


**FABIANA ALEXANDRINO**

Este exemplar corresponde à versão final da  
Dissertação de Mestrado apresentada ao Curso  
de Pós-Graduação Ciências Médicas da Facul-  
dade de Ciências Médicas da UNICAMP, para  
obtenção do título de Mestre em Ciências Médicas,  
área de Ciências Biomédicas do(a) aluno(a)  
**Fabiana Alexandrino.**

Campinas, 15 de agosto de 2003.

  
Prof(a). Dr(a). Edi Lúcia Sartorato  
Orientador(a)

***ESTUDO DE MUTAÇÕES NO GENE GJB3  
COMO CAUSA DE DEFICIÊNCIA AUDITIVA  
NEUROSENSORIAL NÃO SINDRÔMICA***

200331859

**CAMPINAS**

**2003**

**FABIANA ALEXANDRINO**

---

***ESTUDO DE MUTAÇÕES NO GENE GJB3  
COMO CAUSA DE DEFICIÊNCIA AUDITIVA  
NEUROSENSORIAL NÃO-SINDRÔMICA***

*Dissertação de Mestrado apresentada à Pós-Graduação  
da Faculdade de Ciências Médicas, da Universidade  
Estadual de Campinas para obtenção do título de Mestre  
em Ciências Médicas, área de concentração em Ciências  
Biomédicas.*

***ORIENTADORA: PROFA. DRA. EDI LÚCIA SARTORATO***

***CO-ORIENTADORA: PROFA. DRA. ANDRÉA TREVAS MACIEL-GUERRA***

**CAMPINAS**

**2003**

ii



**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA  
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS  
UNICAMP**

Al 27e                      Alexandrino, Fabiana  
Estudo de mutações no gene GJB3 como causa de deficiência  
auditiva neurossensorial não-sindrômica / Fabiana Alexandrino.  
Campinas, SP : [s.n.], 2003.

Orientadores : Edi Lúcia Sartorato, Andréa Trevas Maciel Guerra  
Dissertação ( Mestrado) Universidade Estadual de Campinas.  
Faculdade de Ciências Médicas.

1. Surdez. 2. \*Mutação. 3. \*Junções gap. 4. \*Conexinas. I. Edi  
Lúcia Sartorato . II. Andréa Trevas Maciel Guerra. III. Universidade  
Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. IV. Título.

UNIDADE	BC
Nº CHAMADA	UNICAMP
	Al 27e
V	EX
TOMBO BC	56018
PROC.	16/229103
C	<input type="checkbox"/>
D	<input checked="" type="checkbox"/>
PREÇO	29,11,00
DATA	09/10/03
Nº CPD	

CM00190375-4

bib id 308187

---

# **Banca examinadora da Dissertação de Mestrado**

---

---

**Orientador(a): Prof(a). Dr(a).** *Edi Luiza Santonato*

---

---

## **Membros:**

---

1. *Prof. Dra. Daniela Farias Cabral*

---

2. *Prof. Dr. Carlos Eduardo Steiner*

---

3. *Prof. Dra. Edi Luiza Santonato*

---

Curso de pós-graduação em Ciências Médicas, da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas.

---

**Data:** *15/08/2003*

---

---

### *Agradecimentos Especiais*

*Aos meus pais, José e Marília,  
pelo amor, incentivo e muito  
mais que me fizeram chegar  
até aqui e não se cansam de  
torcer por mim.*

*À minha irmã, Marilene e ao  
Carlos, que sempre me  
acompanharam e me  
abrigaram em todo esse  
trabalho. Obrigada pela  
confiança e paciência.*

## *AGRADECIMENTOS*

---

À Profa. Dra. Edi Lucia Sartorato pela orientação, pelo incentivo e principalmente pela confiança em meu trabalho.

À Profa. Dra. Andréa Trevas Maciel-Guerra, pela co-orientação e por sua atenção.

À Profa. Dra. Daniela Farias Cabral por ter aceitado fazer parte da pré-banca e banca desta tese e principalmente pela amizade.

Ao Prof. Dr. Carlos Steiner, pela importante contribuição na pré-banca e por fazer parte da banca examinadora desta tese.

À Profa. Dra. Ana Cláudia Lessinger, por participar da pré-banca deste trabalho.

