

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

INSTITUTO DE BIOLOGIA



Vanessa Cristine Sousa de Moraes

“Estudos de genes moduladores associados a mutações em genes mitocondriais em indivíduos com surdez não-sindrômica”

Este exemplar corresponde à redação final da tese defendida pelo(a) candidato (a)
VANESSA CRISTINE SOUSA DE MORAES
Edi Lúcia Sartorato
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: Profª. Dra. Edi Lúcia Sartorato

Campinas, 2009

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA – UNICAMP

D399e

De Moraes, Vanessa Cristine Sousa

Estudo de genes nucleares moduladores associados a mutações em genes mitocondriais em indivíduos com surdez-sindrômica / Vanessa Cristine Sousa de Moraes. – Campinas, SP: [s.n.], 2009.

Orientadora: Edi Lúcia Sartorato.

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

1. Perda auditiva. 2. DNA mitocondrial. 3. Gene nuclear modulador. I. Sartorato, Edi Lúcia. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.

(scs/ib)

Título em inglês: Study of modulators genes associated to mutations in mitochondrial genes in individuals with non-syndromic deafness.

Palavras-chave em inglês: Hearing loss; Mitochondrial DNA; Nuclear modifier gene.

Área de concentração: Genética Animal e Evolução.

Titulação: Mestre em Genética e Biologia Molecular.

Banca examinadora: Edi Lúcia Sartorato, Mônica Barbosa de Melo, Manoel da Nóbrega, Rui Fernando Pilotto, Cláudia Vianna Maurer-Morelli.

Data da defesa: 20/02/2009.


Programa de Pós-Graduação: Genética e Biologia Molecular.

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

Campinas, 20 de fevereiro de 2009.

BANCA EXAMINADORA


Profa. Dra. Edi Lúcia Sartorato


Assinatura

Profa. Dra. Mônica Barbosa de Melo


Assinatura

Prof. Dr. Manoel de Nóbrega


Assinatura

Prof. Dr. Rui Fernando Pilotto

Assinatura

Profa. Dra. Cláudia V Maurer-Morelli

Assinatura

“Se eu vi mais longe, foi por
estar de pé sobre ombros de gigantes”.

Isaac Newton

Para minha mãe.

AGRADECIMENTOS

À Dra. Edi Lúcia Sartorato, pela orientação e dedicação, pela enorme paciência que teve comigo durante esses anos e principalmente pela grande amizade que foi fundamental para minha vida e que jamais será esquecida.

A minha mãe Virgínia pelo enorme apoio dado durante todos esses anos de minha vida. Sem ela nada seria possível.

Ao meu pai que, mesmo longe, sempre esteve por perto.

À Dra. e amiga Fabiana Alexandrino que sempre fez questão de me ajudar nos momentos mais difíceis, obrigada por ter me ensinado diversas técnicas no laboratório, agradeço também pelas inúmeras conversas, risadas, pelos inúmeros puxões de orelha, pelas coxinhas, enfim, pela imensa amizade que cultivamos ao longo desses anos.

À Dra. e amiga Fernanda Reis (D.D.) pela cumplicidade, companheirismo, respeito, por acreditar em meu potencial, pelas conversas tão polêmicas que sempre se fizeram presentes e pela alegria contagiante.

À minha grande amiga Gisely que esteve do meu lado esse tempo todo, agradeço por sua cumplicidade, pelo seu bom humor fora do normal, por sua constante preocupação comigo, pelo apoio e também pela paciência.

Ao meu irmão Arizinho pelos conselhos, pela confiança e por me fazer bem a todo momento.

À minha amiga Sueli Costa pela cumplicidade durante esses dois anos de mestrado, por seu respeito, amizade, e não poderia deixar de citar aqui, pelas caminhadas divertidas.

À minha amiga Bruna Martins que sempre soube de tudo da minha vida, obrigada pela amizade e por me ajudar tão prontamente sempre que preciso.

Ao meu amigo Paulo Maurício pela amizade, bom humor e por fazer parte da minha vida há 8 anos.

Aos amigos do laboratório que de alguma forma me ajudaram nesses 2 anos de mestrado: Fer 2, Fer 3, Paula, Jéssica, Zelo (abelha), Creyto (índio), Diego (didi), Carol (ácaro), Mara, Reginaldo, Flávia (flor), Flávia Elfo, Milena, Nathália (graviola), Vanessa 2, Gleice...

À Dra. Maricilda Palandi, por quem tenho grande apreço e admiração, pelas conversas descontraídas e pelos conselhos.

Aos funcionários do CBMEG: Madá, Sandra e Tânia.

Ao Dr. Márcio, por permitir o uso do seqüenciador automático, fundamental para este trabalho.

Aos indivíduos, enfermeiros, médicos, fonoaudiólogos e estudantes envolvidos nesta pesquisa.

Aos professores participantes da qualificação, pré-banca e banca, pela grande contribuição.

Às agências financiadoras CAPES, FAPESP e CNPq.

SUMÁRIO

Lista de tabelas.....	xix
Lista de figuras.....	xxi
Lista de abreviaturas e símbolos.....	xxix
Resumo.....	xxxii
Abstract.....	xxxxv
Introdução.....	39
1. Aspectos gerais da perda auditiva.....	41
1.1. Ototoxicidade dos aminoglicosídeos.....	43
2. Aspectos genéticos da perda auditiva.....	46
2.1. O gene <i>GJB2</i>	46
2.1.2. A mutação 35delG.....	51
2.2. Deleções envolvendo o gene <i>GJB6</i> (conexina 30).....	51
2.3. As mutações mitocondriais e a perda auditiva.....	52
2.3.1. Mutação mitocondrial A1555G.....	54
2.3.2. Mutação mitocondrial C1494T.....	55
2.3.3. Mutação mitocondrial A827G.....	55
2.4. Genes nucleares moduladores.....	56
2.4.1. Gene <i>TRMU</i>	57
2.4.2. Gene <i>MTO1</i>	59
Objetivos.....	61
1. Geral.....	63
2. Específicos.....	63
Casuística e Métodos.....	65
A – Casuística.....	67
B – Métodos.....	68
1. Extração do DNA genômico de sangue periférico.....	68
2. Detecção da mutação 35delG no gene <i>GJB2</i>	68
3. Rastreamento de mutações no gene <i>GJB2</i>	68

4. Detecção das deleções $\Delta(GJB6-D13S1830)$ e $\Delta(GJB6-D13S1854)$	70
5. Rastreamento de mutações em genes mitocondriais.....	70
5.1. Mutação A1555G no gene <i>12S rRNA</i>	70
5.2. Mutação C1494T no gene <i>12S rRNA</i>	72
5.3. Mutação A827G no gene <i>12S rRNA</i>	73
6. Análise de genes moduladores.....	73
6.1. Mutação G28T no gene modulador <i>TRMU</i>	73
6.2. Análise do gene <i>MTO1</i>	73
6.2.1. Rastreamento de mutações por DHPLC.....	74
7. Seqüenciamento.....	75
7.1. Purificação dos produtos de PCR.....	75
7.2. Reação de seqüenciamento automático para produto de PCR.....	75
7.3. Análise das seqüências obtidas.....	77
Resultados.....	79
1. Mutação 35delG no gene <i>GJB2</i>	91
2. Detecção das deleções $\Delta(GJB6-D13S1830)$ e $\Delta(GJB6-D13S1854)$..	92
3. Rastreamento de Mutações no Gene <i>GJB2</i>	93
3.1. Polimorfismo V27I.....	94
3.2. Mutação V37I.....	95
4. Rastreamento de mutações mitocondriais.....	96
4.1. Mutação Mitocondrial A1555G.....	96
4.2. Mutação Mitocondrial C1494T no gene <i>12S rRNA</i>	97
4.3. Mutação Mitocondrial A827G no gene <i>12S rRNA</i>	98
5. Estudo em genes moduladores nucleares.....	99
5.1. Mutação G28T no gene nuclear <i>TRMU</i>	99
5.2. Rastreamento de mutações no gene nuclear <i>MTO1</i>	100
5.2.1. Resultados do rastreamento de mutações pela técnica de DHPLC.....	100
5.2.2. Alterações observadas no seqüenciamento.....	105

Discussão.....	111
Conclusões.....	121
ANEXO 1 – Parecer Comitê de Ética UNICAMP.....	125
ANEXO 2 – Critérios de Inclusão – CBPAI.....	129
ANEXO 3 – Lista de Antibióticos.....	133
Referências Bibliográficas.....	139
Nota do autor.....	147

Lista de Tabelas

Tabela 1 – Seqüência de <i>primers</i> para a amplificação do gene <i>GJB2</i>	68
Tabela 2 – Seqüência de <i>primers</i> utilizadas para amplificação da região do gene 12SrRNA.....	71
Tabela 3 – Seqüência de <i>primers</i> para a amplificação da região do gene 12S rRNA.....	72
Tabela 4 – Grupo A – Recém-nascidos de alto-risco, com perda auditiva.....	83
Tabela 5 – Grupo B – Recém-nascidos de alto-risco, sem perda auditiva.....	85
Tabela 6 – Grupo C - Pacientes nascidos a termo, com perda auditiva.....	87
Tabela 7 – Grupo D - Indivíduos adultos com surdez e positivos para mutação A1555G.....	89
Tabela 8 – Resultado referente ao gene nuclear <i>MTO1</i>	109

Lista de Figuras

- Figura 1** – Ilustração da orelha externa, média e interna. (1): orelha externa; (2): orelha média; (3): orelha interna.....41
- Figura 2** – Cóclea, órgão da orelha interna responsável pela audição.....43
- Figura 3** – Aminoglicosídeo ligado à subunidade 16S *rRNA* da bactéria.....44
- Figura 4** – **A:** Estrutura conformacional do sítio A do gene bacteriano 16S *rRNA*; **B:** Estrutura conformacional do sítio A do gene mitocondrial 12S *rRNA* humano; **C:** Estrutura conformacional do sítio A do gene mitocondrial 12S *rRNA* humano com a mutação A1555G. Observa-se o aumento de similaridade entre **A** e **C**.....45
- Figura 5** – Canais intercelulares responsáveis pela comunicação intercelular.....47
- Figura 6** – Tipos de canais intercelulares, decorrentes da combinação de diferentes proteínas conexas.....48
- Figura 7** – Microscopia eletrônica de varredura da disposição dos estereocílios na superfície das células ciladas.....49
- Figura 8** – Ilustração do processo de reciclagem de potássio na orelha interna...50
- Figura 9** – Esquema mostrando o DNA mitocondrial.....53
- Figura 10** – Localização das mutações A1555G e C1494T. **(A)** Sítio A no gene 16S *rRNA* de *E.coli*; **(B)** Região correspondente no gene 12S *rRNA* em humanos; **(C)** Mutante A1555G; **(D)** Mutante C1494T...54

Figura 11 – Modificação do tRNA pelo gene <i>TRMU</i>	58
Figura 12 – Síntese de proteínas, mostrando os sítios de ligação no ribossomo dos tRNA hipermodificados.....	59
Figura 13 – Condições utilizadas para a amplificação do gene <i>GJB2</i>	69
Figura 14 – Ciclos utilizados no seqüenciamento do gene <i>GJB2</i>	76
Figura 15 – 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.....	91
Figura 16 – Resultado da técnica de PCR para detecção das deleções $\Delta(GJB6-D13S1830)$ e $\Delta(GJB6-D13S1854)$. (L) marcador <i>ladder</i> 100pb Gibco BRL®; (1) indivíduo normal; (2) $\Delta(GJB6-D13S1830)/N$; (3) $\Delta(GJB6-D13S1830)/\Delta(GJB6-D13S1830)$; (4) e (5) $\Delta(GJB6-D13S1854)/N$	92
Figura 17 – Gel e agarose mostrando os dois fragmentos do gene <i>GJB2</i> amplificados pela técnica de PCR. (L) <i>Ladder</i> de 1KB GIBCO BRL®; (1) fragmento de 332 pb; (2) fragmento de 547 pb.....	93
Figura 18 – Eletroferograma demonstrando um indivíduo heterozigoto para o polimorfismo V27I.....	94
Figura 19 – Eletroferograma mostrando a mutação V37I no indivíduo 2 do grupo B.....	95

- Figura 20** – Resultado da digestão dos fragmentos contendo a região A1555G no gene *12S rRNA* com a enzima *Bsm*I. (1) Fragmento sem digerir; (2) Indivíduo normal; (3) Indivíduo portador da mutação A1555G. L: *Ladder* marcador 1Kb *Plus*.....96
- Figura 21** – Fragmentos da digestão da subunidade *12S rRNA* com a enzima *Hph*I, em gel de agarose 1,5%, corado com brometo de etídeo. (A) ladder de 1KB GIBCO BRL®; (1) - fragmento digerido (pacientes sem a mutação C1494T). (2) – fragmento digerido. Paciente controle positivo para a mutação C1494T.....97
- Figura 22** – Eletroferograma mostrando a mutação pontual A827G. (A) Indivíduo com a mutação A827G; (B) Indivíduo com seqüência normal.....98
- Figura 23** – Gel de agarose apresentando o resultado da digestão do fragmento de 467pb com a enzima *Bsp*1286 I. (M) - Indivíduo heterozigoto para a mutação G28T, apresentando os fragmentos 467, 336 e 131pb; (N) - Indivíduo homozigoto normal.....99
- Figura 24** – Resultado da cromatografia obtida pela técnica de DHPLC na corrida do exon 5 na temperatura de 56,1°C.....100
- Figura 25** – Resultado da cromatografia obtida pela técnica de DHPLC na corrida do exon 5 na temperatura de 56,1°C, mostrando os dois padrões diferentes nos indivíduos (B9-indivíduo 9 do grupo D e C10-indivíduo 6 do grupo D).....101

- Figura 26** – Resultado da cromatografia obtida pela técnica de DHPLC na corrida do exon 5 na temperatura de 58°C, mostrando os três padrões diferentes nos indivíduos B9 (indivíduo 9 do grupo D), B10 (indivíduo 10 do grupo D) e B11 (indivíduo 3 do grupo D).....102
- Figura 27** – Resultado da cromatografia obtida pela técnica de DHPLC na corrida do exon 07 na temperatura de 56.2°C, mostrando os dois padrões diferentes nos indivíduos C9 (indivíduo 01 do grupo D), C10 (indivíduo 05 do grupo D).....103
- Figura 28** – Resultado da cromatografia obtida pela técnica de DHPLC na corrida do exon 11 na temperatura de 55.9°C, mostrando os dois padrões diferentes nos indivíduos D6 (indivíduo 09 do grupo D), D7 (indivíduo 10 do grupo C).....104
- Figura 29** – Eletroferograma do SNP rs7766570 mostrando um indivíduo homozigoto para essa alteração.....105
- Figura 30** – Eletroferograma do SNP rs4509087 mostrando um indivíduo heterozigoto para essa alteração.....106
- Figura 31** – Eletroferograma da alteração T/G no intron 11 mostrando um indivíduo heterozigoto para essa alteração.....107
- Figura 32** – Eletroferograma da alteração I392M no exon 06 mostrando um indivíduo homozigoto para essa alteração.....108

Lista de Abreviaturas e Símbolos

DFNA	Autosomal dominant nonsyndromic neurosensory deafness - Perda auditiva sensorineural não-sindrômica autossômica dominante
DFNB	Autosomal recessive nonsyndromic neurosensory deafness - Perda auditiva sensorineural não-sindrômica autossômica recessiva
DFN	Deafness – perda auditiva
<i>Gap junctions</i>	Junções comunicantes
PCR	Polymerase Chain Reaction (Reação em Cadeia da Polimerase)
AS-PCR	Allele specific PCR (PCR alelo-específico)
rRNA	RNA ribossômico
tRNA	RNA transportador
dB	Decibéis
del	Deleção
DNA	Ácido Desoxirribonucléico
RNA	Ácido Ribonucléico
TBE	Tris, Base, Ácido Bórico, EDTA
EDTA	Ácido Etileno Diamono Tetracético
Kb	Kilobase
g	Gram
GJB	Gap Junction Beta (Junção Comunicante Beta)
Ser	Serina
Gln	Glutamina
Lys	Lisina
mL	Mililitro
mM	Milimolar
μL	Microlitro
μg	Micrograma
Δ	Deleção
mtDNA	DNA Mitocondrial
ng	Nanograma
pb	Pares de base
DHPLC	Denaturing high-performance liquid chromatography - cromatografia líquida desnaturante de alta performance
miRNA	micro RNAs, pequenos RNAs resultantes da clivagem de um RNA maior não codificante

RESUMO

RESUMO

A perda auditiva é a mais comum das deficiências sensoriais da população em geral. A surdez congênita ocorre em cerca de 1 em cada 1000 nascidos vivos, dos quais aproximadamente 50% têm origem hereditária nos países desenvolvidos. A perda auditiva não-sindrômica pode ser causada por mutações em genes nucleares e genes mitocondriais (mtDNA). Mutações no mtDNA foram associadas ao uso de aminoglicosídeos e à surdez não-sindrômica em muitas famílias no mundo todo. No entanto, o background genético do indivíduo influencia a expressão fenotípica destas mutações patogênicas. Dessa forma, foi proposto que os genes nucleares modificadores modulam a manifestação fenotípica da mutação mitocondrial A1555G no gene *MTRNR1*. Ambos os genes nucleares modificadores *TRMU* e *MTO1* codificam uma proteína mitocondrial altamente conservada, a qual acredita-se estar envolvida na modificação do tRNA. Estudos propuseram que o *TRMU* humano, assim como o gene nuclear *MTO1* poderiam modular a manifestação fenotípica da surdez associada a mutações mitocondriais. O objetivo deste trabalho foi elucidar a contribuição de mutações mitocondriais, de mutações em genes nucleares modificadores e a exposição aos aminoglicosídeos no fenótipo da perda auditiva. Nossos achados sugerem que o background genético dos indivíduos pode desempenhar um papel importante na patogênese da surdez associada à mutação mitocondrial e ao uso de aminoglicosídeos.

ABSTRACT

ABSTRACT

Hearing loss is the most prevalent sensorial deficit in the general population. Congenital deafness occurs in about 1 in 1000 live births, of which approximately 50% has hereditary cause in development countries. Non-syndromic deafness can be caused by mutations in both nuclear and mitochondrial genes. Mutations in mtDNA have been associated with aminoglycoside-induced and non-syndromic deafness in many families worldwide. However, the nuclear background influences the phenotypic expression of these pathogenic mutations. Indeed, it has been proposed that nuclear modifier genes modulate the phenotypic manifestation of the mitochondrial A1555G mutation in the MTRNR1 gene. The both putative nuclear modifiers genes TRMU and MTO1 encoding a highly conserved mitochondrial related to tRNA modification. It has been hypothesized that human TRMU and also MTO1 nuclear genes may modulate the phenotypic manifestation of deafness-associated mitochondrial mutations. The aim of this work was to elucidate the contribution of mitochondrial mutations, nuclear modifier genes mutations and aminoglycoside exposure in the deafness phenotype. Our findings suggest that the genetic background of individuals may play an important role in the pathogenesis of deafness-associated with mitochondrial mutation and aminoglycoside-induced.

INTRODUÇÃO

INTRODUÇÃO

1. Aspectos gerais da perda auditiva

A perda auditiva é um dos distúrbios sensoriais humanos mais comuns e pode se manifestar em qualquer faixa etária podendo ocorrer devido a causas genéticas ou adquiridas, neste caso, por fatores ambientais. Com relação à localização do defeito, a surdez pode ser *condutiva*, quando afeta a orelha média ou externa, *sensorineural* (perceptiva ou neural), em que as anomalias estão situadas entre os receptores da orelha interna e as regiões auditivas do cérebro, ou ainda *mista*, quando envolvem ambos os defeitos (Figura 1).

