reduced penetrance. **Am J Med Genet A.** 143A: 2534-2543, 2007.
- RABIONET, R.; ZELANTE, L.; LOPEZ-BIGAS, N.; D'AGRUMA, L.; MELCHIONDA, S.; RESTAGNO, G.; ARBONES, M.L.; GASPARINI, P.; ESTIVILL, X. Molecular basis of childhood deafness resulting from mutations in the *GJB2* (connexin 26) gene. **Hum Genet.** Jan;106(1):40-4, 2000.
- RICHARD, G.; BROWN, N.; SMITH, L.E. et al; The spectrum of mutations in erythrokeratodermis--novel and de novo mutations in *GJB3*. **Hum Genet** 106: 321-329, 2000.
- SAMANICH, J.; LOWES, C.; BURK, R.; SHANSKE, S.; LU, J.; SHANSKE, A.; MORROW, B.E. Mutations in *GJB2*, *GJB6*, and mitochondrial DNA are rare in African American and Caribbean Hispanic individuals with hearing impairment. **Am J Med Genet A.** Apr 15;143A(8): 830-8, 2007.
- SANTOS, R.L.; AULCHENKO, Y.S.; HUYGEN, P.L.; VAN DER DONK, K.P.; WIJS, I.J.; KEMPERMAN, M.H.; ADMIRAAL, R.J.C.; KREMER, H.; HOEFSLOOT, L.H.; CREMERS, C.W.R.J. Hearing impairment in Dutch patients with connexin 26 (*GJB2*) and connexin 30 (*GJB6*) mutations. **Int J Pediatr Otorhinolaryngol** 69 (2): 165-174 2005.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- SARTORATO, E.L.; GOTTARDI, E.; OLIVEIRA, C.A.; MAGNA, L.A.; ANNICHINO-BIZZACHI, J.M.; SEIXAS, C.A.; MACIEL-GUERRA, A.T. Determination of carrier frequency of the 35delG mutation in Brazilian neonates. **Clinical Genetics**. **58(4)**:339, 2000.
- SEEMAN, P.; SAKMARYOVA, I.; High prevalence of the IVS a + 1G to A/*GJB2* mutation among Czech hearing impaired patients with monoallelic mutation in the coding region of *GJB2*. **Clinical Genetics** **69**: 410-413, 2006.
- SHAHIN, H.; WALSH, T.; SOBE, T.; LYNCH, E.; KING, M.C.; AVRAHAM, K.B.; KANAAN, M.. Genetics of congenital deafness in the Palestinian population: multiple connexin 26 alleles with shared origins in the Middle East. **Hum Genet** **110**: 284-289, 2002.
- SIMÕES, A.M. & MACIEL-GUERRA, A.T. A surdez evitável: predominância de fatores ambientais na etiologia da surdez neurossensorial profunda. **Jornal de Pediatria**. **68**:254-257, 1992.
- SNOECKX, R.L.; HUYGEN, P.L.M.; FELDMANN, D.; ET AL. *GJB2* Mutations and Degree of Hearing Loss: A Multicenter Study. **Am. J. Hum. Genet.** **77**:945–957, 2005.
- STEEL, K.P. Genetic deafness: a step closer. **Pediatrics**. **Mar**;103(3): 674, 1999.
- SUN, J.; AHMAD, S.; CHEN, S.; TANG, W.; ZHANG, Y.; CHEN, P.; LIN, X. Cochlear gap junctions coassembled from Cx26 and 30 show faster intercellular Ca²⁺ signaling than homomeric counterparts. **Am J Physiol Cell Physiol**. **Mar**;288(3): C613-23, 2005.
- TANG, H.Y.; FANG, P.; WARD, P.A.; SCHMITT, E.; DARILEK, S.; MANOLIDIS, S.; OGHALAI, J.S.; ROA, B.B.; ALFORD, R.L. DNA sequence analysis of *GJB2*, encoding connexin 26: observations from a population of hearing impaired cases and variable carrier rates, complex genotypes, and ethnic stratification of alleles among controls. **Am J Med Genet A**. **15**;140(22):2401-15, 2006.
- TAYLOR, C.F.; CHARLTON, R.S.; BURN, J.; SHERIDAN, E.; TAYLOR, G.R. Genomic deletions in *MSH2* or *MLH1* are a frequent cause of hereditary non-polyposis colorectal cancer: identification of novel and recurrent deletions by MLPA. **Hum Mutat** **22**: 428-33, 2003.
- THÖNNISSEN, E.; RABIONET, R.; ARBONÈS, M.L.; ESTIVILL, X.; WILLECKE, K.; OTT, T. Human connexin26 (*GJB2*) deafness mutations affect the function of gap junction channels at different levels of protein expression. **Hum Genet**. **Aug**;111(2): 190-7, 2002.
- VAN LAER, L.; COUCKE, P.; MUELLER, R.F.; CAETHOVEN, G.; FLOTHMANN, K.; PRASAD, S.D.; CHAMBERLIN, G.P.; HOUSEMAN, M.; TAYLOR, G.R.; VAN