À Profa. Dra. Maricilda Palandi de Mello e Profa. Dra. Christine Hackel por toda ajuda e apoio no CBMEG.

À Nilma pelo grande apoio no início de tudo e a todo o pessoal do Laboratório de Citogenética.

À Madá pela grande amizade, paciência, por sua alegria contagiante em todo momento e pelo apoio técnico.

À Fer, que sempre estava presente em todos os momentos difíceis, alegres, até nas aulas de ginástica. Obrigada pela amizade e confiança.

À Camila, pelo total apoio que sempre me deu e principalmente pela grande amizade.

A Eliana e Ericka, que eu aprendi a respeitar muito, pela cumplicidade e pelo grande carinho em todos momentos.

Ao pessoal que está longe, mas não menos queridos: Ju, Junia, Dani, Helô e Elena. Agradeço também ao Marcelo pela amizade.

A todo o pessoal do laboratório de Genética Humana, que com certeza sempre tinha alguém presente em algum momento importante: Thalita, Lucy, Eduardo, Andrey, Lúcio, Fernanda Coeli, Fernanda Soardi, Mariana, Carla, Luis Eduardo.

Obrigada pela paciência e compreensão de todos.

Aos funcionários do CBMEG, principalmente a Tânia e Sandra.

---

À FAPESP pelo apoio financeiro.

---

*Paciência e senso de oportunidade...Tudo vem na sua hora.  
Não se pode apressar a vida, ela não funciona em horários  
fixos, como a gente quer. É necessário aceitar o que chega no  
momento, sem pedir mais. Porque não é como vemos e sim  
medido por lições que devemos aprender.*



	<b>PÁG.</b>
<b>RESUMO</b> .....	<i>xvi</i>
<b>ABSTRACT</b> .....	<i>xviii</i>
<b>INTRODUÇÃO</b> .....	20
1- Fisiologia da audição.....	21
2- Deficiência auditiva.....	22
3- Classificação.....	23
4- Prevalência da deficiência auditiva.....	23
5- Genética da deficiência auditiva.....	24
5.1- Deficiência auditiva síndrômica.....	24
5.2- Deficiência auditiva não síndrômica.....	25
6- Conexinas e suas funções.....	27
7- O gene <b>GJB3</b> .....	30
8- Considerações gerais.....	31
<b>OBJETIVOS</b> .....	33
1- Objetivos Gerais.....	34
2- Objetivos Específicos.....	34
<b>MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	35
1- Casuística.....	36
2- Métodos.....	37
2.1- Extração de DNA genômico de sangue periférico.....	37
2.2- Amplificação do gene <b>GJB3</b> .....	39
2.3- Amplificação do gene <b>GJB2</b> .....	40
2.4- SSCP.....	41
2.5- Clonagem.....	42
2.5.1- Ligação.....	43

2.5.2-Transformação.....	43
2.5.3- Análise dos clones recombinantes.....	44
2.6- Seqüenciamento.....	44
2.6.1- Seqüenciamento Manual.....	44
2.6.2- Seqüenciamento Automático.....	47
2.7- Análise de restrição.....	49
2.7.1- Detecção da mutação <b>delE120</b> .....	49
2.7.2- Detecção da mutação <b>V95M</b> .....	50
2.7.3- Detecção da mutação <b>-49del10</b> .....	50
2.7.4- Detecção da mutação <b>R32W</b> .....	50
<b>RESULTADOS</b> .....	51
1- Alterações encontradas no gene <b>GJB3</b> nos indivíduos do Grupo A.....	55
1.1- Famílias 3 e 12 .....	55
1.2- Famílias 10 e 54.....	56
2- Alterações encontradas no gene <b>GJB3</b> nos indivíduos do Grupo B.....	58
2.1- Família 39.....	58
2.2- Família 55.....	39
3- Alterações encontradas nos indivíduos do Grupo C.....	60
3.1- Alterações no gene <b>GJB3</b> .....	60
3.1.1- Família 3.....	60
3.1.2- Família 14.....	60
3.1.3- Família 17.....	63
3.2- Alterações no gene <b>GJB2</b> .....	64
3.2.1- Família 4.....	64
3.2.2- Família 5.....	65
3.2.3- Família 10.....	69
<b>DISCUSSÃO</b> .....	72
1- Alterações encontradas no gene <b>GJB3</b> nos indivíduos do Grupo A.....	74