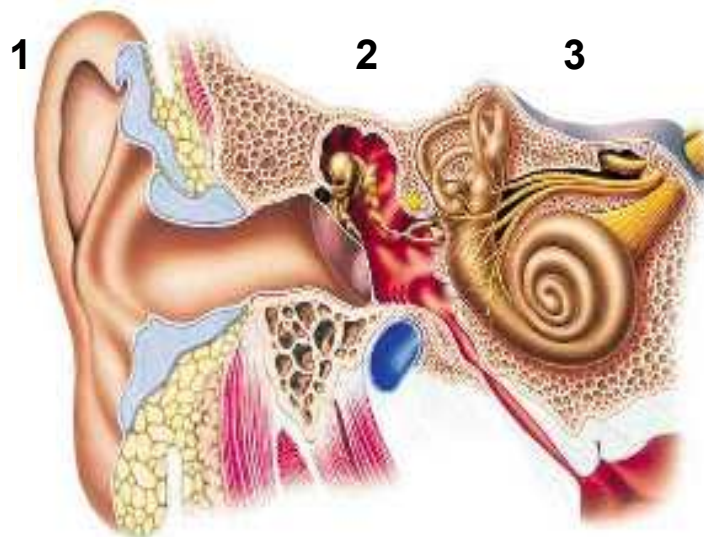


Figura 1 – Ilustração da orelha externa, média e interna. (1): orelha externa; (2): orelha média; (3): orelha interna. Modificado de <http://www.boystownhospital.org/Cochlear/Information/normal.asp>

No Brasil, a prevalência da surdez é estimada em 2 a 7 a cada 1000 crianças, dependendo da região, sendo a maioria dos casos devido a fatores ambientais, assim como infecções congênitas (principalmente a rubéola),

meningite, toco-traumatismo, complicações perinatais e uso de drogas ototóxicas durante a gestação (Russo, 2000). O estudo realizado em 2005 por De Nobrega e colaboradores mostrou que dentre as principais etiologias da perda auditiva, a rubéola foi a que apresentou a maior frequência. A predominância acentuada dos casos de etiologia ambiental é devido a nossa atenção materno-infantil ser deficiente.

Em países desenvolvidos, aproximadamente 1/1000 crianças apresentam perda auditiva severa ou profunda ao nascimento ou na infância, na fase pré-lingual. Em cerca de 50% dos casos a etiologia da perda auditiva é hereditária, 30% adquirida e 20% de etiologia idiopática. As formas não-sindrômicas são responsáveis por 70% dos casos de etiologia hereditária e as sindrômicas por 30% destes. Dentre as formas de herança, a autossômica recessiva é a mais frequente (75%-85%), seguida pela dominante (12%-13%). A forma ligada ao X ou mitocondrial é responsável por 2%-3% dos casos de perda auditiva não-sindrômica (Bitner-Glindzicz, 2002; Van Laer *et al.*, 2003).

A surdez não-sindrômica é quase exclusivamente monogênica e altamente heterogênea. A cóclea (Figura 2) é um dos órgãos mais complexos do ser humano. Como responsável pela audição, esta estrutura utiliza aproximadamente 16.000 células sensoriais ciliadas que dependem, para seu bom funcionamento, entre outros eventos, da despolarização da membrana celular, transdução mecanoelétrica, liberação da transmissão e transporte de íons (Avraham, 1997; Van Camp *et al.*, 1997), assim como da repolarização da célula para que esta esteja apta a receber novos estímulos. Esta repolarização se dá pela ação das proteínas conexinas (Cx).



Figura 2 – Cóclea, órgão da orelha interna responsável pela audição. Modificado de <http://www.science.psu.edu/alert/Walker6-2007.htm>

Um dos maiores empecilhos na localização de genes envolvidos na perda auditiva é a dificuldade de manuseio da cóclea e das demais estruturas da orelha interna. A construção de um banco de cDNA de material coclear fetal possibilitou o endereçamento de genes candidatos por uma abordagem tecido-específica (Robertson *et al.*, 1994).

1.1. Ototoxicidade dos aminoglicosídeos

Antibióticos aminoglicosídeos (Figura 3), tais como, gentamicina, estreptomicina e tobramicina, são drogas importantes no combate a infecções por bactérias gram-negativas aeróbias em infecções crônicas, tais como aquelas associadas à tuberculose e fibrose cística. Esse tipo de antibiótico atua ligando-se ao gene, o qual codifica a subunidade menor do ribossomo, interferindo na síntese de proteína bacteriana.

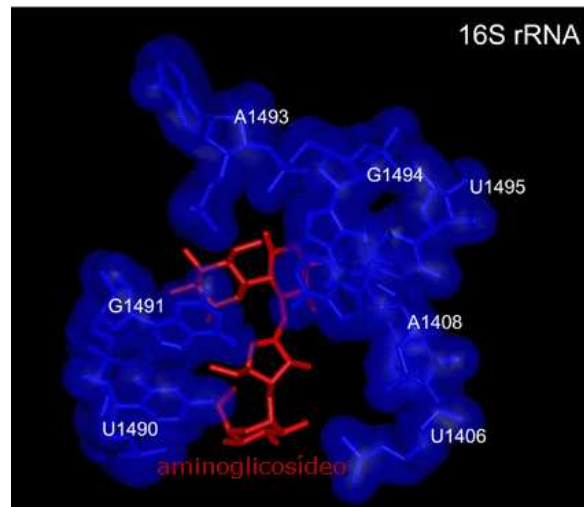


Figura 3 – Estrutura do aminoglicosídeo ligado à subunidade 16S *rRNA* da bactéria. Retirado de <http://puqlisi.stanford.edu/research.html>

O uso de antibióticos aminoglicosídeos leva a alterações nos sistemas renais, auditivos e vestibulares, devido à concentração da droga nas células tubulares renais e líquidos da orelha interna, como endolinfa e perilinfa. Os danos renais geralmente são reversíveis, mas os auditivos não.

Os ribossomos mitocondriais são mais similares aos ribossomos bacterianos do que aos ribossomos citosólicos. Dessa forma, essa similaridade e a alta concentração da droga nos fluidos da orelha interna podem explicar a ototoxicidade dos aminoglicosídeos. Por outro lado, a mutação A1555G no gene *12S rRNA* está localizada em uma região altamente conservada desse gene, essencial para a codificação da subunidade menor do ribossomo, e importante na atuação do aminoglicosídeo. A posição 1555 em humanos equivale a 1491 do 16S *rRNA* de *E.coli* e quando ocorre a mutação de A para G nessa posição, aumenta ainda mais a semelhança entre esses dois genes, o *12S rRNA* humano e o 16S *rRNA* bacteriano (Figura 4). Portanto, a mutação A1555G é uma das alterações que predispõe a surdez nos indivíduos que fazem uso dos antibióticos aminoglicosídeos (Ballana *et al.*, 2006).

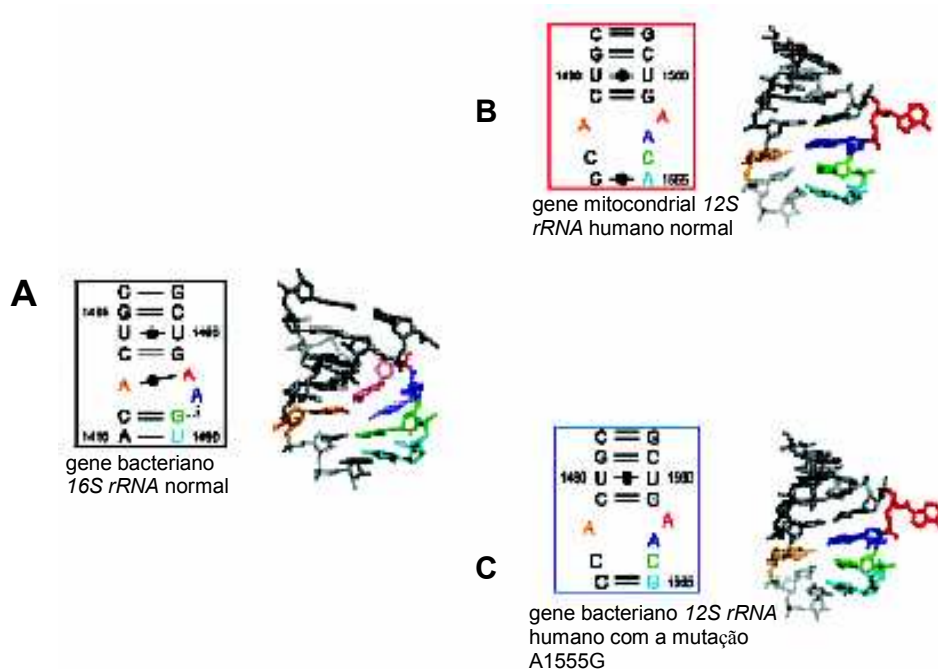


Figura 4 – A: Estrutura conformacional do sítio A do gene bacteriano 16S *rRNA*; **B:** Estrutura conformacional do sítio A do gene mitocondrial 12S *rRNA* humano; **C:** Estrutura conformacional do sítio A do gene mitocondrial 12S *rRNA* humano com a mutação A155G. Observa-se o aumento de similaridade entre **A** e **C**. Modificado de Kondo e Westhof, 2008.

Por si só, os aminoglicosídeos ocasionam pequena, mas significativa redução nas emissões otoacústicas de humanos. Observa-se diminuição das emissões otoacústicas transiente em pacientes submetidos a terapia com sulfato de amicacina por mais de 12 dias. A administração combinada de aminoglicosídeos e diuréticos de alça causa redução das EOAPDs (emissões otoacústicas por produto de distorção) em todos os níveis de estímulos em respostas auditivas de animais (Lonsbury-Martin *et al.*, 2000).

2. Aspectos genéticos da perda auditiva

Aproximadamente 100 *loci* relacionados à surdez não-sindrômica foram mapeados por estudos de ligação. A nomenclatura desses *loci* DFNA, DFNB e DFN é acompanhada por números que são dados seqüencialmente de acordo com a ordem cronológica de descoberta (Cohen *et al.*, 1995).

Acredita-se, portanto, que mais de 100 genes estejam envolvidos na perda auditiva sensorineural não-sindrômica (Sobe *et al.*, 2000).

2.1. O gene *GJB2*

O gene *GJB2* foi o primeiro a ser identificado como sendo responsável pela surdez sensorineural não-sindrômica de padrão autossômico recessivo. Localiza-se na região cromossômica 13q12 e também é responsável por codificar a proteína conexina 26 (Cx26). A partir de sua descoberta, muitos outros genes envolvidos no fenótipo da surdez sensorineural não-sindrômica foram clonados e estão sendo estudados.

As conexinas são uma família de proteínas com quatro domínios transmembrânicos envolvidas na comunicação intercelular (*gap junctions*), que permitem a transferência direta de pequenas moléculas e íons entre células adjacentes, e que são altamente expressas nos vertebrados, em camadas da epiderme. A comunicação é rápida e facilita a produção quase instantânea de potenciais de ação. Na cóclea, as *gap junctions* existem entre as células suporte das células ciliadas, formando um caminho para a reciclagem dos íons K⁺ (potássio) para fazer a transdução da audição, levando ao influxo endolinfático desses íons com despolarização da membrana celular (Kikuchi *et al.*, 1995; Avrahan, 1997).

Portanto, anomalias da conexina 26 interrompem este fluxo de íons K^+ , levando à perda da audição (Kelsell *et al.*, 1997). Um grupo composto por seis moléculas de conexinas se agrupam para formar um hemicanal do conéxon, então dois conéxons se juntam e formam o canal intercelular, responsável pela troca de íons entre as células adjacentes (Figura 5). Desta forma, cria-se um acoplamento elétrico e metabólico entre as células (Alberts *et al.*, 1998), o qual é crucial para a homeostase dos tecidos, crescimento e diferenciação celulares, e para a resposta a estímulos (Willecke *et al.*, 2002).

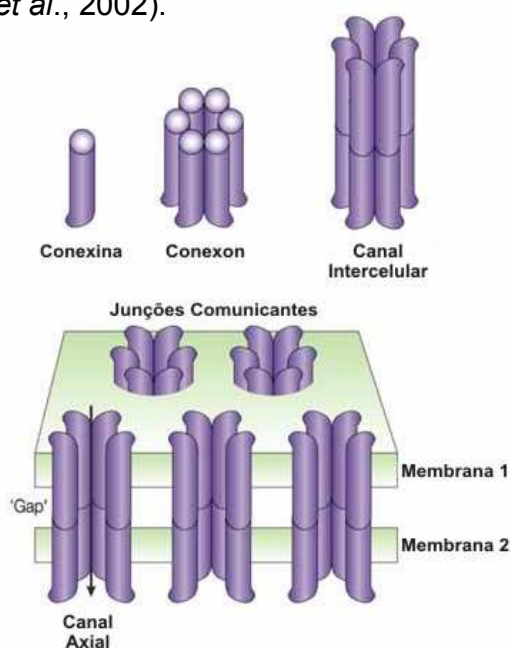


Figura 5 – Canais intercelulares responsáveis pela comunicação intercelular.

Modificado de

http://www.nature.com/nrm/journal/v4/n4/fig_tab/nrm1072_F1.html

Um hemicanal do conéxon pode ser formado por diferentes tipos de conexinas e, quando isto ocorre ele é denominado **heteromérico**. Quando é formado por apenas um tipo de conexina, chama-se **homomérico**. Além disso, estes hemicanais que se unem para formar um canal podem ser idênticos entre si, sendo chamados então de **homotípicos**, quando não, são chamados de **heterotípicos** (Di *et al.*, 2001; Forge *et al.*, 2002) (Figura 6).

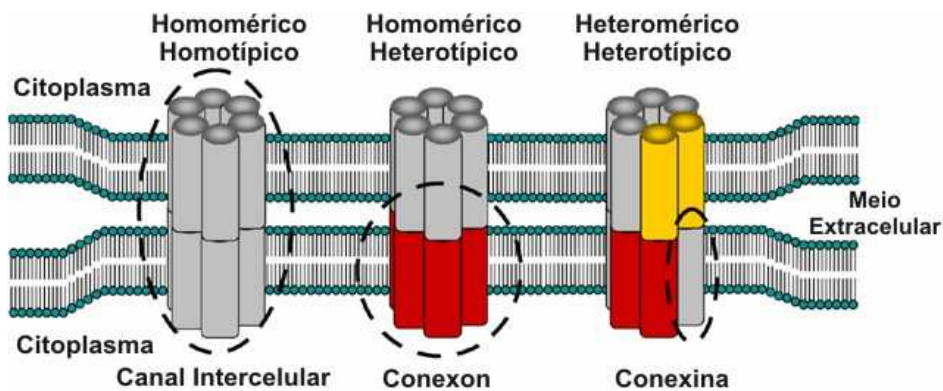


Figura 6 – Tipos de canais intercelulares, decorrentes da combinação de diferentes preteínas conexinas. Modificado de http://www.nature.com/ki/journal/v73/n5/fig_tab/5002720f1.html

Mutações em genes que codificam as conexinas representam a principal causa de perda auditiva de origem genética. Podem determinar a perda apresentando um padrão de herança autossômica recessiva (*GJB2* e *GJB3*), autossômica dominante (*GJB2*, *GJB3* e *GJB6*) ou mesmo ligada ao cromossomo X (*GJB1*). Além disso, mutações nestes genes são responsáveis tanto por perda auditiva exibindo formas sindrômicas (*GJB2*, queratodermia palmoplantar; *GJB3*, eritrodermia *variabilis*; *GJB1*, neuropatia periférica), quanto não-sindrômicas (*GJB2*, *GJB3* e *GJB6*) (Rabionet *et al.*, 2000).

A surdez não-sindrômica é o tipo de perda auditiva de origem genética mais comum e tem sido predominantemente associada a mutações no gene *GJB2*. Até hoje, mais de 90 mutações no gene da conexina 26 vem sendo associadas à surdez não-sindrômica, na qual metade dos casos são congênitos (Martínez, 2009).

As alterações ocorridas no sistema de comunicação intercelular interferem na reciclagem de potássio durante a transdução auditiva, resultando em falta de funcionamento das células ciliadas contidas na cóclea. Os estereocílios (Figura 7) estão presentes na superfície dessas células ciliadas e projetam-se na cavidade preenchida por um fluido chamado endolinfa, que é rica em potássio. Quando a energia mecânica alcança a orelha interna, os estereocílios se movimentam em resposta a movimentação da endolinfa e das membranas do órgão espiral, ocorre então a deflexão dos estereocílios, que estão em contato com essas membranas, causando a abertura dos canais de transdução e enviando a energia elétrica para o cérebro.

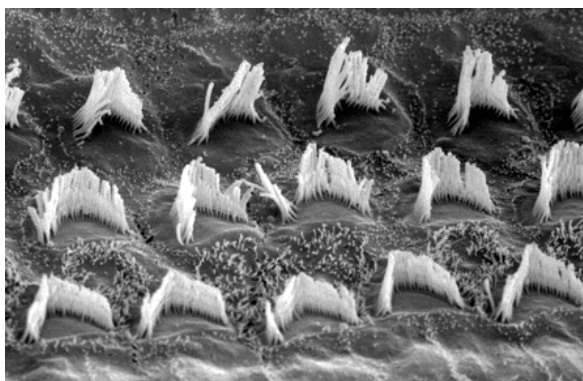
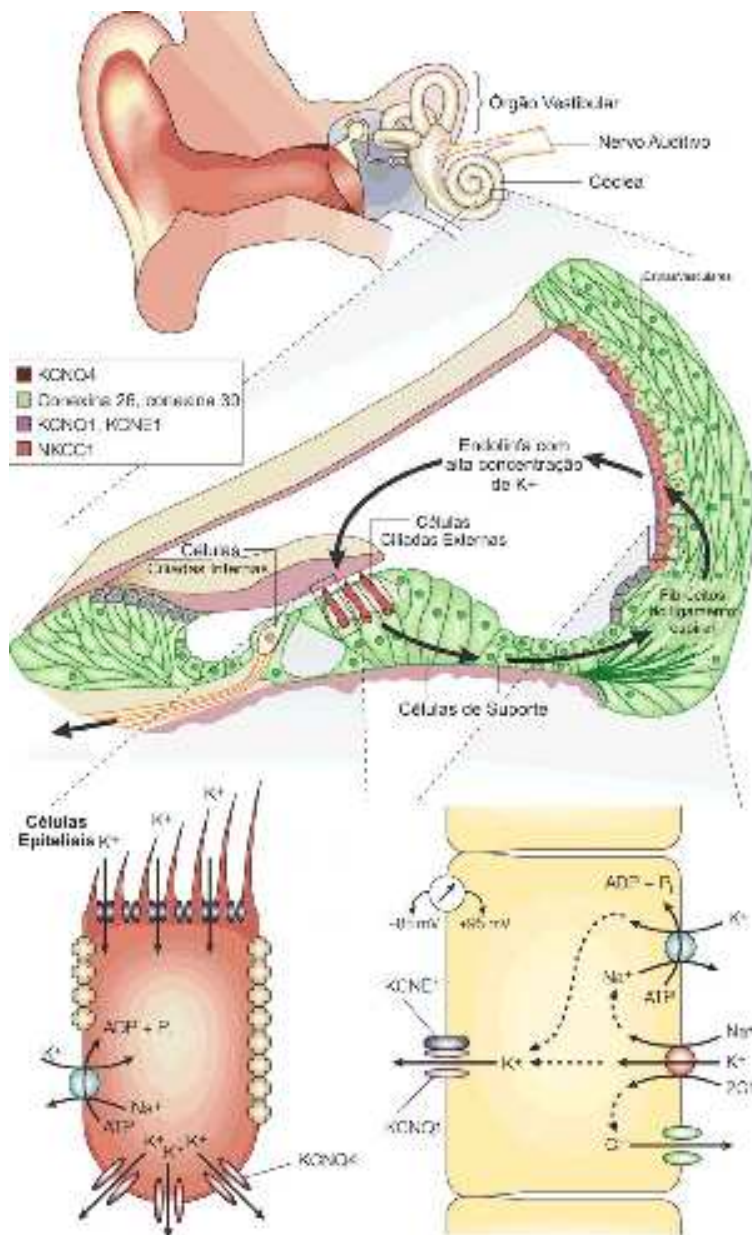


Figura 7 – Microscopia eletrônica de varredura da disposição dos estereocílios na superfície das células cilidas. Modificado de http://www.rborl.org.br/conteudo/acervo/print_acervo.asp?id=2893



Depois que o canal foi aberto, as células sensoriais ciliadas ficam hiperpolarizadas, com alta concentração de potássio intracelular e, para que haja uma nova excitação da célula, o potássio deve ser removido. Esse movimento de íons potássio das células ciliadas para as células de sustentação da cóclea retornando para a endolinfa é feito por meio de comunicações intercelulares, pelos conéxons existentes entre as células ciliadas e as de sustentação. A reciclagem de potássio (Figura 8) é extremamente importante, pois ela é responsável por enviar os impulsos elétricos ao cérebro.

Figura 8 – Ilustração do processo de reciclagem de potássio na orelha interna.

Modificado de

http://www.nature.com/nrn/journal/v1/n1/fig_tab/nrn1000_021a_F4.html

2.1.1. A mutação 35delG

Antigamente denominada 30delG, a mutação 35delG é a deleção de uma das seis guaninas que se estendem da posição 30 à posição 35 do gene *GJB2*. Esta deleção leva à alteração no quadro de leitura de aminoácidos, provocando o aparecimento de um códon prematuro de terminação no códon 13 da proteína (Denoyelle *et al.*, 1997; Zelante *et al.*, 1997). A mutação 35delG está presente em 80% dos casos em que esse gene está envolvido (Denoyelle *et al.*, 1997; Zelante *et al.*, 1997; Estivill *et al.*, 1998; Kelley *et al.*, 1998).