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- DE HEYNING, C.M.; FRANSEN, E.; ROWLAND, J.; CUCCI, R.A.; SMITH, R.J.; VAN CAMP, G. A common founder for the 35delG GJB2 gene mutation in connexin 26 hearing impairment. **J Med Genet.** Aug;**38(8)**: 515-8, 2001.
- WILCH, E.; ZHU, M.; BURKHART, K.B.; REGIER, M.; ELFENBEIN, J.L.; FISHER, R.A.; FRIDERICI, K.H. Expression of *GJB2* and *GJB6* is reduced in a novel *DFNB1* allele. **The American Journal of Human Genetics** **79**: 174-179, 2006.
- WILCOX, S.A.; SAUNDERS, K.; OSBORN, A.H.; ARNOLD, A.; WUNDERLICH, J.; KELLY, T.; COLLINS, V.; WILCOX, L.J.; MCKINLAY GARDNER, R.J.; KAMARINOS, M.; CONE-WESSON, B.; WILLIAMSON, R.; DAHL, H.H. High Frequency Hearing Loss Correlated with mutations in the GJB2 Gene. **Hum. Genet.** **106**: 399-405, 2000.
- WILLECKE, K.; EIBERGER, J.; DEGEN, J.; ECKARDT, D.; ROMUALDI, A.; GULDENAGEL, M.; et al. Structural and functional diversity of connexin genes in the mouse and human genome. **Biol Chem**, 383: 725-737, 2002.
- XIA, J.H.; LIU, C.Y.; TANG, B.S. ET AL Mutations in the gene encoding gap junction protein beta-3 associated with autosomal dominant hearing impairment. **Nature Genet** **20**: 370-373, 1998.
- XIA, A.; KATORI, Y.; OSHIMA, T.; WATANABE, K.; KIKUCHI, T.; IKEDA, K. Expression of connexin 30 in the developing mouse cochlea. **Brain Res. Apr** **20;898(2)**:364-7, 2001.

ANEXO



FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

www.fcm.unicamp.br/pesquisa/etica/index.html

CEP, 18/12/07.
(PARECER CEP: Nº 396/2006)

PARECER

I-IDENTIFICAÇÃO:

PROJETO: “ESTUDO MOLECULAR DA PERDA AUDITIVA”.

PESQUISADOR RESPONSÁVEL: Edi Lúcia Sartoro

II - PARECER DO CEP

O Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP tomou ciência e aprovou o Adendo que inclui os projetos intitulados “ESTUDO DE GENES MODULADORES ASSOCIADOS A MUTAÇÕES EM GENES MITOCONDRIAIS EM INDIVÍDUOS COM SURDEZ NÃO-SINDRÔMICA”, com a finalidade de mestrado, sob responsabilidade de Vanessa Cristine Sousa de Moraes e “ESTUDO MOLECULAR EM INDIVÍDUOS COM SURDEZ NEUROSENSORIAL NÃO-SINDRÔMICA MONOALÉLICOS PARA O LOCUS DFNBI”, com a finalidade de mestrado, sob responsabilidade de Sueli Matilde da Silva Costa, referente ao protocolo de pesquisa supracitado.

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

Homologado na XII Reunião Ordinária do CEP/FCM, em 18 de dezembro de 2007.


Profa. Dra. Carmen Sílvia Bertuzzo
PRESIDENTE DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA
FCM / UNICAMP

Comitê de Ética em Pesquisa - UNICAMP
Rua: Tessália Vieira de Camargo, 126
Caixa Postal 6111
13084-971 Campinas - SP

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