1.1- Famílias 3 e 12 .....	74
1.2- Famílias 10 e 54 .....	74
2- Alterações encontradas no gene <b>GJB3</b> nos indivíduos do Grupo B .....	75
2.1- Família 39.....	75
2.2- Família 55 .....	75
<hr/>	
3- Alterações encontradas no gene <b>GJB3</b> nos indivíduos do Grupo C.....	76
3.1- Família 3.....	76
3.2- Família 14 .....	76
3.3- Família 17.....	77
4- Alterações encontradas no gene <b>GJB2</b> nos indivíduos do Grupo C .....	77
4.1- Família 4.....	77
4.2- Família 5.....	78
4.3- Família 10.....	78
<b>CONCLUSÃO</b> .....	79
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	81
<b>ANEXOS</b> .....	91

## LISTA DE ABREVIATURAS

---

<b>DdNTPs</b>	didesoxinucleotídeos
<b>del</b>	deleção
<b>DFNA</b>	<i>Locus</i> com padrão de herança autossômico dominante
<b>DFNB</b>	<i>Locus</i> com padrão de herança autossômico recessivo
<b>DH5<math>\alpha</math></b>	linhagem da bactéria <i>E. coli</i>
<b>DNTPs</b>	desoxinucleotídeos
<b>EDTA</b>	ácido etilenodiaminotetracético
<b>LB</b>	meio de cultura Luria-Bertani
<b>pb</b>	pares de bases
<b>PCR</b>	reação em cadeia da polimerase ( <i>Polymerase Chain Reaction</i> )
<b>pmol</b>	picomol
<b>pmoles</b>	picomoles
<b>PPK</b>	do inglês Palmoplantar Keratoderma
<b>rpm</b>	rotações por minuto
<b>SDS</b>	Dodecil Sulfato de Sódio
<b>SSCP</b>	polimorfismo da conformação da simples fita ( <i>Single Strand Conformation Polymorphism</i> )
<b>TAE</b>	Tris/ácido acético/EDTA
<b>Taq</b>	<i>Thermos aquaticus</i>
<b>TE</b>	Tris- EDTA
<b>TEMED</b>	N,N,N',N' - Tetrametiletlenodiamina
<b>T<sub>m</sub></b>	Temperatura de fusão ( <i>melting</i> )
<b>Tris</b>	tris-(hidroximetil)- aminomenato
<b>U</b>	unidades
<b>X-gal</b>	5-bromo-4-cloro-3-indolil- $\beta$ ,D-galactosidase

## LISTA DE TABELAS

---

	<i>PÁG.</i>
TABELA 1- Fatores da deficiência auditiva.....	22
TABELA 2- Exemplos de síndromes associadas a deficiência auditiva.....	24
TABELA 3- Genes envolvidos nas formas não síndrômicas de surdez.....	26
TABELA 4- Relação dos indivíduos estudados.....	37
TABELA 5- Seqüência dos cinco pares de <i>primers</i> usados na amplificação do gene <b>GJB3</b> .....	39
TABELA 6- Seqüência dos primers usados na amplificação do gene <b>GJB2</b> .....	40
TABELA 7- Resumo das análises de restrição nos genes <b>GJB2</b> e <b>GJB3</b> .....	49
TABELA 8- Alterações observadas nos genes <b>GJB2</b> e <b>GJB3</b> em indivíduos do GRUPO A.....	53
TABELA 9- Alterações observadas nos genes <b>GJB2</b> e <b>GJB3</b> em indivíduos do GRUPO B.....	53
TABELA 10- Alterações observadas nos genes <b>GJB2</b> e <b>GJB3</b> em indivíduos do GRUPO C.....	54
TABELA 11- Alterações encontradas no gene <b>GJB3</b> .....	55
TABELA 12- Alterações encontradas no gene <b>GJB3</b> .....	73
TABELA 13- Alterações encontradas no gene <b>GJB2</b> nos indivíduos do GRUPO C.....	74