Os primeiros estudos no Brasil mostraram que a frequência de heterozigotos em uma amostra de recém-nascidos era de 0,97% (Sartorato *et al.*, 2000). Recentes estudos mostraram que entre 100 brasileiros caucasóides dois eram heterozigotos, resultando na frequência de 2%; entre brasileiros negróides, a frequência foi de 1% , não sendo observada em brasileiros de origem asiática (Oliveira *et al.*, 2004). A determinação da frequência de heterozigotos em diferentes regiões do país é de extrema importância para a avaliação genético-clínica.

2.2. Deleções envolvendo o gene *GJB6* (conexina 30)

O gene *GJB6* codifica a proteína conexina 30 e está localizado no mesmo *locus* do gene *GJB2* (DFNB1), na região cromossômica 13q12. As deleções $\Delta(GJB6-D13S1830)$ e $\Delta(GJB6-D13S1854)$ resultam no gene *GJB6* defectivo e no conseqüente prejuízo na tradução proteína conexina 30.

Em conseqüência da estimativa de que 10 a 40% dos casos mutações no gene da conexina 26 são detectadas em apenas um dos alelos, o aconselhamento genético dessas famílias se tornava extremamente problemático. Entretanto, recentemente parte deste problema foi esclarecido. Foram encontradas duas

deleções que se estendem à região proximal desse gene indo até parte do gene da conexina 30 (*GJB6*). Estas deleções foram denominadas $\Delta(GJB6-D13S1830)$ e $\Delta(GJB6-D13S1854)$ e referem-se à perda de 342 Kb e 232 Kb respectivamente (del Castillo *et al.*, 2005). Esta deleção, $\Delta(GJB6-D13S1830)$, não provoca alteração no gene *GJB2*, mas resulta no gene *GJB6* defectivo e parece ser bastante freqüente principalmente na população da Espanha. Foram encontrados também indivíduos homocigotos para a deleção, sendo ainda necessários outros estudos para se esclarecer se seria um padrão complexo de herança ou se haveria a inativação do gene *GJB2* pela deleção de elementos regulatórios.

No Brasil, estudo multicêntrico em colaboração com o grupo espanhol, revelou que a $\Delta(GJB6-D13S1830)$ foi encontrada em 25,5% dos pacientes heterocigotos para mutações no gene *GJB2* e a $\Delta(GJB6-D13S1854)$ em 6,3%. A porcentagem encontrada no Reino Unido foi de 22,2% e no norte da Itália, 1,9%. Não foi encontrada em heterocigotos da França, Bélgica, Israel, Palestina, Estados Unidos e nem Austrália. Esses dados comprovam a complexidade da epidemiologia genética de perda auditiva não-sindrômica (del Castillo *et al.*, 2003; del Castillo *et al.*, 2005).

Ainda são necessários estudos em outras populações para se saber a freqüência, origem e efeito da deleção $\Delta(GJB6-D13S1830)$; entretanto, dados preliminares apontam esta mutação como sendo a segunda mais importante, sendo a 35delG a primeira em importância.

2.3. As mutações mitocondriais e a perda auditiva

O DNA mitocondrial (mtDNA) (Figura 9) apresenta 16.568pb, correspondendo a 2% do DNA total. O DNA mitocondrial contém 37 genes responsáveis por codificar 13 mRNAs (polipeptídeos) envolvidos na fosforilação oxidativa, 2 rRNAs e 22 tRNAs requeridos para a síntese de proteínas

mitocondriais. O mtDNA não possui introns, somente pequena região não codificante e o padrão de herança é materno (Kokotas *et al.*, 2007).

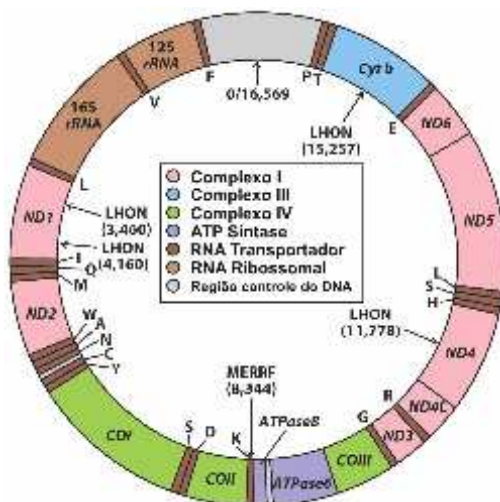


Figura 9 – Esquema mostrando o DNA mitocondrial. Modificado de <http://chemistry.umeche.maine.edu/CHY431/Code4.html>

Estima-se que em até 2% dos casos de surdez não-sindrômica ocorra herança materna, portanto relacionada ao mtDNA. Os dados audiológicos mostram que nesses casos a surdez é sempre sensorineural, normalmente progressiva e bilateral em altas frequências, com evidente variabilidade na gravidade dentro da mesma família. Devido à inacessibilidade da orelha interna, pouco se sabe sobre a fisiopatologia da surdez relacionada a mutações em genes mitocondriais, mas todos os estudos obtidos até o momento mostram degeneração coclear (Guan *et al.*, 2004).

Existem dois genes mitocondriais mais envolvidos nos casos surdez sensorineural não-sindrômica. O gene *MTRNR1*, o qual codifica a subunidade menor 12S rRNA do ribossomo e o gene *MTTS1* codificando o tRNA para Ser^(UCN). Esses genes são considerados regiões *hot spots* (do inglês – pontos quentes; com maior probabilidade para sofrer alterações) na mitocôndria para a surdez (Prezant *et al.*, 1993).

2.3.1. Mutação mitocondrial A1555G

A mutação mitocondrial A1555G na subunidade 12SrRNA foi o primeiro defeito molecular identificado como causa de surdez não-sindrômica. Essa mutação foi descrita em 1993 em uma grande família árabe-israelita (Prezant *et al.*, 1993) e trata-se da troca de uma adenina por uma guanina na posição 1555 do gene. Esta mutação tem sido reportada em muitas famílias com herança materna de surdez sensorineural não-sindrômica e também em indivíduos que usaram antibióticos aminoglicosídeos.

A mutação A1555G altera a estrutura secundária da subunidade 12S rRNA, tornando-a mais semelhante à molécula 16S rRNA da bactéria e aumentando a susceptibilidade ao aminoglicosídeo (Figura 10).

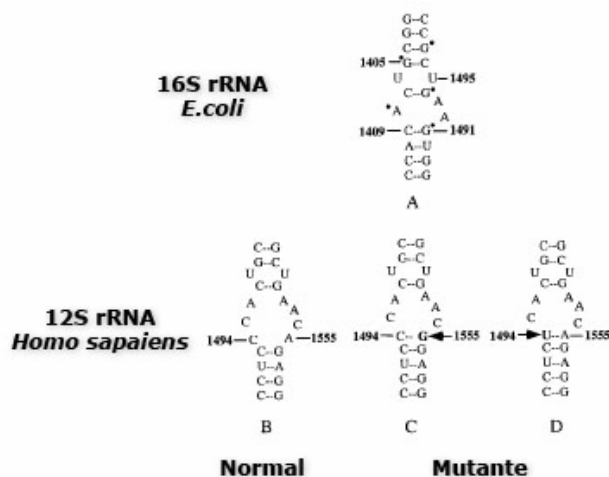


Figura 10 – Localização das mutações A1555G e C1494T. **(A)** Sítio A no gene 16S rRNA de *E. coli*; **(B)** Região correspondente no gene 12S rRNA em humanos; **(C)** Mutante A1555G; **(D)** Mutante C1494T. Modificado de ZHAO *et al.*, 2005.

Antes se acreditava que, algumas mutações mitocondriais inicialmente aparentavam não ter significância clínica incluindo a A1555G, sendo consideradas simples polimorfismos pela baixa penetrância observada no fenótipo. Entretanto, observou-se que o *background* genético do indivíduo e a associação ao uso de drogas ototóxicas poderiam predispor tais indivíduos à surdez. De fato, o uso de medicamentos aminoglicosídeos somado a mutações em genes mitocondriais com eventual associação a genes moduladores nucleares estão intimamente relacionados à modulação da expressividade e penetrância da surdez em humanos.

2.3.2. Mutação mitocondrial C1494T

A mutação mitocondrial C1494T é a troca de uma citocina por uma timina na posição 1494 da subunidade *12S rRNA*. Esta mutação foi encontrada em uma extensa família Chinesa (Zhao *et al.*, 2004) e em 3 famílias espanholas (Rodriguez-Ballesteros *et al.*, 2006) com surdez não-sindrômica. A penetrância foi incompleta, porém mais alta quando os indivíduos tiveram exposição a aminoglicosídeos. Como a mutação C1494T fica na mesma região codificadora da subunidade *12S rRNA*, ela é estruturalmente semelhante à mutação A1555G e também parece ser modulada pelo uso de aminoglicosídeos (Figura 8).

2.3.3. Mutação mitocondrial A827G

A mutação A827G é a troca de uma adenina por uma guanina na posição 827 do gene e está localizada no sítio A da subunidade *12S rRNA* do gene mitocondrial. Esta mutação foi descrita por Li *et al.* em 2005 e por Xing *et al.* em 2006. A ocorrência da mutação mitocondrial A827G nos chineses sugeriu que esta mutação está envolvida com a perda auditiva. No entanto, também foi constatado que a mutação A827G sozinha não é suficiente para causar o fenótipo da surdez

nos indivíduos, já que houve apenas 43.5% de penetrância nessas famílias chinesas (Xing *et al.*, 2006). Dessa forma, a mutação A827G parece depender de fatores modificadores para a expressão do fenótipo em questão, assim como de diferentes haplótipos, genes nucleares modificadores ou aminoglicosídeos.

2.4. Genes nucleares moduladores

Recentemente, tem sido proposto um modelo de interação entre genes nucleares e mitocondriais em levedura *Saccharomyces cerevisiae*. Nessas espécies, alelos mutantes dos genes nucleares *MTO1*, *Mss1* e *Mto2* que codificam proteínas mitocondriais, manifestaram deficiência no fenótipo estudado quando associados à mutação mitocondrial C1409G no gene *16S rRNA* (C1494T no gene *12S rRNA* em humanos). Em *E.coli* o produto do gene *mnmE*, *gidA* e *TRMU*, cujos homólogos humanos são *MSS1*, *MTO1* e *MTO2* respectivamente, estão envolvidos com a síntese no nucleosídeo hipermodificado 5-metil-aminometil-2-tio-uridina ($\text{mnm}^5\text{s}^2\text{U34}$). A modificação desse nucleotídeo é observada no anti-códon dos tRNAs de glutamato, lisina e glutamina, tanto em humanos quanto em bactérias, com a finalidade da estabilização estrutural, aminoacilação e reconhecimento do códon correspondente na subunidade menor do RNA ribossômico. O gene *TRMU*, por sua vez, é responsável pela posterior 2-tiolização do $\text{mnm}^5\text{s}^2\text{U34}$ dos tRNA^{Lys} , tRNA^{Glu} e tRNA^{Gln} , em levedura, bactérias e humanos. Experimentos demonstraram que o gene *TRMU* humano complementa o fenótipo deficiente em leveduras mutantes *mto2* e carregando também a mutação C1409G no gene *16S rRNA* (Guan *et al.*, 2006; Brégeon *et al.*, 2001).

2.4.1. Gene *TRMU*

O gene nuclear *TRMU* tem sido estudado como modulador da gravidade da perda auditiva. A mutação G28T em homozigose causa um defeito significativo na modificação 2-tio na posição de oscilação do tRNA^{Lys}, tRNA^{Glu} e tRNA^{Gln} mitocondriais. A falha na modificação 2-tio resulta em uma grande proporção de tRNAs não modificados, deixando-os mais expostos à degradação e portanto, levando a uma redução na taxa de tradução mitocondrial, embora não o suficiente para produzir um fenótipo clínico. Além disso, os níveis de equilíbrio dos tRNA^{Lys}, tRNA^{Glu} e tRNA^{Gln} mitocondriais diminuem significativamente em células positivas tanto para a mutação G28T quanto para mutações mitocondriais (A1555G, C1494T e A827G), interferindo na tradução mitocondrial. Esta interferência faz com que a taxa de produção de ATP necessária para o funcionamento normal da audição diminua, podendo então causar surdez.

Correlacionando diversos experimentos com genes moduladores em levedura e bactéria, pesquisadores observaram que o gene *TRMU* modula a expressão do fenótipo das mutações A1555G e C1494T no gene *12S rRNA* da mitocôndria humana. A mutação G28T no gene *TRMU* foi recentemente associada à expressão fenotípica da surdez e mutações mitocondriais na subunidade *12S rRNA*. O gene *TRMU* codifica a 5-metilaminometil-2-tiouridilato-metiltransferase, responsável pela biossíntese da 5-taurinometil-2-tiouridina (m^5s^2U) dos tRNA^{Lys}, tRNA^{Glu} e tRNA^{Gln} mitocondriais (Figura 11). O m^5s^2U é posteriormente modificado para mnm^5s^2U34 nas mesmas posições dos tRNAs de *E. coli* e de mitocôndrias humanas. Esta modificação contribui para a alta fidelidade e estabilização funcional dos tRNAs. A mutação G28T em homozigose causa um defeito significativo na modificação 2-tio na posição de oscilação do tRNA^{Lys}, tRNA^{Glu} e tRNA^{Gln} mitocondriais, resultando em tRNAs não modificados, deixando-os mais expostos a degradação e levando a uma redução na taxa de tradução mitocondrial, embora não o suficiente para produzir um fenótipo clínico.

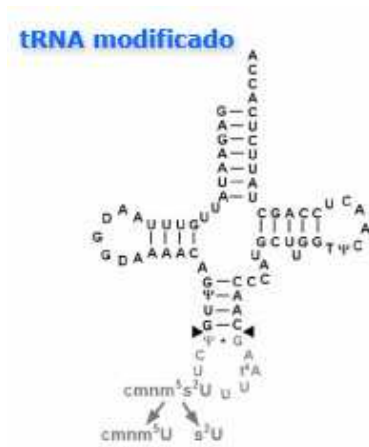


Figura 11 – Modificação do tRNA pelo gene *TRMU*. Modificado de <http://www.geocities.com/basnetdevi/fig.1.jpg>

As mutações mitocondriais A1555G, C1494T e A827G estão localizadas no sítio de codificação aminoacil-tRNA (sítio A) do ribossomo mitocondrial, onde a interação códon/anti-códon ocorre e justamente onde o aminoglicosídeo interage. Dessa forma, as mutações A1555G, C1494T e A827G provocam uma mudança conformacional do sítio A do *12S rRNA*, tornando menos eficiente a interação nesse sítio dos tRNAs hipermodificados pelos genes *TRMU* e *MTO1* (Figura 12) (Guan *et al.*, 2006).

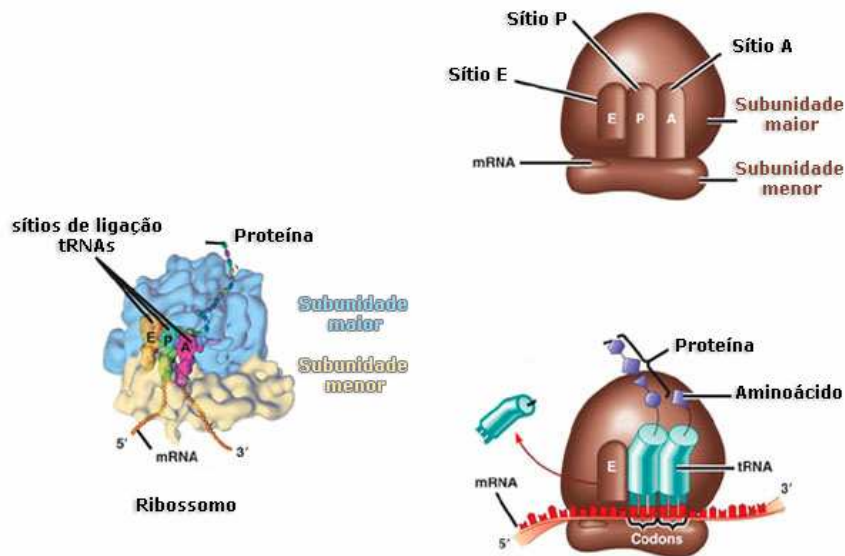


Figura 12 - Síntese de proteínas, mostrando os sítios de ligação no ribossomo dos tRNA hipermodificados.

De forma resumida, alterações em genes modificadores agravam as disfunções mitocondriais causadas por mutações no gene *12S rRNA*, havendo portanto, uma relação sinérgica entre os genes mitocondriais, genes modificadores nucleares e o uso de antibióticos aminoglicosídeos no fenótipo da surdez (Bykhovskaya *et al.*, 2004; Yan *et al.*, 2005).

2.4.2. Gene *MTO1*

O gene nuclear *MTO1* está localizado no cromossomo 6 e se expressa em diversos tecidos, principalmente em tecidos com alta taxa de metabolismo, como músculo esquelético, fígado, coração e cóclea. Em leveduras, mutações no gene *MTO1* manifestam um fenótipo respiratório deficiente quando associadas à mutação P(R)454 na subunidade *15S rRNA*, que corresponde à mutação A1555G em humanos. Isso sugere que o gene *MTO1* como gene modificador pode

influenciar a expressão fenotípica da mutação A1555G. Este gene codifica uma proteína que se acredita estar envolvida na modificação dos tRNAs mitocondriais, desenvolvendo um importante papel na expressão fenotípica da perda auditiva não-sindrômica e induzida por aminoglicosídeos, associada à mutação A1555G. Portanto, o estudo do gene nuclear *MTO1* ajudará a entender o mecanismo de patogenicidade da mutação A1555G na subunidade 12S *rRNA* do gene mitocondrial.

OBJETIVOS

OBJETIVOS

1. Geral

Correlacionar alterações entre genes mitocondriais e genes nucleares modificadores no fenótipo da surdez.

2 . Específicos

Analisar amostras de indivíduos com e sem comprovada perda auditiva sensorineural e com e sem histórico de uso de antibióticos aminoglicosídeos quanto à presença das mutações nos seguintes genes:

1. Mutação 35delG no gene *GJB2*;
2. Alterações no gene *GJB2*;
3. Rastreamento de deleções envolvendo o gene *GJB6*;
4. Pesquisa de mutações na subunidade ribossômica *12S rRNA*;
5. Pesquisa da mutação G28T no gene nuclear modulador *TRMU*.
6. Pesquisa de mutações no gene nuclear modulador *MTO1*.

CASUÍSTICA E MÉTODOS

A – 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 ao Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP) (Anexo 1).

Foram estudados 85 indivíduos, 75 desses provenientes da Maternidade-Escola Assis Chateaubriand (MEAC) – maternidade pública da Universidade Federal do Ceará (Grupos A, B e C) e 10 do Departamento de Otorrinolaringologia do Hospital das Clínicas da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP) (Grupo D).

Os recém-nascidos de alto risco foram selecionados de acordo com os critérios de inclusão elaborados pelo Comitê Brasileiro de Perdas Auditivas na Infância – CBPAI (Anexo 2).

Os indivíduos foram divididos em 4 grupos:

GRUPO A – 25 recém-nascidos de alto risco (recém-nascidos que ficaram na UTI e fizeram uso de antibióticos aminoglicosídeos) que tiveram diagnóstico audiológico de surdez sensorineural não-sindrômica (MEAC);

GRUPO B – 25 recém-nascidos de alto risco com audição normal (MEAC);

GRUPO C – 25 pacientes nascidos a termo (nascidos de 9 meses e que não fizeram uso de antibióticos aminoglicosídeos) , com perda auditiva (MEAC);

GRUPO D – 10 indivíduos adultos com perda auditiva previamente diagnosticados com a mutação mitocondrial A1555G (HC-UNICAMP) e que não fizeram uso de antibióticos aminoglicosídeos.

B – Métodos

1. Extração do DNA genômico de sangue periférico

A extração do DNA genômico foi realizada a partir de leucócitos obtidos em 10 a 15mL de sangue periférico coletado em tubos *Vacutainer* contendo EDTA 10%, de acordo com o protocolo adaptado pelo Laboratório de Genética Molecular Humana do CBMEG – UNICAMP.

2. Detecção da mutação 35delG no gene *GJB2*

A partir do DNA extraído dos pacientes, a mutação 35delG foi analisada pela técnica de AS-PCR (*allele specific polymerase chain reaction* - reação em cadeia da polimerase alelo específica) desenvolvida pelo Laboratório de Genética Humana do Centro de Biologia Molecular e Engenharia Genética da UNICAMP.

3. Rastreamento de mutações no gene *GJB2*

O gene *GJB2* é amplificado pela técnica de PCR. Para esta reação foram usados *primers*, cujas seqüências se encontram na Tabela 1. O exon codificante deste gene (745pb) foi dividido em duas partes (332pb e 547pb, respectivamente).

Tabela 1 – Seqüências de *primers* para a amplificação do gene *GJB2*.

PAR	PRIMERS 5' → 3'	TAMANHO (pb)
1	Cx261F – CTC CCT gTT CTg TCC TAg C Cx261R – gAC ACg AAg ATC AgC TgC	332
2	Cx262F – gCT ACg ATC ACT ACT TCC C Cx262R – ggT TgC CTC ATC CCT C	547

A amplificação do gene *GJB2* consistiu de 30 ciclos usando 200 a 500ng de DNA genômico, 200 μ M de cada desoxinucleotídeo trifosfato (dATP, dCTP, dGTP, dTTP), 20pmol 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.

Para a amplificação dos fragmentos foram utilizados os ciclos de amplificação determinados segundo kellsell *et al.* (1997) e Denoyelle *et al.* (1997) e também de acordo com a *Tm* de cada *primer* utilizado como mostra a Figura 13.

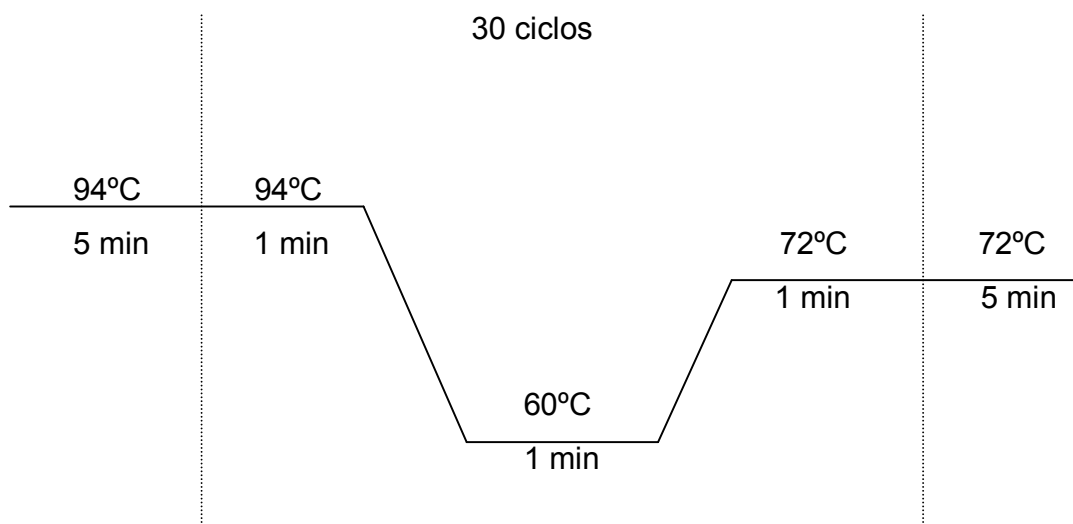


Figura 13 – Condições utilizadas para a amplificação do gene *GJB2*.

Os produtos de amplificação foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1,5% em tampão Tris-Borato-EDTA, ou TBE 1X. 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.

4. Detecção das deleções $\Delta(GJB6-D13S1830)$ e $\Delta(GJB6-D13S1854)$

A estratégia para análise destas deleções foi previamente descrita por del Castillo e colaboradores (2005) que desenvolveram um teste diagnóstico envolvendo as duas deleções na mesma PCR (PCR Multiplex). O gene *GJB6* possui um único exon codificante de 786pb.

É utilizado um único teste para amplificar os segmentos que contêm a junção do ponto de quebra de cada uma das deleções $\Delta(GJB6-D13S1830)$ e $\Delta(GJB6-D13S1854)$, assim como o segmento contendo o éxon 1 do gene *GJB6*, que é usado como controle para avaliar a eficiência da PCR e distinguir heterozigotos de homozigotos para qualquer das duas deleções. Um conjunto de três pares de *primers* descritos por Del Castillo e colaboradores (2005) amplificam três fragmentos diferentes: 333pb referente ao éxon 1 do gene, 460pb e 564pb relacionados às deleções $\Delta(GJB6-D13S1830)$ e $\Delta(GJB6-D13S1854)$, respectivamente.

5. Rastreamento de mutações em genes mitocondriais

5.1. Mutação A1555G no gene *12S rRNA*

A região do DNA mitocondrial que contém o nucleotídeo 1555 foi amplificada para todos os pacientes. Os *primers* usados para produzir estas duas ampliações são mostrados na Tabela 2.

Tabela 2 – Seqüência de *primers* para a amplificação da região do gene *12S rRNA*.

Nome	Posição*	<i>Primers (5'→3')</i>
MITF	1039 a 1058	ATA TCT GAA CAC ACA ATA GC
MITR	3099 a 3080	AAA CCG CCT GGA TTA CTC

* Os números relacionados à posição dos nucleotídeos estão de acordo com a publicação de Cambridge sobre a seqüência mitocondrial (Anderson *et al.*, 1981).

A reação de amplificação foi realizada utilizando-se 500ng de DNA genômico, 5 μ L de solução contendo desoxinucleotídeos (dATP, dCTP, dGTP e dTTP), 2 μ L de cada *primer* (direto e inverso) na concentração de 0,1 μ g/ μ l; 0,5 μ L de Taq DNA polimerase (5U/ μ L); 5 μ L de tampão de PCR 10X (Tris-HCl 10mM pH 8,8) e 1,5 μ l de MgCl₂ (50mM), em um volume final de 50 μ l.

O produto amplificado de 2060 pb foi, então, digerido com a enzima de restrição *BsmA* I, a 55°C por 2 horas, da seguinte forma:

17,5 μ l de produto de PCR
2,0 μ l de tampão da enzima
0,5 μ l da enzima *BsmA* I (5000U/ μ l)

Os produtos da digestão foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1,5% em tampão TBE 1x. A seqüência normal apresenta as bandas dos fragmentos de 1100, 516 e 444pb, ao passo que na mutante perde-se um sítio de *BsmA* I apresentando fragmentos de 1616 e 444pb. O gel foi corado com brometo

de etídio na concentração final de 0,5g/mL e os fragmentos amplificados visualizados sob iluminação ultravioleta.

5.2. Mutação C1494T no gene 12S rRNA

Foi amplificado um fragmento de mtDNA de 441pb utilizando-se as seqüências de *primers*, apresentadas na tabela 3.

Tabela 3 – Seqüência de *primers* utilizadas para amplificação da região do gene 12S rRNA.

Nome	<i>Primers (5'→3')</i>
C1494T F	GTC GAA GGT GGA TTT AGC AGT
C1494T R	CAG AAG GTA TAG GGG TTA GTC

A reação de amplificação foi realizada utilizando-se 500ng de DNA genômico, 5µL de solução contendo desoxinucleotídeos (dATP, dCTP, dGTP e dTTP), 2µL de cada *primer* (direto e inverso) na concentração de 0,1µg/µL; 0,5µL de *Taq* DNA polimerase (5U/µL); 5µL de tampão de PCR 10X (Tris-HCl 10mM pH 8,8) e 1,5µL de MgCl₂ (50mM), em um volume final de 50µL.

O produto amplificado foi digerido posteriormente com a enzima de restrição *Hph* I, a 37° C por 2 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 produtos da digestão foram então submetidos à eletroforese em gel de agarose 1,5% em tampão TBE 1x. A seqüência normal apresentou os fragmentos de 370pb e 71pb, ao passo que na seqüência mutante há a perda de um sítio de *Hph* I, apresentando apenas o fragmento de 441pb. O gel foi corado com brometo de etídio na concentração final de 0,5g/mL e os fragmentos amplificados visualizados sob iluminação ultravioleta.

5.3. Mutação A827G no gene 12S rRNA

A região do DNA mitocondrial que contém o nucleotídeo 827 foi amplificada para todos os pacientes. A mutação A827G foi rastreada por seqüenciamento direto.

6. Análise de genes moduladores

6.1. Mutação G28T no gene modulador TRMU

Realizou-se a reação para a amplificação de 467pb do gene *TRMU*. O produto amplificado foi, então, digerido com a enzima de restrição *Bsp1286I*.

6.2. Análise do gene MTO1

O gene *MTO1* foi analisado por meio de rastreamentos pela técnica de DHPLC (DHPLC, do inglês *Denaturing High-Performance Liquid Chromatography*; cromatografia líquida desnaturante de alta performance) seguido por seqüenciamento automático.

6.2.1. Rastreamento de mutações por DHPLC

Foram amplificadas pela técnica de PCR as regiões codificantes do gene *MTO1* e seus produtos foram submetidos à triagem de mutações. A triagem foi realizada por cromatografia líquida desnaturante de alta performance que está baseada no pareamento de íons em fase reversa sob condições desnaturantes usando como princípio: a) formação de heteroduplexes através da hibridação após o aquecimento e esfriamento dos produtos da PCR; b) separação dos heteroduplexes e homoduplexes sob condições parciais de desnaturação.

A análise foi realizada em um sistema DNA WAVE 4500A (Transgenomic, Santa Clara, CA) como descrito a seguir: a PCR para cada amplicon foi realizada em volume final de 20µL contendo 5µM de cada primer específico, 200µM de cada dNTP, 0,5U de *Taq* DNA polimerase, 1 X tampão, 1.5 mM MgCl₂ e 50ng de DNA. A qualidade do produto da PCR foi observada em gel de agarose antes da análise por DHPLC. Os produtos de PCR foram então desnaturados a 95°C por 5 minutos seguidos por re-anelamento gradual em temperatura ambiente durante 45 minutos, permitindo a formação de heteroduplexes dos produtos de PCR.

Após essa etapa, 5 µL dos produtos foram colocados em coluna DNASep[®] com taxa e fluxo de 0.9mL/min e com temperaturas adequadas para cada fragmento de PCR de acordo com as recomendações do programa Wavemaker[™]. A composição dos tampões usados foi: Tampão A – 0.1M acetato trietilamonio (TEAA) e Tampão B - 0.1M 25% acetonitrila em TEAA. A análise foi conduzida por

inspeção visual de cada perfil cromatográfico e comparado com controles normais. Os amplicons que apresentaram um padrão cromatográfico diferente daquele apresentado pelo controle foram seqüenciados em seqüenciador automático.

7. Seqüenciamento

7.1. Purificação dos produtos de PCR

Os fragmentos amplificados por PCR foram purificados utilizando-se o *Kit Wizard SV Gel and PCR Clean-UP System* (Promega). Após a purificação, as amostras são quantificadas usando o marcador de peso molecular *Low Mass DNA Ladder* (GIBCO) para posterior seqüenciamento.

7.2. Reação de seqüenciamento automático para produto de PCR

As reações de seqüenciamento foram realizadas no seqüenciador automático **ABI PRISM® 3700 DNA Analyzer**, utilizando-se 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

A reação de seqüenciamento consistiu de 30 ciclos nas condições especificadas na Figura 14.

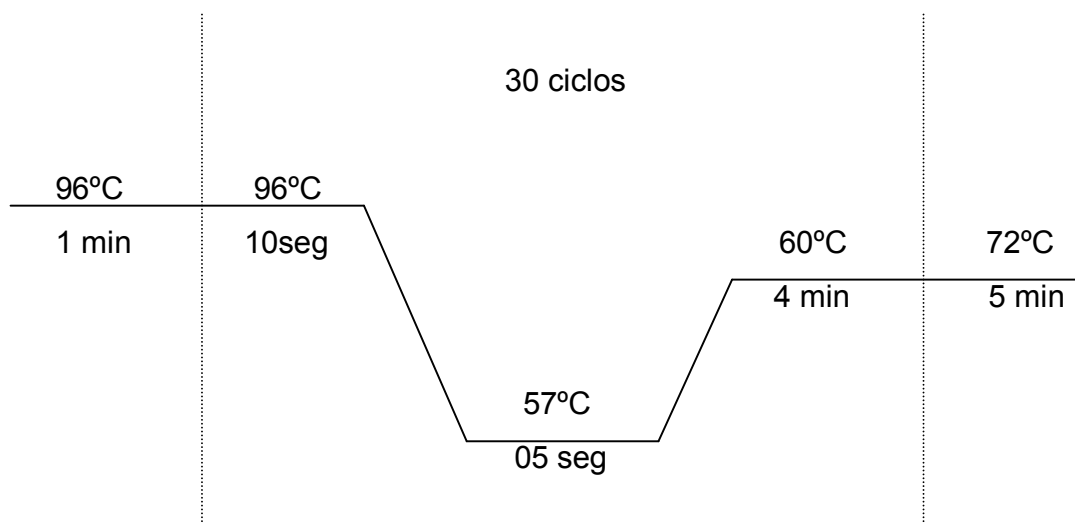


Figura 14 – Ciclos utilizados no seqüenciamento do gene *GJB2*.

As reações de seqüenciamento prontas foram purificadas e liofilizadas de acordo com as seguintes etapas:

- adicionaram-se 80 μ L de etanol 80%;
- centrifugou-se por 45 minutos a 3.700 rpm;
- descartou-se o etanol em papel absorvente;
- adicionaram-se 150 μ L de etanol 70%;
- centrifugou-se por 10 minutos a 3.700 rpm;
- descartou-se o etanol da mesma forma;
- centrifugou-se rapidamente com a placa invertida

As reações foram mantidas à temperatura ambiente até o momento da colocação da placa no **ABI PRISM® 3700 DNA Analyzer**. Antes da colocação da placa no seqüenciador, as seguintes etapas foram seguidas:

- adicionaram-se 10µL de formamida;
- a placa foi homogeneizada 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

7.3. Análise das seqüências obtidas

As seqüências obtidas foram analisadas e comparadas com a seqüência normal com o auxílio dos softwares *Chromas Lite 2.01* e *CLC Sequence Viewer 5.0.1*.

RESULTADOS

RESULTADOS

Foram estudados 85 pacientes, os quais foram divididos em 4 grupos, como consta na casuística. As tabelas a seguir apresentam um resumo dos resultados obtidos nos diferentes grupos estudados:

RESULTADOS

Tabela 4 - Grupo A – Recém-nascidos de alto-risco, com perda auditiva.

Indivíduo	Idade (m)	Sexo	TI	DO	Tipo de perda auditiva		GJB2		GJB6		Mutações mitocondriais			TRMU G28T	MTO1
					Orelha direita	Orelha esquerda	35delG	outros	Del 1	Del 2	A1555G	C1494T	A827G		
1	4	Masc	32	+	severa(80dBNA)	severa(80dBNA)	N/N	N/N	N/N	N/N	N	N	N	N/N	NR
2	20	Masc	12	+	profunda(95dBNA)	profunda(95dBNA)	N/N	V371/N	N/N	N/N	N	N	N	N/N	NR
3	4	Fem	93	+	moderada(60dBNA)	moderada(60dBNA)	N/N	N/N	N/N	N/N	N	N	N	N/N	NR
4	22	Masc	22	+	moderada(50dBNA)	moderada(50dBNA)	N/N	N/N	N/N	N/N	N	N	N	N/N	NR
5	15	Masc	66	+	severa(70dBNA)	severa(75dBNA)	N/N	N/N	N/N	N/N	N	N	N	N/M	NR
6	4	Masc	10	+	severa(80dBNA)	severa(80dBNA)	N/N	N/N	N/N	N/N	N	N	N	N/N	NR
7	3	Masc	60	+	severa(80dBNA)	severa(80dBNA)	N/N	N/N	N/N	N/N	N	N	M	N/M	N/N
8	6	Masc	28	+	leve(40dBNA)	leve(40dBNA)	N/N	N/N	N/N	N/N	N	N	N	N/N	NR
9	4	Fem	23	+	moderada(65dBNA)	profunda(95dBNA)	N/N	N/N	N/N	N/N	N	N	N	N/N	NR
10	8	Fem	50	+	moderada(50dBNA)	moderada(50dBNA)	N/N	N/N	N/N	N/N	N	N	N	N/N	NR
11	6	Masc	50	+	moderada(60dBNA)	moderada(60dBNA)	N/N	N/N	N/N	N/N	N	N	N	N/N	NR
12	4	Masc	21	+	profunda(95dBNA)	severa(70dBNA)	N/N	N/N	N/N	N/N	N	N	N	N/N	NR
13	4	Masc	15	+	profunda(100dBNA)	severa(80dBNA)	N/N	N/N	N/N	N/N	N	N	N	N/N	NR
14	6	Masc	24	+	profunda(95dBNA)	profunda(95dBNA)	N/N	N/N	N/N	N/N	N	N	N	N/N	NR
15	3	Masc	59	+	moderada(65dBNA)	severa(75dBNA)	N/N	N/N	N/N	N/N	N	N	N	N/N	NR
16	7	Fem	65	+	moderada(55dBNA)	moderada(60dBNA)	N/N	V271/V271	N/N	N/N	N	N	N	N/N	NR
17	15	Fem	58	+	leve(30dBNA)	leve(30dBNA)	N/N	N/N	N/N	N/N	N	N	N	N/N	NR
18	2	Masc	16	+	severa(85dBNA)	severa(80dBNA)	N/N	N/N	N/N	N/N	N	N	N	N/N	NR
19	6	Fem	47	+	profunda(>100dBNA)	profunda(>100dBNA)	N/N	N/N	N/N	N/N	N	N	N	N/M	NR
20	4	Masc	104	+	leve(35dBNA)	leve(30dBNA)	N/N	N/N	N/N	N/N	N	N	M	N/N	N/N
21	3	Masc	75	+	moderada(50dBNA)	moderada(50dBNA)	N/N	N/N	N/N	N/N	N	N	N	N/N	NR
22	2	Fem	29	+	moderada(60dBNA)	moderada(60dBNA)	N/N	N/N	N/N	N/N	N	N	N	N/N	NR
23	20	Masc	32	+	profunda(95dBNA)	profunda(100dBNA)	N/N	N/N	N/N	N/N	N	N	N	N/N	NR
24	7	Fem	51	+	severa(70dBNA)	severa(75dBNA)	N/N	N/N	N/N	N/N	N	N	N	N/N	NR
25	15	Masc	19	+	profunda(95dBNA)	profunda(95dBNA)	N/N	N/N	N/N	N/N	N	N	N	N/N	NR

(m) meses; Masc = masculino; Fem = feminino; TI = tempo internação em UTI neonatal (dias); DO = drogas ototóxicas; dBNA = decibel nível de audição; Del = deleção; (+) positivo; (-) negativo; NR = não realizado; N = Normal; M = Mutante; N/M = Heterozigoto; N/N = Homozigoto normal; V371/N = Heterozigoto para V371; V271/V271 = Homozigoto para V271.

Tabela 5 - Grupo B – Recém-nascidos de alto-risco, sem perda auditiva.

Indivíduo	Idade (m)	Sexo	TI	DO	Audição - orelhas		GJB2		GJB6		Mutações mitocondriais			TRMU G28T	MTO1
					direita	esquerda	35delG	outros	Del 1	Del 2	A1555G	C1494T	A827G		
1	1	Masc	25	+	N	N	N/N	N/N	N/N	N/N	N	N	N	N/N	NR
2	5	Masc	23	+	N	N	N/N	N/N	N/N	N/N	N	N	N	N/N	NR
3	14	Masc	46	+	N	N	N/N	N/N	N/N	N/N	N	N	N	N/N	NR
4	4	Fem	7	+	N	N	N/N	N/N	N/N	N/N	N	N	N	N/N	NR
5	14	Fem	24	+	N	N	N/N	N/N	N/N	N/N	N	N	N	N/N	NR
6	4	Fem	80	+	N	N	N/N	N/N	N/N	N/N	N	N	N	N/N	NR
7	3	Madc	17	+	N	N	N/N	N/N	N/N	N/N	N	N	M	N/N	I392M
8	8	Masc	8	+	N	N	N/N	N/N	N/N	N/N	N	N	N	N/N	NR
9	1	Fem	7	+	N	N	N/N	N/N	N/N	N/N	N	N	N	N/N	NR
10	7	Masc	13	+	N	N	N/N	N/N	N/N	N/N	N	N	N	N/N	NR
11	4	Masc	18	+	N	N	N/N	N/N	N/N	N/N	N	N	N	N/N	NR
12	2	Masc	20	+	N	N	N/N	V27I/N	N/N	N/N	N	N	N	N/N	NR
13	3	Masc	30	+	N	N	N/N	N/N	N/N	N/N	N	N	N	N/N	NR
14	6	Fem	42	+	N	N	N/N	N/N	N/N	N/N	N	N	N	N/N	NR
15	2	Masc	28	+	N	N	N/N	N/N	N/N	N/N	N	N	N	N/N	NR
16	2	Masc	20	+	N	N	N/N	V27I/N	N/N	N/N	N	N	N	N/N	NR
17	1	Masc	30	+	N	N	N/N	N/N	N/N	N/N	N	N	N	N/N	NR
18	3	Masc	59	+	N	N	N/N	N/N	N/N	N/N	N	N	N	N/N	NR
19	1	Masc	7	+	N	N	N/N	N/N	N/N	N/N	N	N	N	N/N	NR
20	1	Fem	8	+	N	N	N/N	N/N	N/N	N/N	N	N	M	N/N	N/N
21	2	Fem	5	+	N	N	N/N	N/N	N/N	N/N	N	N	N	N/N	NR
22	2	Fem	18	+	N	N	N/N	N/N	N/N	N/N	N	N	N	N/N	NR
23	2	Masc	21	+	N	N	N/N	N/N	N/N	N/N	N	N	N	N/N	NR
24	2	Masc	32	+	N	N	N/N	N/N	N/N	N/N	N	N	N	N/N	NR
25	2	Masc	20	+	N	N	N/N	N/N	N/N	N/N	N	N	N	N/N	NR

(m) meses; Masc = masculino; Fem = feminino; TI = tempo internação em UTI neonatal (dias); DO = drogas ototóxicas; dBNA = decibel nível de audição; Del = deleção; (+) positivo; (-) negativo; NR = não realizado; N/M = Heterozigoto; N/N = Homozigoto normal; V27I/N = Heterozigoto para V27I; N = Normal; M = Mutante; I392M = mutação C/G no exon 06 com troca do aminoácido Isoleucina para Metionina.