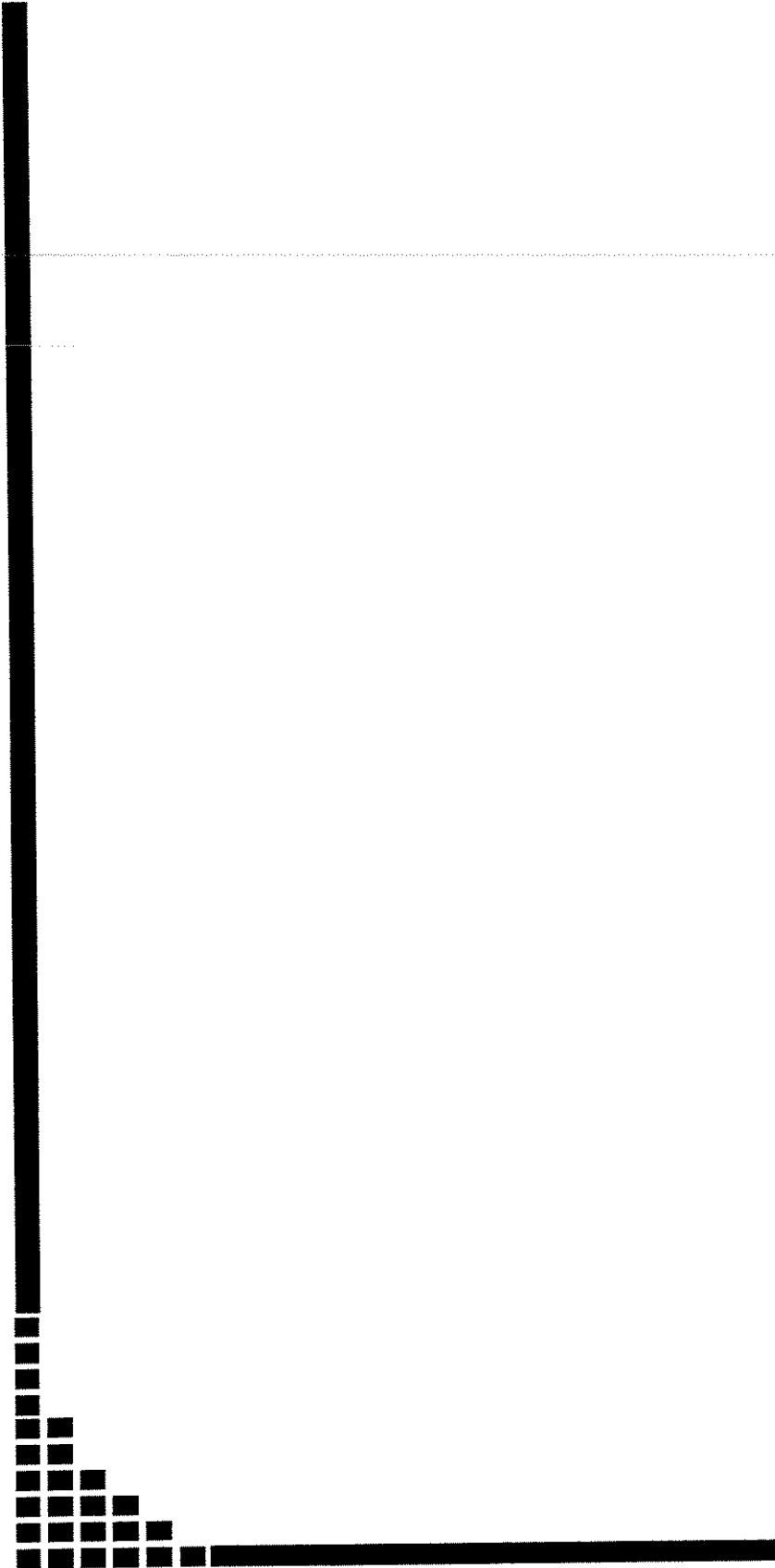
## LISTA DE FIGURAS

	<i>PÁG.</i>
<b>FIGURA 1-</b> Estrutura do ouvido humano.....	21
<b>FIGURA 2-</b> Representação esquemática da proteína Cx31.....	28
<b>FIGURA 3-</b> Representação esquemática da <i>gap junction</i> .....	29
<b>FIGURA 4-</b> Ciclos de amplificação do gene GJB3.....	40
<b>FIGURA 5-</b> Ciclos de amplificação do gene GJB2.....	41
<b>FIGURA 6-</b> Ciclo utilizado na reação de seqüenciamento manual.....	46
<b>FIGURA 7-</b> Ciclo utilizado na reação de seqüenciamento automático.....	48
<b>FIGURA 8-</b> Produtos de amplificação do gene GJB3 em eletroforese de gel de agarose.....	52
<b>FIGURA 9-</b> Localização das mutações encontradas no gene GJB3.....	55
<b>FIGURA 10-</b> Gel de seqüenciamento mostrando parte da seqüência do gene GJB3: A – seqüência normal; B – paciente 3 heterozigoto para a mutação N266 (C <sup>798</sup> →T).....	56
<b>FIGURA 11-</b> Eletroferograma mostrando parte da seqüência do gene GJB3: A seqüência normal; B – paciente heterozigoto para a mutação Y177D (T <sup>529</sup> →G).....	57
<b>FIGURA 12-</b> Heredograma da família 10.....	57
<b>FIGURA 13-</b> Heredograma da família 54.....	58
<b>FIGURA 14-</b> Gel de seqüenciamento mostrando parte da seqüência do gene GJB3: A – seqüência normal; B – paciente heterozigoto para a mutação G193 (C <sup>579</sup> →T).....	59

<b>FIGURA 15-</b>	Gel de seqüenciamento mostrando parte da seqüência do gene GJB3: A – seqüência normal; B – paciente heterozigoto para a alteração N119 (C <sup>357</sup> →T).....	59
<b>FIGURA 16-</b>	Gel de seqüenciamento mostrando parte da seqüência do gene GJB3: A – paciente heterozigoto para a mutação 49delK; B – seqüência normal.....	60
<b>FIGURA 17-</b>	Gel de seqüenciamento mostrando parte da seqüência do gene GJB3: A – seqüência normal; B - paciente heterozigoto para a mutação R32W (C <sup>94</sup> →T).....	61