Tabela 6 - Grupo C - Pacientes nascidos a termo, com perda auditiva.

Indivíduo	Idade (m)	Sexo	TI	DO	Tipo de perda auditiva		GJB2		GJB6		Mutações mitocondriais			TRMU G28T	MTO1
					Orelha direita	Orelha esquerda	35delG	outros	Del 1	Del 2	A1555G	C1494T	A827G		
1	19	Masc	0	-	moderada(60dBNA)	moderada(60dBNA)	N/N	V271/N	N/N	N/N	N	N	N	N/N	NR
2	32	Fem	0	-	profunda(95dBNA)	profunda(95dBNA)	N/N	N/N	N/N	N/N	N	N	M	N/N	N/N
3	20	Masc	0	-	profunda(95dBNA)	profunda(95dBNA)	N/N	N/N	N/N	N/N	N	N	M	N/N	N/N
4	38	Fem	0	-	profunda(100dBNA)	profunda(100dBNA)	N/N	N/N	N/N	N/N	N	N	N	N/N	NR
5	31	Masc	0	-	profunda(95dBNA)	profunda(95dBNA)	N/N	N/N	N/N	N/N	N	N	N	N/N	NR
6	37	Fem	0	-	profunda(95dBNA)	profunda(95dBNA)	M/M	N/N	N/N	N/N	N	N	N	N/N	NR
7	44	Masc	0	-	profunda(100dBNA)	profunda(100dBNA)	M/M	N/N	N/N	N/N	N	N	N	N/N	NR
8	16	Masc	0	-	profunda(95dBNA)	profunda(95dBNA)	N/N	N/N	N/N	N/N	N	N	N	N/N	NR
9	23	Masc	0	-	profunda(95dBNA)	profunda(95dBNA)	N/N	N/N	N/N	N/N	N	N	N	N/N	NR
10	9	Masc	0	-	profunda(100dBNA)	profunda(100dBNA)	N/N	N/N	N/N	N/N	N	N	M	N/N	IVS 11-7 T>G
11	42	Masc	0	-	severa(85dBNA)	severa(85dBNA)	N/N	N/N	N/N	N/N	N	N	N	N/N	NR
12	42	Fem	0	-	severa(90dBNA)	severa(90dBNA)	N/N	N/N	N/N	N/N	N	N	N	N/N	NR
13	29	Masc	0	-	profunda(95dBNA)	profunda(95dBNA)	M/M	N/N	N/N	N/N	N	N	N	N/N	NR
14	42	Masc	0	-	moderada(60dBNA)	profunda(95dBNA)	N/N	N/N	N/N	N/N	N	N	N	N/N	NR
15	23	Fem	0	-	profunda(95dBNA)	profunda(95dBNA)	N/N	N/N	N/N	N/N	N	N	N	N/N	NR
16	32	Masc	0	-	profunda(95dBNA)	profunda(95dBNA)	N/N	N/N	N/N	N/N	N	N	M	N/N	N/N
17	38	Fem	0	-	severa(85dBNA)	severa(85dBNA)	N/N	N/N	N/N	N/N	N	N	N	N/N	NR
18	15	Masc	0	-	severa(85dBNA)	severa(85dBNA)	N/N	N/N	N/N	N/N	N	N	N	N/N	NR
19	18	Fem	0	-	profunda(100dBNA)	profunda(100dBNA)	N/N	N/N	N/N	N/N	N	N	M	N/M	rs4509087 exon 07
20	38	Masc	0	-	profunda(100dBNA)	profunda(100dBNA)	N/N	N/N	N/N	N/N	N	N	N	N/N	NR
21	44	Masc	0	-	moderada(65dBNA)	moderada(65dBNA)	N/N	N/N	N/N	N/N	N	N	N	N/N	NR
22	41	Masc	0	-	profunda(95dBNA)	profunda(95dBNA)	M/M	N/N	N/N	N/N	N	N	N	N/N	NR
23	41	Masc	0	-	profunda(95dBNA)	profunda(95dBNA)	N/N	N/N	N/N	N/N	N	N	N	N/N	NR
24	26	Fem	0	-	profunda(95dBNA)	profunda(95dBNA)	M/M	N/N	N/N	N/N	N	N	N	N/N	NR
25	30	Fem	0	-	profunda(100dBN	profunda(100dBN	N/N	N/N	N/N	N/N	N	N	N	N/N	NR

(m) meses; Masc = masculino; Fem = feminino; TI = tempo internação em UTI neonatal (dias); DO = drogas ototóxicas; dBNA = decibel nível de audição; Del = deleção; (+) positivo; (-) negativo; NR = não realizado; N/N = Homozigoto normal; M/M = Homozigoto mutante; N/M = Heterozigoto; V271/N = Heterozigoto para V271; N = Normal; M = Mutante; IVS 11-7 T>G = mudança da base T para base G no intron 11; rs4509087 exon 07 = SNP T/C no exon 07.

Tabela 7 - Grupo D - Indivíduos adultos com surdez e positivos para mutação A1555G.

Indivíduo	Idade (anos)	Sexo	TI	DO	Tipo de perda auditiva		GJB2		GJB6		Mutações mitocondriais			TRMU G28T	MTO1
					Orelha direita	Orelha esquerda	35delG	outros	Del 1	Del 2	A1555G	C1494T	A827G		
1	25	Fem	0	-	profunda(100dBNA)	profunda(100dBNA)	N/N	N/N	N/N	N/N	M	N	N	N/N	rs4509087 exon 07 e rs7766570 intron 05
2	30	Fem	0	-	profunda(100dBNA)	profunda(100dBNA)	N/N	N/N	N/N	N/N	M	N	N	N/N	rs7766570 intron 05
3	12	Masc	0	-	profunda(100dBNA)	profunda(100dBNA)	N/N	N/N	N/N	N/N	M	N	N	N/N	rs7766570 intron 05
4	5	Fem	0	-	profunda(100dBNA)	profunda(100dBNA)	N/N	N/N	N/N	N/N	M	N	M	N/M	rs4509087 exon 07 e IVS 11-7 T>G
5	10	Fem	0	-	profunda(100dBNA)	profunda(100dBNA)	N/N	N/N	N/N	N/N	M	N	N	N/N	rs4509087 exon 07
6	26	Masc	0	-	profunda(100dBNA)	profunda(100dBNA)	N/N	N/N	N/N	N/N	M	N	N	N/N	rs7766570 intron 05
7	45	Fem	0	-	profunda(100dBNA)	profunda(100dBNA)	N/N	N/N	N/N	N/N	M	N	N	N/N	N/N
8	21	Fem	0	-	profunda(100dBNA)	profunda(100dBNA)	N/N	N/N	N/N	N/N	M	N	N	N/N	N/N
9	38	Fem	0	-	profunda(100dBNA)	profunda(100dBNA)	N/N	N/N	N/N	N/N	M	N	N	N/N	rs4509087 exon 07, rs7766570 intron 05 e IVS 11-7 T>G
10	35	Fem	0	-	profunda(100dBNA)	profunda(100dBNA)	N/N	N/N	N/N	N/N	M	N	N	N/N	rs4509087 exon 07 e rs7766570 intron 05

(m) meses; Masc = masculino; Fem = feminino; TI = tempo internação em UTI neonatal (dias); DO = drogas ototóxicas; dBNA = decibel nível de audição; Del = deleção; (+) positivo; (-) negativo; NR = não realizado; N/N = Homozigoto normal; N/M = Heterozigoto; N = Normal; M = Mutante; rs4509087 exon 07 = SNP T/C no exon 07; rs7766570 intron 05 = SNP G/A no intron 05; IVS 11-7 T>G = mudança da base T para base G no intron 11.

Alterações estudadas:

A fim de se estudar genes nucleares moduladores e sua associação a mutações mitocondriais, inicialmente foi realizado o rastreamento dos genes *GJB2* e *GJB6*, os quais representam as principais causas de surdez de origem genética.

1. Mutação 35delG no gene *GJB2*

Inicialmente, os indivíduos foram analisados quanto à presença da mutação 35delG no gene *GJB2*, pela técnica de PCR alelo-específico (AS-PCR). A mutação 35delG foi detectada em 5 indivíduos do GRUPO C (indivíduos 06, 07, 13, 22 e 24) em homozigose (Figura 15).

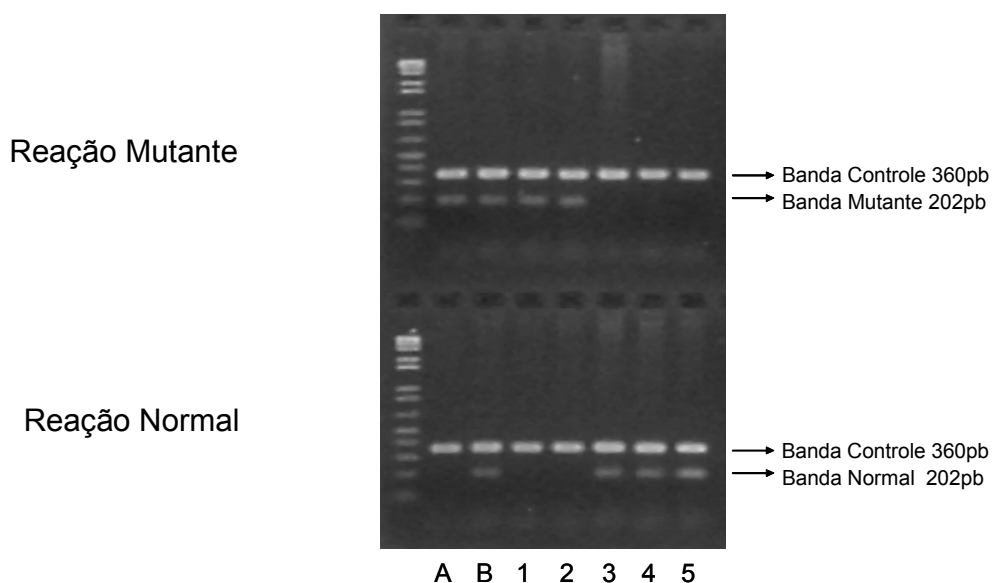


Figura 15 - Gel de agarose 1,5% mostrando os padrões de banda Controle, Mutante e Normal para a mutação **35delG** em 5 indivíduos. **A**: Controle Homozigoto mutante. **B**: Controle Heterozigoto. **1 e 2**: indivíduos com a mutação **35delG** em homozigose. **3, 4 e 5**: indivíduos homozigotos normais.

2. Detecção das deleções $\Delta(GJB6-D13S1830)$ e $\Delta(GJB6-D13S1854)$

Foram rastreados, quanto à presença das deleções envolvendo o gene *GJB6*, todos os pacientes com surdez sensorineural não-sindrômica. Porém, não foram encontradas as deleções $\Delta(GJB6-D13S1830)$ e $\Delta(GJB6-D13S1854)$ em nenhuma das amostras estudadas. A figura 16 abaixo ilustra os resultados obtidos por meio da PCR Multiplex utilizada para detecção das deleções.

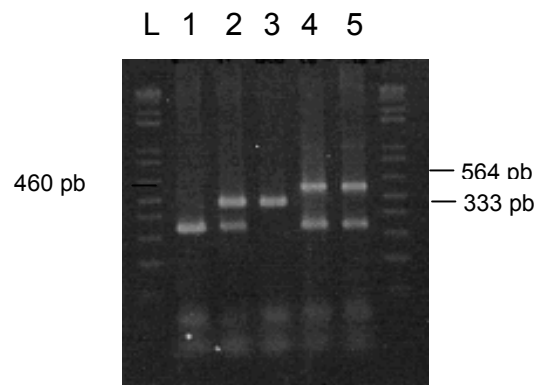


Figura 16 - Resultado da técnica de PCR para detecção das deleções $\Delta(GJB6-D13S1830)$ e $\Delta(GJB6-D13S1854)$. (L) marcador *ladder* 100pb Gibco BRL[®]; (1) indivíduo normal; (2) $\Delta(GJB6-D13S1830)/N$; (3) $\Delta(GJB6-D13S1830)/\Delta(GJB6-D13S1830)$; (4) e (5) $\Delta(GJB6-D13S1854)/N$.

3. Rastreamento de Mutações no Gene *GJB2*

O seqüenciamento completo do gene *GJB2* foi realizado em todos os indivíduos, para que se fossem excluídas as principais mutações como causa da surdez (Figura 17).

Observou-se no gene *GJB2* o polimorfismo V27I em 1 indivíduo do GRUPO A, em 2 do GRUPO B e em 1 indivíduo do GRUPO C. Foi detectada também a mutação V37I em 1 paciente do GRUPO A. Nenhuma mutação no gene *GJB2* foi detectada nos pacientes do GRUPO D.

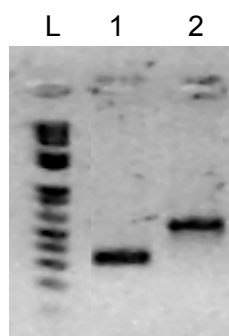


Figura 17 - Gel de agarose mostrando os dois fragmentos do gene *GJB2* amplificados pela técnica de PCR. **(L)** *Ladder* de 1KB GIBCO BRL®; **(1)** fragmento de 332 pb; **(2)** fragmento de 547 pb.

3.1. Polimorfismo V27I

No indivíduo 16 do GRUPO A foi detectado polimorfismo V27I em homozigose. Já nos indivíduos 12 e 16 do GRUPO B e no indivíduo 1 do GRUPO C este polimorfismo foi encontrado em heterozigose. O polimorfismo V27I trata-se da substituição do aminoácido valina por isoleucina no códon 27. Esta mutação é considerada um polimorfismo neutro e está situada no primeiro domínio transmembrânico da proteína. A variação da base G para a base A na posição 27 do gene *GJB2* foi previamente descrita por Kelley e colaboradores em 1998. A figura 18 mostra o resultado obtido para o paciente 16. Estudos populacionais indicam que não há correlação entre a alteração V27I e a perda auditiva, uma vez que esta é observada na população normal. Em japoneses observa-se uma freqüência extremamente alta desse polimorfismo (Abe *et al.*, 2000).

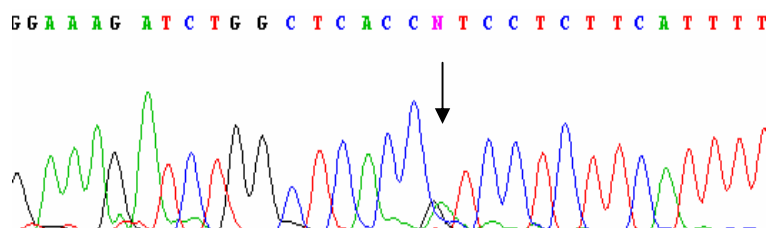


Figura 18 – Eletroferograma demonstrando um indivíduo heterozigoto para o polimorfismo V27I.

3.2. Mutação V37I

A mutação V37I foi detectada apenas no indivíduo 2 do GRUPO A em heterozigose. Esta mutação trata-se de uma transição na posição 109, G → A levando à substituição do aminoácido valina para isoleucina no códon 37 (Figura 19). Ela ocorre no primeiro domínio transmembrânico da conexina 26. Esta mutação foi descrita previamente por Kelley *et al.*, em 1998.

Inicialmente essa mutação foi considerada um polimorfismo sem efeito patogênico, uma vez que havia sido encontrada em heterozigose em um indivíduo controle não portador de perda auditiva. Porém, a conservação de valina nesta posição entre diferentes conexinas e a identificação de dois irmãos com perda auditiva com genótipo V37I/V95M, assim como de um indivíduo surdo homozigoto para a mutação V37I sugere que esta substituição seja crítica (Rabionet *et al.*, 2000). Entretanto, como a mutação foi encontrada em heterozigose, ainda não é possível confirmar se essa alteração está relacionada com a perda auditiva nesse indivíduo, uma vez que, 10 a 40% dos indivíduos com surdez podem apresentar mutações monoalélicas no gene *GJB2*.

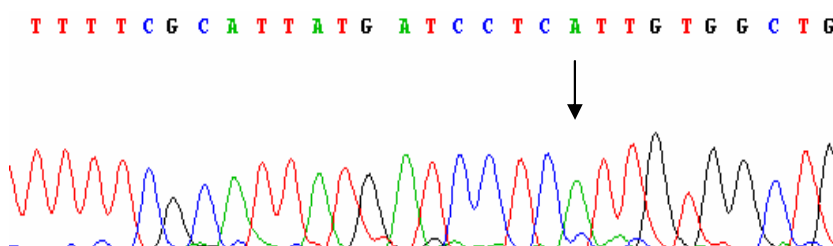


Figura 19 – Eletroferograma mostrando a mutação V37I no indivíduo 2 do grupo B.

4. Rastreamento de mutações mitocondriais

4.1. Mutação Mitocondrial A1555G

Todos os grupos foram rastreados quanto à presença da mutação A1555G na subunidade *12S rRNA*. Nenhum indivíduo foi positivo para essa mutação. O GRUPO D constitui-se de pacientes portadores da mutação A1555G, os quais foram previamente analisados.

A análise dessa mutação foi realizada por análise de restrição. Os fragmentos de 1100, 516 e 444pb representam a seqüência normal, ao passo no indivíduo mutante a alteração abole um sítio de *BsmA I* apresentando somente os fragmentos de 1616 e 444pb. A Figura 20 mostra os resultados positivo e negativo para a mutação A1555G.

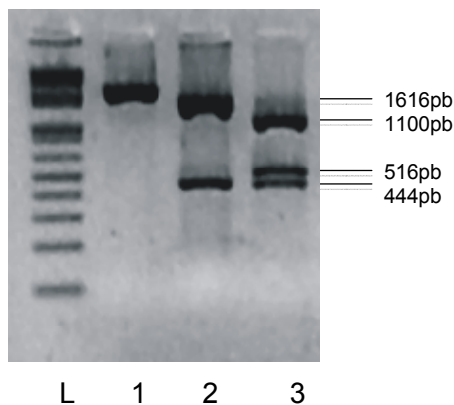


Figura 20 – Resultado da digestão dos fragmentos contendo a região A1555G no gene *12S rRNA* com a enzima *BsmA I*. (1) Fragmento sem digerir; (2) Indivíduo portador da mutação A1555G; (3) Indivíduo normal L: *Ladder* marcador 1Kb *Plus*.

4.2. Mutação Mitocondrial C1494T no gene *12S rRNA*

Para o rastreamento da mutação C1494T foi amplificado um fragmento de 441 pb do gene, pela técnica de PCR seguida por análise de restrição.

Quando a mutação C1494T está presente, há a perda do sítio de restrição de *Hph* I e o fragmento de 441 pb não é digerido. Na ausência da mutação o fragmento de 441 pb é cortado em 2 fragmentos: 370 pb e 71 pb (Figura 21). Nenhum indivíduo foi encontrado com esta mutação neste estudo.

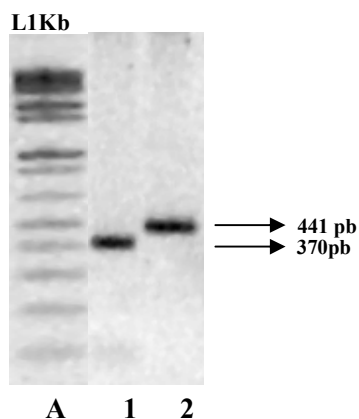


Figura 21 - Fragmentos da digestão da subunidade *12S rRNA* com a enzima *Hph* I, em gel de agarose 1,5%, corado com brometo de etídeo. (A) ladder de 1KB GIBCO BRL®; (1) - fragmento digerido (pacientes sem a mutação C1494T). (2) – fragmento digerido. Paciente controle positivo para a mutação C1494T.

4.3. Mutação Mitocondrial A827G no gene 12S rRNA

Todos os grupos foram rastreados quanto à presença da mutação A827G no gene 12S rRNA.

Dos 85 indivíduos estudados, 10 apresentaram a mutação A827G na subunidade 12S rRNA em homoplasmia. Desses casos, 2 são do GRUPO A (pacientes 07 e 20), sendo que o indivíduo 07 apresenta também a mutação G28T no gene nuclear *TRMU* em heterozigose. No GRUPO B, a mutação A827G foi encontrada em 2 indivíduos, pacientes 07 e 20. No GRUPO C, 5 indivíduos apresentam a mutação A827G, 02, 03, 10, 16 e 19, sendo este último também positivo para a mutação G28T em heterozigose. E, por fim, no GRUPO D, apenas o indivíduo 04 é positivo para esta mutação, sendo positivo também para a mutação mitocondrial A1555G e para a mutação G28T no gene nuclear *TRMU*. A Figura 22 mostra os eletroferogramas de indivíduos normal e portador da mutação A827G.

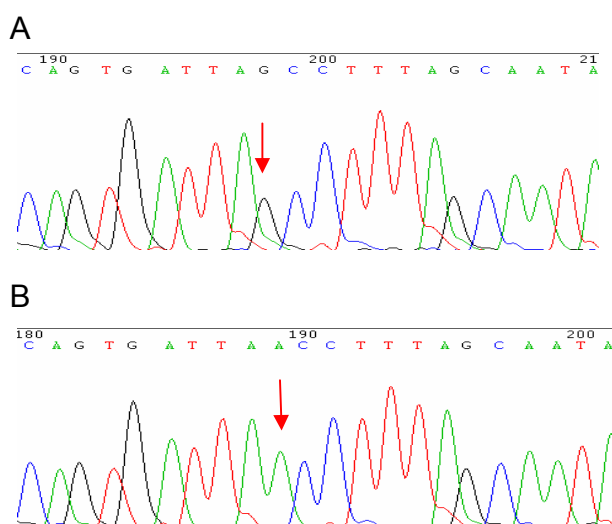


Figura 22 – Eletroferograma mostrando a mutação pontual A827G. (A) Indivíduo com a mutação A827G; (B) Indivíduo com seqüência normal.

5. Estudo em genes moduladores nucleares

5.1. Mutação G28T no gene nuclear *TRMU*

Todos os grupos foram rastreados quanto à presença da mutação G28T no gene nuclear *TRMU*. No GRUPO A, os indivíduos 05, 07 e 19 apresentaram a mutação G28T em heterozigose, sendo o indivíduo 07 positivo também para a mutação mitocondrial A827G. No GRUPO B, a mutação no gene *TRMU* não foi encontrada. No GRUPO C, apenas o indivíduo 19 apresentou a mutação G28T, sendo positivo também para a mutação mitocondrial A827G. No GRUPO D, o paciente 04 foi positivo para três mutações, uma no gene nuclear *TRMU* (G28T) e duas no gene mitocondrial (A827G e A1555G). A Figura 23 ilustra o resultado obtido na análise da mutação G28T no gene *TRMU*, na qual na presença da mutação são gerados os fragmentos de 336 e 131pb por digestão utilizando a enzima *Bsp1286 I*.

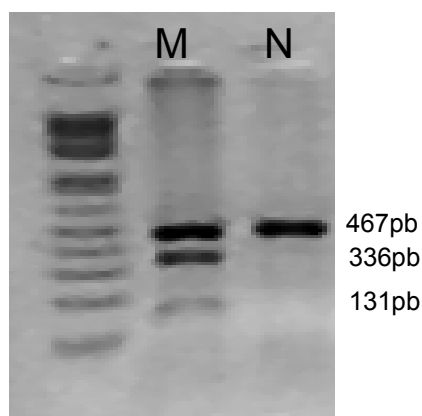


Figura 23 – Gel de agarose apresentando o resultado da digestão do fragmento de 467pb com a enzima *Bsp1286 I*. **(M)** - Indivíduo heterozigoto para a mutação G28T, apresentando os fragmentos 467, 336 e 131pb; **(N)** - Indivíduo homozigoto normal.

5.2. Rastreamento de mutações no gene nuclear *MTO1*

O rastreamento de mutações no gene *MTO1*, composto por 12 exons, foi realizado pela técnica de DHPLC. Uma vez encontrada alguma alteração por meio da técnica de DHPLC, os fragmentos correspondentes foram seqüenciados para a busca de mutações.

5.2.1. Resultados do rastreamento de mutações pela técnica de DHPLC:

Os resultados a seguir apresentam as alterações observadas em diferentes exons do gene nuclear *MTO1*. A Figura 24 a seguir mostra o resultado da técnica de DHPLC para o exon 5 do gene *MTO1* de alguns indivíduos dos grupos B e C na temperatura de 56,1°C.

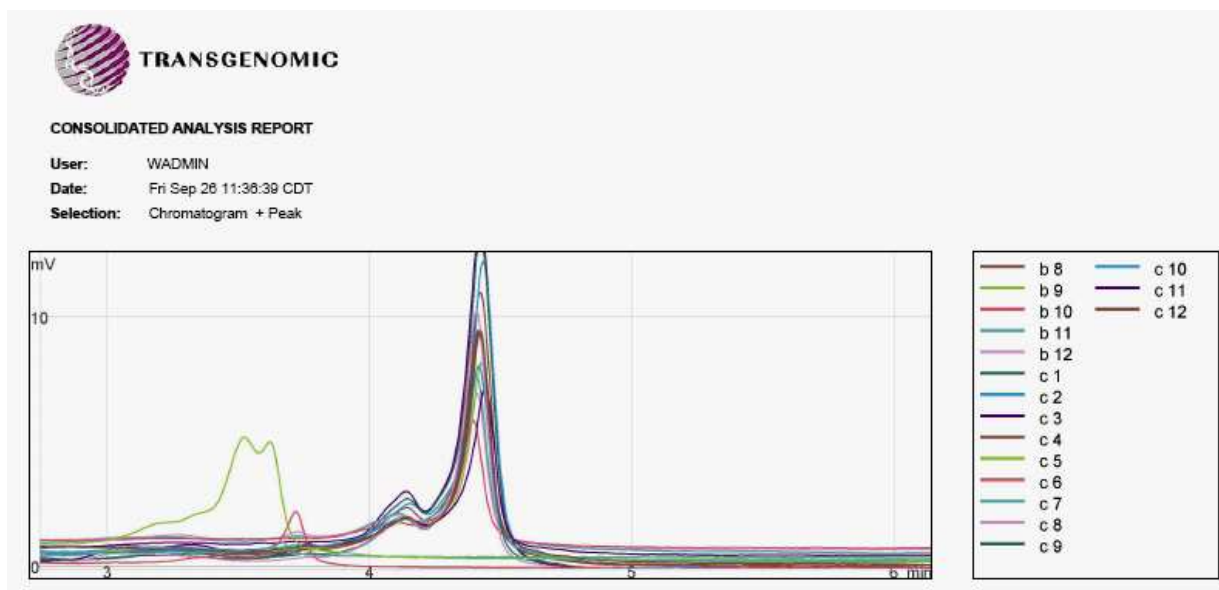


Figura 24 – Resultado da cromatografia obtida pela técnica de DHPLC na corrida do exon 5 na temperatura de 56,1°C.

O indivíduo 9 do grupo D apresenta um padrão alterado de corrida, como pode ser melhor visualizado em detalhe na figura 25, na comparação de dois padrões diferentes (B9-indivíduo 9 do grupo D e C10-indivíduo 6 do grupo D).

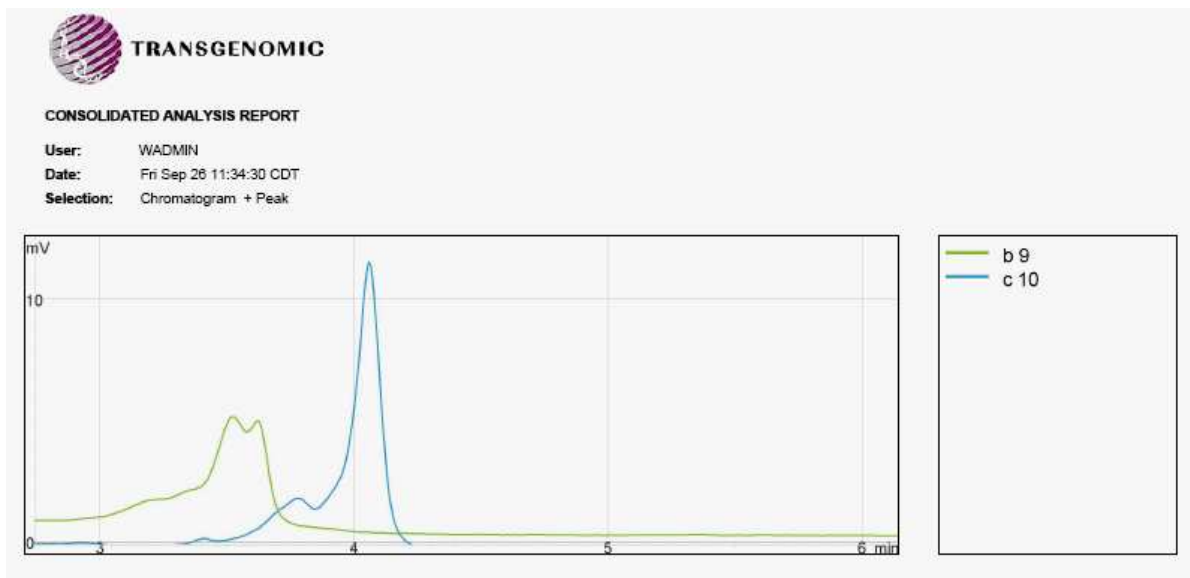


Figura 25 – Resultado da cromatografia obtida pela técnica de DHPLC na corrida do exon 5 na temperatura de 56,1°C, mostrando os dois padrões diferentes nos indivíduos (B9-indivíduo 9 do grupo D e C10-indivíduo 6 do grupo D).

Na repetição da técnica na temperatura de 58°C pôde-se observar três indivíduos com padrões alterados, B9 (indivíduo 9 do grupo D), B10 (indivíduo 10 do grupo D) e B11 (indivíduo 3 do grupo D) (Figura 26).

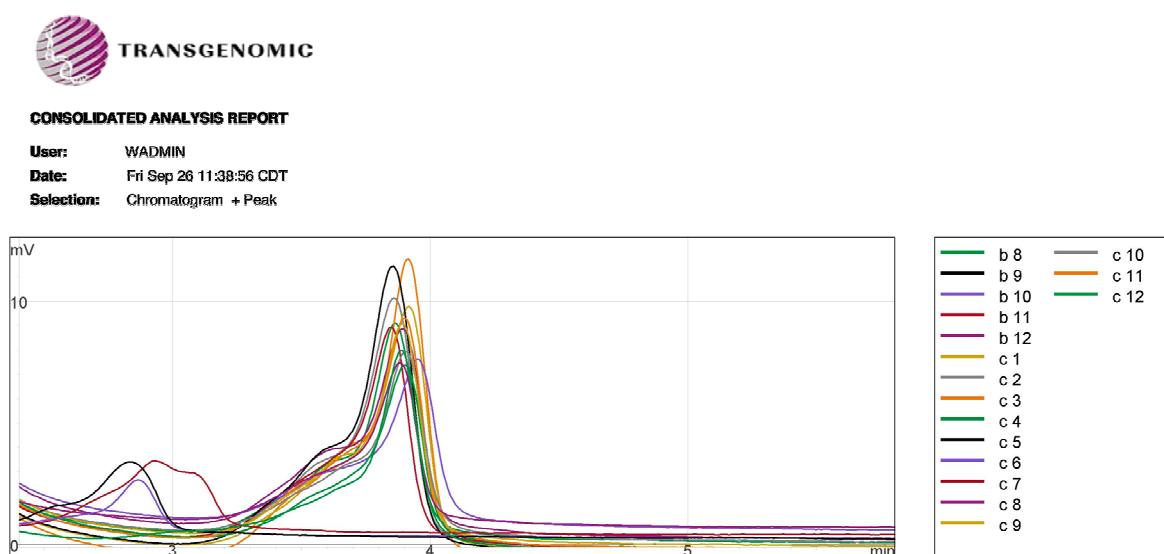


Figura 26 – Resultado da cromatografia obtida pela técnica de DHPLC na corrida do exon 5 na temperatura de 58°C, mostrando os três padrões diferentes nos indivíduos B9(indivíduo 9 do grupo D), B10 (indivíduo 10 do grupo D) e B11 (indivíduo 3 do grupo D).

A Figura 27 mostra o rastreamento por DHPLC a 56.2°C do exon 07 do gene *MTO1* dos indivíduos 01, 02, 03, 05, 06 e 07 do GRUPO D. Nota-se dois padrões diferentes, o padrão C09 (indivíduo 01 do GRUPO D) e o padrão C10 (indivíduo 05 do GRUPO D).

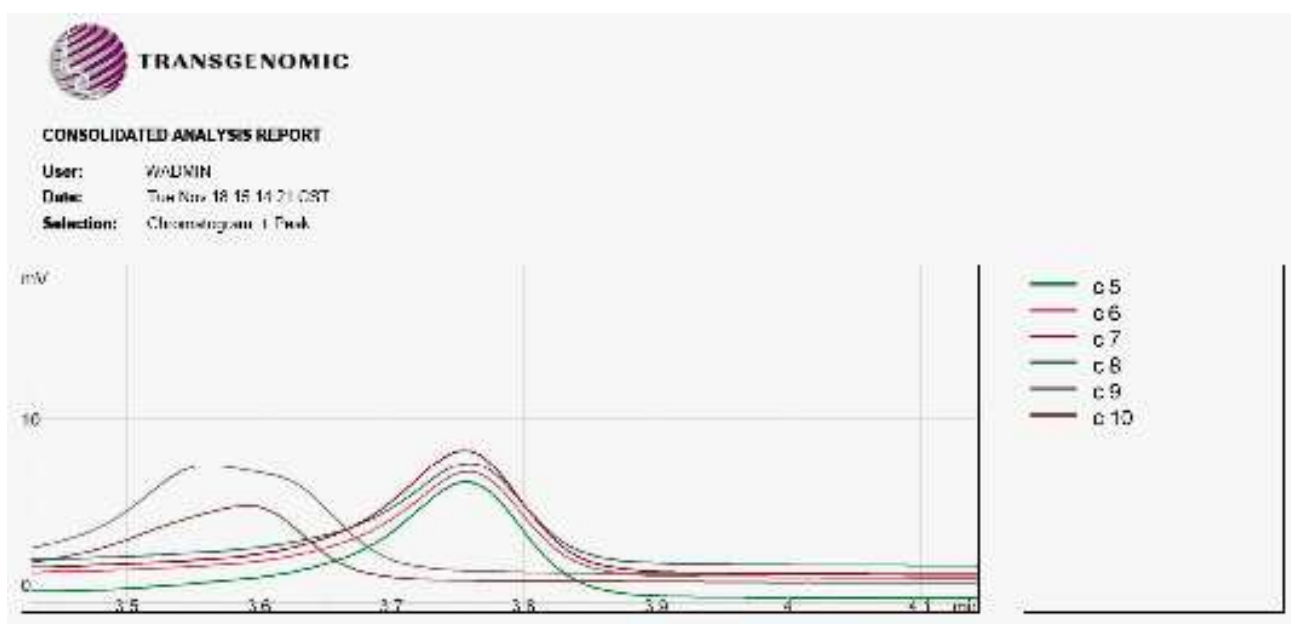


Figura 27 – Resultado da cromatografia obtida pela técnica de DHPLC na corrida do exon 07 na temperatura de 56.2°C, mostrando os dois padrões diferentes nos indivíduos C9 (indivíduo 01 do grupo D), C10 (indivíduo 05 do grupo D).

No rastreamento do exon 11 a 55.9°C dos indivíduos 01, 02, 03, 05 e 09 do GRUPO D e do indivíduo 10 do GRUPO C, dois padrões diferentes foram observados, o D6 (indivíduo 09 do GRUPO D) e o D7 (indivíduo 10 do GRUPO C) (Figura 28).

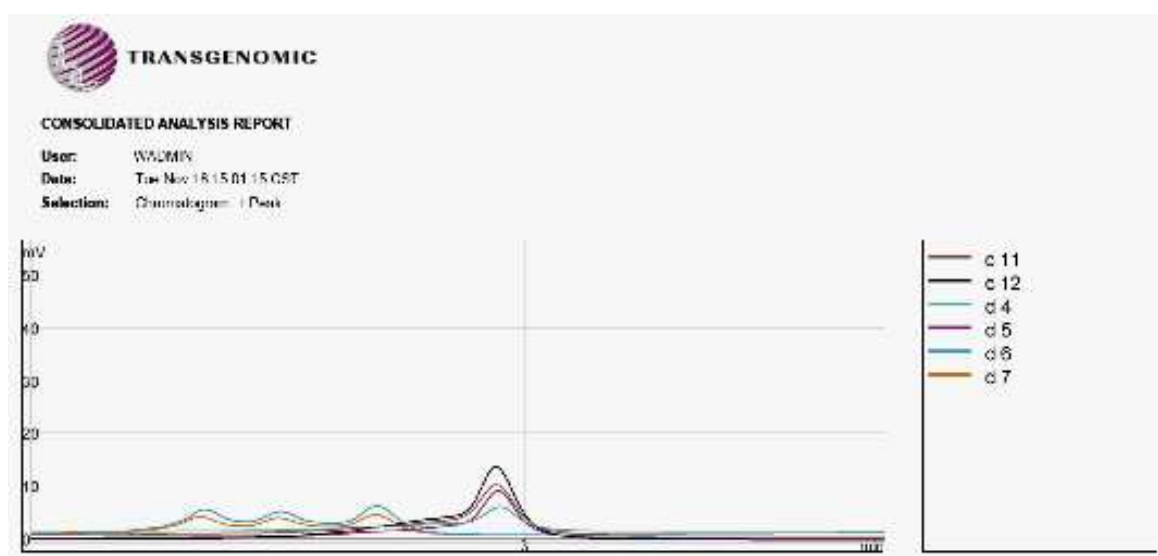


Figura 28 – Resultado da cromatografia obtida pela técnica de DhPLC na corrida do exon 11 na temperatura de 55.9°C, mostrando os dois padrões diferentes nos indivíduos D6 (indivíduo 09 do grupo D), D7 (indivíduo 10 do grupo C).

5.2.2. Alterações observadas no seqüenciamento

A partir de alterações detectadas pela técnica de DHPLC, os indivíduos nos quais foram observados padrões alterados de corrida cromatográfica tiveram seu fragmento do gene *MTO1* seqüenciado. Foi então observado o SNP rs7766570, localizado no intron 5 (seis bases após o exon 05), consistindo da troca da base G pela base A. A Figura 29 ilustra o resultado do seqüenciamento. O SNP rs7766570 foi observado em 6 indivíduos do GRUPO D, sendo esses, 1, 2, 3, 6, 9 e 10.

SNP rs7766570-intron 05

G/A

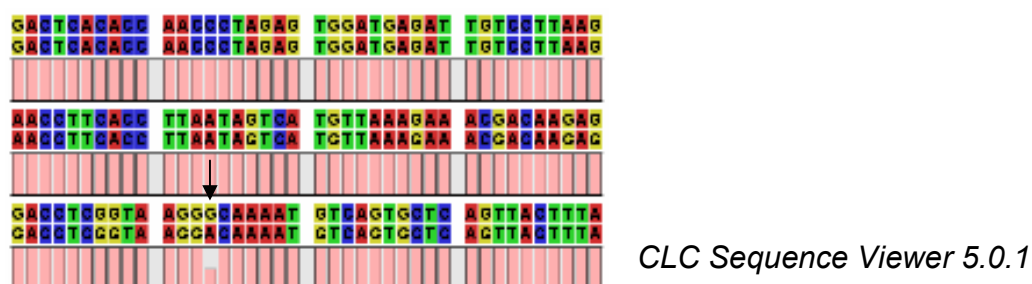
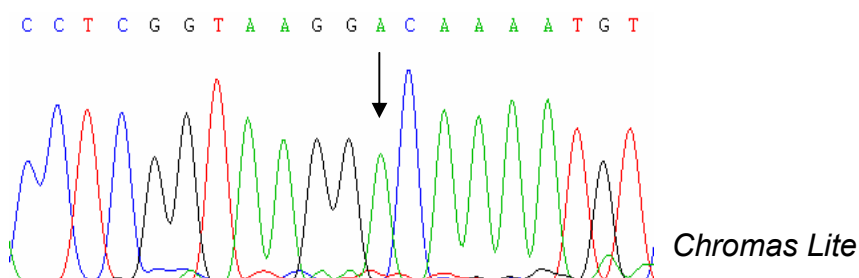
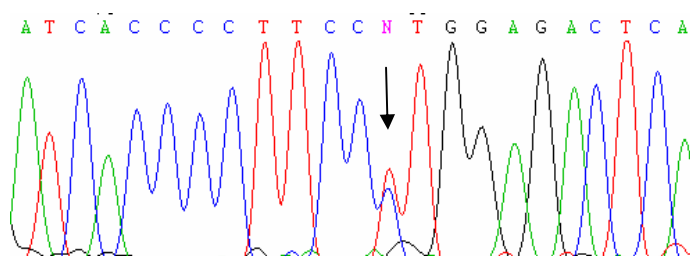


Figura 29 - Eletroferograma do SNP rs7766570 mostrando um indivíduo homocigoto para essa alteração.

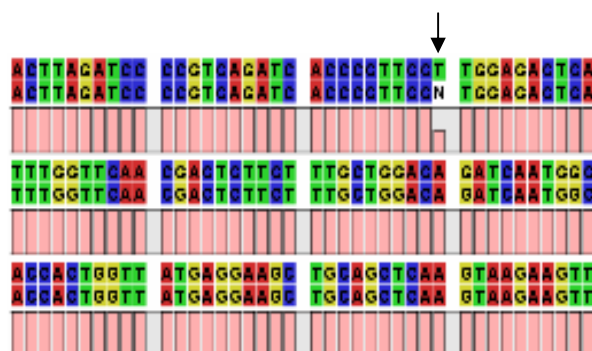
Além do polimorfismo mencionado, o SNP rs4509087 (Figura 30), o qual refere-se à troca da base T para a base C, foi encontrado no exon 07 no indivíduo 19 do GRUPO C, que também apresenta a mutação G28T em heterozigose e a mutação mitocondrial A827G, e em 5 indivíduos do GRUPO D, (1, 4, 5, 9 e 10). Pôde-se observar que os indivíduos 1, 9 e 10 do GRUPO D também apresentam o SNP rs7766570.

SNP rs4509087-exon 07

T/C



Chromas Lite



CLC Sequence Viewer 5.0.1

Figura 30 - Eletroferograma do SNP rs4509087 mostrando um indivíduo heterozigoto para essa alteração.

A alteração IVS 11 – 7 T>G (Figura 31) trata-se da troca da base timina pela base guanina no intron 11, porém sete bases antes do exon 12. Esta mutação foi observada em 3 indivíduos, sendo 2 (pacientes 4 e 9) do GRUPO D e 1 (paciente 10) do GRUPO C. O indivíduo 9 do GRUPO D, além desta alteração, também apresentou o SNP rs7766570 no intron 05 e o SNP rs4509087 no exon 07. Já o indivíduo 04 apresentou apenas o SNP rs4509087 além desta alteração no intron 11.

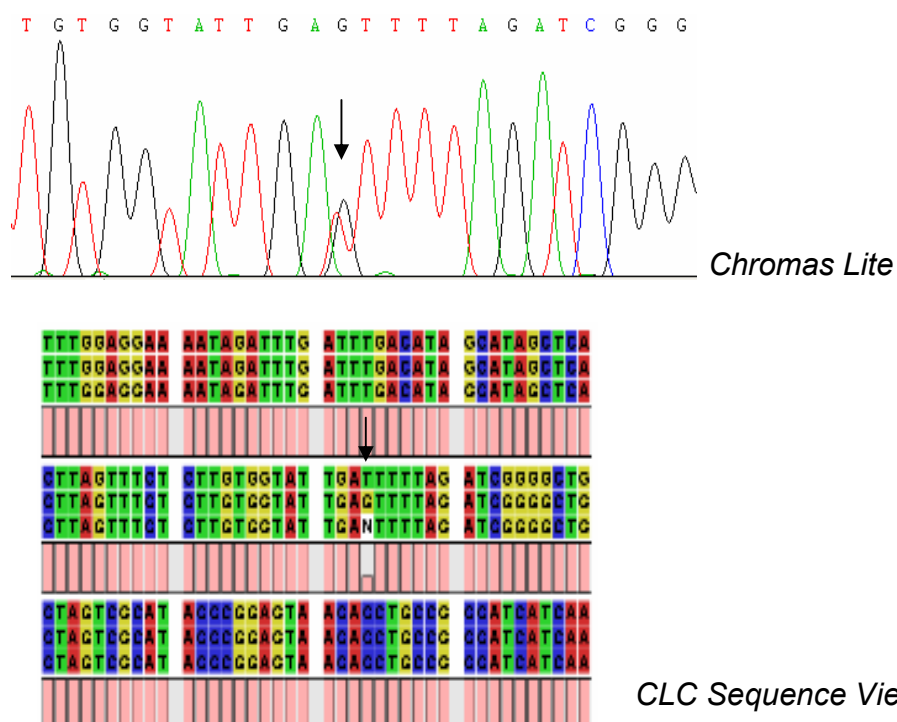


Figura 31 - Eletroferograma da alteração IVS 11 – 7 T>G mostrando um indivíduo heterozigoto para essa alteração.

A mutação I392M (Figura 32) no exon 06 foi detectada no indivíduo 07 do GRUPO B. Esta mutação trata-se da troca de uma base citocina por uma base guanina, fazendo com que mude o aminoácido de isoleucina para metionina na posição 392 do gene nuclear *MTO1*.

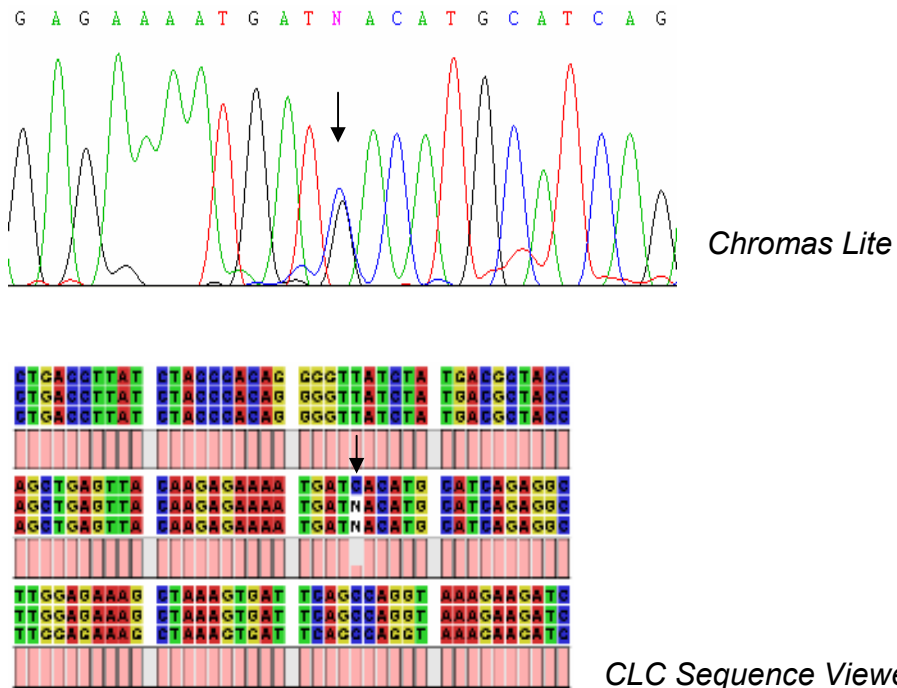


Figura 32 - Eletroferograma da alteração I392M no exon 06 mostrando um indivíduo homozigoto para essa alteração.

A tabela 8 a seguir mostra o resultado referente ao gene nuclear *MTO1*.

Tabela 8 – Resultado referente ao gene nuclear *MTO1*. Pac. = pacientes; N = indivíduo normal; SNP = do inglês *Single Nucleotide Polimorphism*.

GRUPOS	PAC.	EXONS											
		01	02	03	04	05	06	07	08	09	10	11	12
A	07	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
	20	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
B	07	N	N	N	N	N	I392M	N	N	N	N	N	N
	20	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
C	02	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
	03	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
	10	N	N	N	N	N	N	N	N	N	IVS 11-7 T>G	N	N
	16	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
	19	N	N	N	N	N	N	SNP rs4509087	N	N	N	N	N
D	01	N	N	N	N	SNP rs7766570-intron05	N	SNP rs4509087	N	N	N	N	N
	02	N	N	N	N	SNP rs7766570-intron05	N	N	N	N	N	N	N
	03	N	N	N	N	SNP rs7766570-intron05	N	N	N	N	N	N	N
	04	N	N	N	N	N	N	SNP rs4509087	N	N	N	IVS 11-7 T>G	N
	05	N	N	N	N	N	N	SNP rs4509087	N	N	N	N	N
	06	N	N	N	N	SNP rs7766570-intron05	N	N	N	N	N	N	N
	07	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
	08	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
	09	N	N	N	N	SNP rs7766570-intron05	N	SNP rs4509087	N	N	N	IVS 11-7 T>G	N
	10	N	N	N	N	SNP rs7766570-intron05	N	SNP rs4509087	N	N	N	N	N

DISCUSSÃO

DISCUSSÃO

O objetivo principal do trabalho foi estudar a possível alteração no fenótipo da perda auditiva causada por mutações mitocondriais por genes moduladores, seja pela interação com ototóxicos, grau de perda, início do acometimento, etc. Entretanto, não foram observadas alterações nos genes estudados que pudessem comprovar essas interações. Sabe-se que o haplótipo mitocondrial também pode ter um papel importante na penetrância das mutações mitocondriais, como é perfeitamente observado em outras doenças, como a Neuropatia Óptica de Leber (LHON), na qual mutações primárias no gene mitocondrial *ND4* são moduladas por mutações no gene também mitocondrial *ND6*, resultando em diferença na gravidade dos sinais clínicos (Torrioni *et al.*, 1997).

Os antibióticos aminoglicosídeos são drogas amplamente usadas para controlar infecções bacterianas, especialmente em países desenvolvidos. Os aminoglicosídeos são conhecidos por exercer seus efeitos antibacterianos diretamente pela ligação à subunidade 16S *rRNA* do ribossomo bacteriano, causando falha na tradução ou terminação prematura da síntese protéica (Noller, 1991).

O sítio A do ribossomo é o alvo primário dos antibióticos aminoglicosídeos. Como os ribossomos mitocondriais humanos dividem muitas similaridades com os ribossomos bacterianos, um dos primeiros alvos para os aminoglicosídeos nas células de mamíferos é a subunidade menor do rRNA (12S *rRNA*) do ribossomo mitocondrial.

Quando administrados em doses altas ou por longo período, essas drogas podem ficar concentradas nos fluidos da cóclea e potencialmente desencadear a ototoxicidade. Clinicamente, alguns pacientes desenvolvem surdez após tratamento com doses convencionais, ou mesmo com uma única dose da droga ou até

mesmo por um curto período. Esses casos de ototoxicidade por aminoglicosídeos podem ser resultado de uma predisposição genética com penetrância variável. Depois da administração, o acúmulo de aminoglicosídeos na mitocôndria da orelha interna resulta na inibição da síntese protéica mitocondrial pela interação com o gene *12S rRNA*, o qual causa a diminuição da produção de ATP nas células ciliadas da cóclea (Guan, 2004). Conseqüentemente, os poros de permeabilidade mitocondrial abrem, levando à ativação da apoptose. Isso resulta na disfunção coclear ou morte da célula dando origem à perda auditiva. Portanto, a manutenção do mecanismo de audição normal é altamente dependente da produção de ATP pela fosforilação oxidativa da mitocôndria.

As mutações mitocondriais A1555G e C1494T, no gene *MTRNR1*, estão localizadas no sítio de codificação aminoacil-tRNA (sítio A) do ribossomo mitocondrial, onde a interação códon/anti-códon ocorre e justamente onde, na posição correspondente do gene *16S rRNA* de *E.coli*, o aminoglicosídeo interage para inibir a síntese de proteínas bacterianas. Essas mutações, portanto, interferem significativamente na expressão do produto gênico. Além da atuação dos antibióticos aminoglicosídeos nessa região, tais alterações provocam uma mudança conformacional do sítio A da subunidade **12S rRNA**, tornando menos eficiente a interação nesse sítio dos tRNAs hipermodificados pelos genes nucleares *TRMU* e *MTO1*.

O novo pareamento de bases G-C ou U-A criado pelas mutações A1555G e C1494T no sítio A da subunidade *12S rRNA* facilita a ligação a aminoglicosídeos, causando sensibilidade a essas drogas e levando à disfunção ou morte celular induzindo a perda auditiva.

A mutação A827G no gene *MTRNR1* também tem sido associada tanto a ototoxicidade por aminoglicosídeos quanto à perda auditiva não-sindrômica em indivíduos não aparentados, indicando seu envolvimento na patogenicidade da

surdez. A mutação A827G está localizada no sítio A da subunidade menor 12S *rRNA* do ribossomo mitocondrial, que é altamente conservada evolutivamente em humanos, ratos, camundongos, bovinos e *Xenopus laevis*. Em decorrência da mutação A827G, é possível que a alteração da estrutura terciária ou quaternária desse rRNA possa levar à disfunção mitocondrial, desempenhando assim um papel na patogenicidade da perda auditiva e na hipersensibilidade a aminoglicosídeos. A penetrância incompleta da perda auditiva indica que a mutação A827G sozinha não é suficiente para produzir o fenótipo clínico da surdez, necessitando do envolvimento de fatores modificadores, como os aminoglicosídeos, haplótipos mitocondriais ou genes nucleares modificadores para a expressão fenotípica (Xing *et al.*, 2006).

No presente estudo foram inicialmente analisadas as principais alterações envolvidas na surdez não-sindrômica hereditária, tais como, alterações nos genes *GJB2* e *GJB6*. Além disso, foram estudadas as mutações mitocondriais relacionadas à perda auditiva e uso de drogas ototóxicas, A1555G, C1494T e A827G, com o objetivo principal de se avaliar o efeito dessas alterações em indivíduos com e sem histórico de uso de aminoglicosídeos e com variados graus de perda auditiva, assim como, sua associação a genes que possam provavelmente modular a expressão fenotípica dessas alterações, os genes nucleares *TRMU* e *MTO1*.

Mutações no gene nuclear *MTO1* e a mutação G28T no gene *TRMU* foram analisadas nos indivíduos estudados na tentativa de se correlacionar a mutações mitocondriais ao fenótipo dos indivíduos estudados. No grupo A, composto por recém-nascidos de alto risco, os quais fizeram uso de antibióticos principalmente aminoglicosídeos (Anexo 3), foram encontrados dois indivíduos com a mutação A827G. Entretanto, somente um deles apresentou também a mutação G28T, mas em heterozigose e nenhum apresentou alterações no gene *MTO1*. Nota-se que o indivíduo 7 que apresenta a mutação A827G e a mutação G28T apresenta perda

sensorineural severa, enquanto que o outro paciente (indivíduo 20), com ausência da mutação G28T apresentou perda leve. Evidentemente que são necessários estudos funcionais para se comprovar essa modulação no fenótipo, nesse caso, o grau de perda, mas esses resultados podem ser importantes.

Entre os recém-nascidos de alto risco sem perda auditiva (Grupo B), dois indivíduos apresentaram a mutação A827G, mas nenhum a alteração G28T. Um dos indivíduos positivos para a mutação A827G (indivíduo 07) apresentou também a alteração I392M no exon 06 do gene *MTO1*. Provavelmente esta alteração não tem efeito no fenótipo da surdez, uma vez que o indivíduo em questão é ouvinte. Apesar desses indivíduos também terem feito uso de antibióticos aminoglicosídeos, é provável que nesses casos o *background* genético desses indivíduos não tenha propiciado o desenvolvimento da perda.

A mutação A827G foi observada em 5 indivíduos com surdez nascidos a termo (Grupo C). Dentre esses, o indivíduo 19 também apresentou a mutação G28T em heterozigose, e um polimorfismo, o SNP rs4509087, encontrado no exon 07 do gene nuclear *MTO1*. Ainda entre esses 5 casos positivos para a mutação A827G, o indivíduo 10 também apresentou a alteração IVS 11 – 7 T>G no gene *MTO1*. Esses dois casos possuem perda auditiva profunda. Porém, os outros 3 casos (indivíduos 02, 03 e 16) nos quais foi observada apenas a mutação mitocondrial A827G, também apresentam perda auditiva em grau profundo. Então é provável que tanto o SNP rs4509087 no exon 07 quanto a alteração IVS 11 – 7 T>G não tenham efeito no fenótipo da perda auditiva, ou seja, não estejam modulando a expressão da mutação A827G. É possível até que a surdez nesses indivíduos não esteja relacionada à mutação A827G, mas sim a outros genes ou fatores ambientais.

Ainda considerando os indivíduos do grupo C, 5 indivíduos (06, 07, 13, 22 e 24) exibem perda auditiva devido à mutação 35delG em homozigose e nos demais

indivíduos a etiologia permanece ainda não esclarecida. A mutação V27I no gene *GJB2* é considerada um polimorfismo neutro e foi encontrada em heterozigose no indivíduo 01 do GRUPO C.

Apesar de existirem prévios estudos apontando para a patogenicidade da mutação A827G, em uma família com 30 indivíduos provenientes da Argentina, somente 6 apresentaram surdez (20%). É fato que, a mutação A827G sozinha não é suficiente para desenvolver esse fenótipo, mas os dados obtidos até o momento não são definitivos para comprovar a modulação pela mutação G28T, sendo necessários estudos complementares. Cabe ainda ressaltar que no presente estudo, a mutação G28T não foi observada em homozigose em nenhum dos casos estudados, mas sim em heterozigose.

Acredita-se que a mutação G28T em homozigose deva agir em sinergia com a mutação mitocondrial A1555G, diminuindo o processo de tradução mitocondrial abaixo do limiar de patogenicidade e, assim, causando o fenótipo.

O grupo D estudado, o qual se refere a indivíduos com surdez sem histórico de uso de aminoglicosídeos e positivos para a mutação A1555G, foi o grupo que apresentou maior número de alterações no gene nuclear *MTO1*, o SNP rs7766570 no intron 05, o SNP rs4509087 no exon 07 e a alteração IVS 11 – 7 T>G.

O indivíduo 04 do GRUPO D foi o que apresentou maior número de alterações, além da mutação mitocondrial A1555G, também foram observadas a mutação mitocondrial A827G, a mutação nuclear G28T em heterozigose e alterações no gene nuclear *MTO1*, sendo o SNP rs4509087 no exon 07 e a alteração IVS 11 – 7 T>G.

Tendo em vista que todos os indivíduos do GRUPO D, apresentando ou não alterações no gene nuclear *MTO1*, apresentam perda profunda, é provável

que mutações em outros genes nucleares estejam modulando o fenótipo de surdez nesses indivíduos. Além disso, no grupo D estudado não se pode descartar completamente o uso de aminoglicosídeos. Devem-se considerar o modelo e a precariedade do sistema de saúde brasileiro, que restringe o acesso as informações do histórico de saúde dos pacientes. Geralmente o histórico médico dos pacientes é informado por eles mesmos ou familiares, quando se tem contato com o paciente, não há um prontuário médico com informação de outras intervenções médicas além das ocorridas na instituição atual. Quando não se tem contato com o paciente a dificuldade é maior ainda, pois não há como buscar informações clínicas. Não raro, faltam informações precisas sobre intercorrências durante a gestação, o parto e o período peri-natal, entre outras. O grupo D é composto em sua maioria de indivíduos adultos, mesmo assim, as informações podem não ser fidedignas.

A casuística deste estudo, sendo pequena, não permite a análise da associação dos SNPs e da alteração IVS 11 – 7 T>G na modulação do fenótipo da perda auditiva. Por outro lado, a única mutação, de fato, detectada no gene, foi encontrada em um indivíduo ouvinte (I392M). Estudos que comprovaram a modulação do fenótipo da surdez por genes nucleares foram realizados por meio de estudos funcionais. Essa etapa não foi realizada em razão dos achados negativos. Ainda assim, pode ser interessante a ampliação da amostra estudada para futura avaliação dos SNPs observados no gene *MTO1*.

Outra abordagem interessante, pode ser relacionada ao estudo de microRNAs, considerando um outro nível de regulação da expressão gênica. Os microRNAs ou miRNAs representam um grupo de pequenos RNAs codificantes que interagem com mRNAs alvo em sítios específicos para induzir a bloqueio da mensagem e portanto, inibir a tradução. Dessa forma, não se pode afastar a hipótese de que miRNAs estejam modulando a expressão dos genes e por conseqüência os fenótipos estudados no presente trabalho. Portanto, é de grande

interesse a ampliação desse estudo, tendo em vista a associação, não com genes nucleares moduladores, e sim com alterações no genoma mitocondrial, assim como nos miRNAs alvo.

CONCLUSÕES

Conclusões

1 – Não foi possível se estabelecer uma correlação entre as alterações observadas nos genes nucleares *TRMU* e *MTO1* e as mutações mitocondriais.

2 – A mutação G28T foi observada somente em heterozigose no gene *TRMU*, portanto nesses casos não deve haver interferência na hipermodificação do tRNA, uma vez que, o outro alelo do gene permanece funcional.

3 – Mutações no gene *MTO1* poderiam modular a penetrância das mutações mitocondriais estudadas. Entretanto, foram encontrados SNPs que aparentemente não têm efeito no fenótipo da surdez. Assim como, a mutação I392M que foi observada em um indivíduo ouvinte.

4 – O grupo D foi o que apresentou maior número de alterações no gene *MTO1*. Existe a possibilidade de que os SNPs ou alterações observadas estejam relacionadas à modulação da mutação A1555G. Entretanto, não foi possível estabelecer essa interação devido ao pequeno tamanho amostral.

5 – A técnica de DHPLC mostrou-se eficiente no rastreamento de mutações no gene *MTO1*.

6 – Apesar do pequeno número de casos estudados, não parece ter relevância para o diagnóstico clínico o estudo dos genes moduladores *TRMU* e *MTO1*.

ANEXO 1
PARECER COMITÊ DE ÉTICA
UNICAMP



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 DFNB1", 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.


Prof. Dra. Carmen Silvia Bertuzzo
PRESIDENTE DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA
FCM / UNICAMP

ANEXO 2
CRITÉRIOS DE INCLUSÃO - CBPAI

Recomendação elaborada pelo Comitê Brasileiro sobre Perdas Auditivas na Infância (CBPAI)

Indicadores de risco para a surdez:

Neonatos (nascimento - 28 dias)

- *história familiar de deficiência auditiva congênita
- *infecção congênita (sífilis, toxoplasmose, rubéola, citomegalovírus, e herpes)
- *anomalias crânio-faciais (malformações de pavilhão auricular, meato acústico externo, ausência de filtrum nasal, implantação baixa da raiz do cabelo)
- *peso ao nascimento inferior a 1500 g
- *hiperbilirrubinemia (níveis séricos indicativos de exsanguineo-transfusão)
- *medicação ototóxica por mais de 5 dias (aminoglicosídeos ou outros, associados ou não aos diuréticos de alça)
- *meningite bacteriana
- *boletim Apgar de 0-4 no 1 o minuto ou 0-6 no 5 o minuto
- *ventilação mecânica por período mínimo de 5 dias
- *sinais ou síndromes associadas à deficiência auditiva condutiva ou neurossensorial

Bebês (29 dias - 2 anos)

- *preocupação/suspeita dos pais com relação ao desenvolvimento da fala, linguagem ou audição.
- *meningite bacteriana e outras infecções associadas com perda auditiva neurossensorial.
- *traumatismo crânioencefálico acompanhado de perda de consciência ou fratura de crânio.
- *estigmas ou sinais de síndromes associadas a perdas auditivas condutivas e/ou neurossensoriais.
- *medicamentos ototóxicos (incluindo mas não limitando-se a agentes quimioterápicos ou aminoglicosídeos, associados ou não a diuréticos de alça)
- *otite média de repetição/persistente, com efusão por pelo menos 3 (três) meses.

ANEXO 3
LISTA DE ANTIBIÓTICOS

ANEXO 3.1. Pacientes de UTIN – Surdos GRUPO A. **Em vermelho:** antibióticos aminoglicosídeos.

No	TEMPO DE INTERNAÇÃO UTIN (Dias)	MEDICAMENTOS ADMINISTRADOS/DOSAGEM (Relevantes)
1	32	GENTAMICINA, AMICACINA, OXACILINA, PENICILINA, VANCOMICINA, FUROSEMIDA
2	12	GENTAMICINA, NEOMICINA, PENICILINA,
3	93	GENTAMICINA, AMICACINA, OXACILINA, CEFOTAXIMA, PENICILINA, FUROSEMIDA, VANCOMICINA
4	22	AMICACINA, OXACILINA, CEFOTAXIMA, FUROSEMIDA
5	66	GENTAMICINA, AMICACINA, OXACILINA, CEFOTAXIMA, PENICILINA, VANCOMICINA, FUROSEMIDA
6	10	GENTAMICINA, PENICILINA
7	60	GENTAMICINA, AMICACINA, OXACILINA, CEFOTAXIMA, PENICILINA, VANCOMICINA, FUROSEMIDA
8	28	GENTAMICINA, AMICACINA, OXACILINA, VANCOMICINA, FUROSEMIDA
9	23	GENTAMICINA, PENICILINA
10	50	GENTAMICINA, AMICACINA, OXACILINA, CEFOTAXIMA, PENICILINA, VANCOMICINA, FUROSEMIDA
11	50	GENTAMICINA, AMICACINA, OXACILINA, CEFOTAXIMA, FUROSEMIDA
12	21	GENTAMICINA, AMICACINA, OXACILINA, CEFOTAXIMA, PENICILINA, FUROSEMIDA
13	15	GENTAMICINA, AMICACINA, OXACILINA, PENICILINA, FUROSEMIDA
14	24	AMICACINA, OXACILINA, CEFOTAXIMA, VANCOMICINA, FUROSEMIDA
15	59	GENTAMICINA, AMICACINA, OXACILINA, CEFOTAXIMA, PENICILINA, VANCOMICINA, FUROSEMIDA, IMIPENEM
16	65	GENTAMICINA, AMICACINA, OXACILINA, CEFOTAXIMA, IMIPENEM, VANCOMICINA, FUROSEMIDA
17	58	AMICACINA, OXACILINA, CLAFORAN, FENTANIL, DEXAMETAZONA
18	16	GENTAMICINA, AMICACINA, OXACILINA, CEFOTAXIMA, PENICILINA, FUROSEMIDA
19	47	GENTAMICINA, AMICACINA, OXACILINA, CEFOTAXIMA, PENICILINA, VANCOMICINA, FUROSEMIDA, CEFTAZIDIMA, IMIPENEM
20	104	GENTAMICINA, AMICACINA, OXACILINA, CEFOTAXIMA, IMIPENEM, VANCOMICINA, FUROSEMIDA
21	75	AMICACINA, AMPICILINA, FUROSEMIDA
22	29	AMICACINA, OXACILINA, CEFOTAXIMA, FUROSEMIDA
23	32	GENTAMICINA, AMICACINA, OXACILINA, IMIPENEM, VANCOMICINA, FUROSEMIDA
24	51	GENTAMICINA, AMICACINA, OXACILINA, CEFOTAXIMA, IMIPENEM, VANCOMICINA, FUROSEMIDA
25	19	OXACILINA, CEFOTAXIMA, FUROSEMIDA, AMICACINA, PENICILINA

ANEXO 3.2. Pacientes de UTIN – Não-surdos GRUPO B. **Em vermelho:** antibióticos aminoglicosídeos. (-) = não há dados sobre qual antibiótico foi tomado.

No.	TEMPO DE INTERNAÇÃO UTIN (Dias)	MEDICAMENTOS ADMINISTRADOS/DOSAGEM (Relevantes)
1	26	GENTAMICINA, AMICACINA, OXALICINA, PENICILINA, CEFOTAXIMA
2	23	GENTAMICINA, AMICACINA, OXACILINA, CEFOTAXIMA, PENICILINA, FUROSEMIDA
3	46	GENTAMICINA, FUROSEMIDA, PENICILINA
4	7	GENTAMICINA, PENICILINA
5	24	AMICACINA, OXACILINA
6	80	AMICACINA, VANCOMICINA, OXACILINA, FUROSEMIDA
7	17	-
8	8	PENICILINA
9	7	-
10	13	GENTAMICINA, PENICILINA
11	18	GENTAMICINA, PENICILINA
12	20	-
13	30	GENTAMICINA, AMICACINA, OXACILINA, PENICILINA, FUROSEMIDA
14	42	-
15	28	GENTAMICINA, AMICACINA, PENICILINA
16	20	GENTAMICINA, PENICILINA
17	30	-
18	59	AMICACINA, VANCOMICINA, OXACILINA, FUROSEMIDA
19	7	GENTAMICINA, PENICILINA
20	8	GENTAMICINA, PENICILINA
21	5	GENTAMICINA, PENICILINA
22	18	GENTAMICINA, AMICACINA, OXACILINA, CEFOTAXIMA, PENICILINA
23	21	GENTAMICINA, AMICACINA, OXACILINA, CEFOTAXIMA, PENICILINA, FUROSEMIDA, VANCOMICINA
24	32	GENTAMICINA, PENICILINA
25	20	-

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABE S, USAMI S, SHINKAWA H, KELLEY PM, KIMBERLING WJ. Prevalent connexin 26 gene (*GJB2*) mutations in Japanese. *J Med Genet.* **37**: 41-3, 2000.
- ALBERTS B, BRAY D, LEWIS J, RAFF M, ROBERTS K, WATSON JD. Molecular biology of the cell. Barcelona, **Ediciones Omega s.a.**, 1998.
- ANDERSON S; BANKIER AT; BARRELL BG; *et al.* 1981. Sequence and organization of the human mitochondrial genome. *Nature* 290:457-465.
- AVRAHAN KB. Motors, channels and sounds of silence. *Nat. Med.* **3(6)**:608-609, 1997.
- BALLANA E; MORALES E; RABIONET R. *et al.* Mitochondrial 12S RNA gene mutations affect RNA secondary structure and lead to variable penetrance in hearing impairment. *Biochem Biophys Res Commun* 2006:341:950-957.
- BITNER-GLINDZICZ M. Hereditary deafness and phenotyping in humans. *Br Med Bull.* 63: 73-94, 2002.
- BRÉGEON D; COLOT V; MIROSLAV M; REDMAN M; TADDEI F. Translational misreading: a tRNA modification counteracts a + 2 ribosomal frameshift. *Genes Dev.* 15:2295-2306, 2001.
- BYKHOVSKAYA Y. *et al.* Phenotype of non-syndromic deafness associated with the mitochondrial A1555G mutation is modulated by mitochondrial RNA modifying enzymes *MTO1* and *GTPBP3*. *Molecular Genetics and Metabolism* 83 (2004) 199-206.
- COHEN NM, GORLIN RJ. Epidemiology, etiology and genetic patterns. In: Gorlin RJ, Toriello HV, Cohen MM, eds. Hereditary hearing loss and its syndromes. New York: **Oxford University Press.** 9-21, 1995.
- DE NOBREGA M, WECKX LLM, JULIANO Y. Denobrega et al. Study of the hearing loss in children and adolescents, comparing the periods of 1990–1994 and 1994–2000. *International Journal of Pediatric Otorhinolaryngology.* vol. 69 (6) pp. 829-838, 2005.
- DELCASTILLO I; MORENO-PELAYO MA; DELCASTILLO FJ; 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.
- DELCASTILLO FJ; DELCASTILLO FJ; HUTCHIN T; LEONARDI E; OLIVEIRA CA; AZAHIN

H; SIEMERING KR; WEIL D; WUYTS W; AGUIRRE LA; MARTIN Y; MORENO-PELAYO MA; VILLAMAR M; AVRAHAM KB; DAHL HH; KANANN M; NANCE WE; PETIT C; SMITH RJ; VAN CAMP G; SARORATO EL; 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.

DENOYELLE F; WEIL D; MAW MA; WILCOX AS; LENCH NJ; ALLEN-POWELL DR; OSBORN AH; DAHL HHM; MIDDLETON A; HOUSEMAN MJ; 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 EN; MUELLER RF. Prelingual deafness: high prevalence of a 35delG mutation in the connexin 26 gene. **Hum. Mol. Genet.** **6(12)**:2173-77, 1997.

DI WL, RUGG EL, LEIGHT IM, KELSELL DP. Multiple epidermal connexins are expressed in different keratinocyte subpopulations including connexin 31. **Invest Dermatol**, **117**: 958-964, 2001.

ESTIVILL X; FORTINA P; SURREY S; RABIONET R; MELCHIONDA S; D'AGRUMA L; MANSFIELD E; RAPPAPORT E; GOVEA N; MILÀ M; ZELANTE L; GASPARINI P. Connexin-26 mutations in sporadic and inherited sensorineural deafness. **Lancet.** **351**:394-98, 1998.

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.

GUAN MX. *et al.* Mutation in *TRMU* related to transfer RNA modification modulates the phenotypic expression of the deafness-associated mitochondrial 12S ribosomal RNA mutations. **The American Journal of Human Genetics.** Vol 79, 2006.

GUAN MX. Molecular Pathogenetic Mechanism of Maternally Inherited Deafness. **Ann. N.y.Acad.Sci.** **1011**:259-271 (2004).

KELLEY PM; HARRIS DJ; COMER BC; ASKEW JW; FOWLER T; SMITH SD; KIMBERLING WJ. Novel mutations in the connexin 26 gene (*GJB2*) that cause autosomal recessive (DFNB1) hearing loss. **Am. J. Hum. Genet.** **62(4)**:792-99, 1998.

KELSELL DP; DUNLOP J; STEVENS HP; LENCH NJ; LIANG JN; PARRY G; MUELLER RF; LEIGH IM. Connexin 26 mutations in hereditary non-syndromic sensorineural deafness. **Nature.** **387**:80-83, 1997. [Letter]

KIKUCHI T; KIMURA RS; PAUL DL; ADAMS JC. Gap junctions in the rat cochlea:

- immunohistochemical and ultrastructural analysis. **Anat. Embryol. (Berl.)**. **191(2)**:101-18, 1995.
- KOKOTAS H; PETERSEN MB; WILLEMS PJ. Mitochondrial deafness. **Clin. Genet.** 2007;71:379-391.
- KONDO J, WESTHOF E. The bacterial and mitochondrial ribosomal A-site molecular switches possess different conformational substates. **Nucleic Acids Research.** 1-13, 2008.
- LI Z, LI R, CHEN J, LIAO Z, ZHU Y, QIAN Y, XIONG S, HEMAN-ACKAH S, WU J, CHOO DI, GUAN MX. Mutational analysis of the mitochondrial 12S *rRNA* gene in Chinese pediatric subjects with aminoglycoside-induced and non-syndromic hearing loss. **Hum Genet.** Jun; 117(1): 9-15, 2005.
- LONSBURY-MARTIN BL; MARTIN GK; TELLISGHI FF. Emissões otoacústicas na prática clínica. In: MARTIN L; TOUTAIN A; GUILLEN C; HAFTEK M; MACHET MC; TOLEDANO C; ARBEILLE B; LORETTE G; ROTIG A; VAILLANT L. Inherited palmoplantar keratoderma and sensorineural deafness associated with A7445G point mutation in the mitochondrial genome. **Br. J. Dermatol.** **143(4)**:876-83, 2000.
- MARTÍNEZ AD, ACUNÁ R, FIGUEROA V, MARIPILAN J, NICHOLSON B. Gap-Junction Channels dysfunction in deafness and hearing loss. Forum Review. **Antioxidants & Redox Signaling.** Vol 11, number 2, 2009.
- NOLLER HF. Ribosomal RNA and translation. **Annu. Rev. Biochem.** 191–227, 1991.
- OLIVEIRA CA; ALEXANDRINO F; ABE-SANDES K. **Human Biology**, **76(2)**, 2004.
- PREZANT TR; AGAPIAN JV; BOHLMAN MC; BU X; OZTAS S; QIU WQ; ARNOS KS; CORTOPASSI GA; JABER L; ROTTER JI. Mitochondrial ribosomal RNA mutation associated with both antibiotic - induced and non-syndromic deafness. **Nat. Genet.** **4(3)**:289-294, 1993.
- RABIONET R; ZELANTE L; LOPEZ-BIGAS N; D'AGRUMA L; MELCHIONDA S; RESTAGNO G; ARBONES ML; 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.
- ROBERTSON NG, KHETARPAL U, GUTIERREZ-ESPELETA GA, BIEBER FR, MORTON CC. Isolation of novel and known genes from a human fetal cochlear cDNA library using subtractive hybridization and differential screening. **Genomics**, 23(1):42-50, 1994.
- RODRIGUEZ-BALLESTEROS M, OLARTE M, AGUIRRE LA *et al.* Molecular and clinical

- characterization of three Spanish families with maternally inherited non-syndromic hearing loss caused by the 1494C-T mutation in the mitochondrial *12S rRNA* gene. **J. Med. Genet.** 43: e54, 2006.
- RUSSO ICP. Overview of audiology in Brazil: State of the art. **Audiology.** 39:202-206, 2000.
- SARTORATO EL; GOTTARDI E; OLIVEIRA CA; MAGNA LA; ANNICHINO-BIZZACHI JM; SEIXAS CA; MACIEL-GUERRA AT. Determination of carrier frequency of the 35delG mutation in Brazilian neonates. **Clinical Genetics.** 58(4):339, 2000.
- SOBE T; VREUGDE S; SHAHIN H; BERLIN M; DAVIS N; KANAAN M; YARON Y; ORR-URTREGER A; FRYDMAN M; SHOHAT M; AVRAHAM KB. The prevalence and expression of inherited connexin 26 mutations associated with nonsyndromic hearing loss in the Israeli population. **Hum. Genet.** 106:50-51, 2000.
- TORRONI A, PETROZZI M, D'URBANO L, SELLITTO D, ZEVIANI M, CARRARA F, CARDUCCI C, LEUZZI V, CARELLI V, BARBONI P, DE NEGRI A, SCOZZARI R. Haplotype and phylogenetic analyses suggest that one European-specific mtDNA background plays a role in the expression of Leber hereditary optic neuropathy by increasing the penetrance of the primary mutations 11778 and 14484. **Am J Hum Genet.** May;60(5):1107-21, 1997
- VAN CAMP G; WILLEMS PJ; SMITH RJH. Nonsyndromic hearing impairment: unparalleled heterogeneity. **Am. J. Hum. Genet.** 60:758-764, 1997.
- VAN LAER L, CRYNS K, SMITH RJ, VAN CAMP G. Nonsyndromic hearing loss. **Ear hear.** 24: 275-88, 2003.
- XING G; CHEN Z; WEI Q; TIAN H; LI X; ZHOU A; BU X; CAO X. Mitochondrial *12S rRNA* A827G mutation is involved in the genetic susceptibility to aminoglycoside ototoxicity. **Biochemical and Biophysical Research Communications.** 346: 1131-1135, 2006.
- YAN Q; LI X; FAYE G, GUAN MX. Mutations in MTO2 related to tRNA modification impair mitochondrial gene expression and protein synthesis in the presence of a paromomycin resistance mutation in mitochondrial 15 S rRNA. **J Biol Chem.** Aug 12;280(32):29151-7, 2005.
- 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.
- ZHAO H, LI R, WANG Q, DENG JH, HAN D, BAI Y, YOUNG WY, GUAN MX. Maternally

inherited aminoglycoside-induced and nonsyndromic deafness is associated with the novel C1494T mutation in the mitochondrial *12S rRNA* gene in a large Chinese family.

Am J Human Genet. Jan; 74(1): 139-52. Epub 2003 Dec 12, 2004.

ZHAO L, WANG Q, QIAN Y, LI R, CAO J, HART LC, ZHAI S, HAN D, YOUNG WY, GUAN MX. Clinical evaluation and mitochondrial DNA sequence analysis in two Chinese families with aminoglycoside-induced and non-syndromic hearing loss. **Biochem Biophys Res Commun.** Oct 28; 336(3): 967-73, 2005.

ZELANTE L; GASPARINI P; ESTIVILL X; MELCHIONDA S; D'AGRUMA L; GOVEA N; MILÁ M; DELLA MONICA M; LUTFI J; SHOHAT M; MANSFIELD E; DELGROSSO K; RAPPAPORT E; SURREY S; FORTINA P. Connexin 26 mutations associated with the most common form of non syndromic neurosensory autossomal recessive deafness (DFNB1) in Mediterranean. **Hum. Mol. Genet.** 6(9):1605-9, 1997.

Nota do autor: Esta tese foi publicada em fevereiro de 2009 na revista Biochemical and Biophysical Research Communications.

de MORAES, VCS, Alexandrino, F, Andrade, PB, Câmara, MF, Sartorato, EL.

Study of modifiers factors associated to mitochondrial mutations in individuals with hearing impairment. Biochemical and Biophysical Research Communications. v.381, p.210 - 213, 2009.