<b>FIGURA 18-</b>	Representação esquemática da análise de restrição da mutação R32W no gene GJB3.....	61
<b>FIGURA 19-</b>	Análise de restrição para a mutação R32W com a enzima <i>Hpa</i> II no gene GJB3 M- marcador de peso molecular de 100pb-Gibco BRL; 1- produto de PCR não digerido; 2- probando; C- controle negativo.....	62
<b>FIGURA 20-</b>	Heredograma da família 14.....	62
<b>FIGURA 21-</b>	Gel de seqüenciamento mostrando parte da seqüência do gene GJB3: A – seqüência normal; B – paciente heterozigoto (P159).....	63
<b>FIGURA 22-</b>	Gel de seqüenciamento mostrando parte da seqüência do gene GJB2: A – seqüência normal; B – paciente heterozigoto para a mutação K105R (A <sup>314</sup> →G).....	64
<b>FIGURA 23-</b>	Heredograma da família 4.....	65
<b>FIGURA 24-</b>	Gel de seqüenciamento mostrando parte da seqüência do gene GJB2 de indivíduo heterozigoto composto M34T/V95M: A - seqüência M34T (T <sup>101</sup> →C); B - seqüência V95M (G <sup>283</sup> →A).....	66
<b>FIGURA 25-</b>	Representação esquemática da análise de restrição da mutação V95M no gene GJB2.....	66

<b>FIGURA 26-</b>	Análise de restrição para a mutação V95M com a enzima <i>PmaC</i> I no gene GJB2: M- marcador de peso molecular de 100pb-Gibco BRL; Fr- fragmento de PCR sem digerir; C- controle negativo; 1- probando; 2- pai; 3- mãe; 4- irmã; 5- irmão; 6- esposa.....	67
<b>FIGURA 27-</b>	Representação esquemática da análise de restrição da mutação – 49del10 no gene GJB2.....	67
<b>FIGURA 28-</b>	Análise de restrição com a enzima <i>Bgl</i> II no gene GJB2: M- marcador de peso molecular de 100pb-Gibco BRL; Fr- fragmento sem digerir; C- controle negativo; 1- probando; 2- irmã; 3- irmão; 4- pai; 5- mãe; 6- esposa.....	68
<b>FIGURA 29-</b>	Heredograma da família 5.....	68
<b>FIGURA 30-</b>	Gel de seqüenciamento mostrando parte da seqüência do gene GJB2: A – seqüência normal; B – paciente heterozigoto para a mutação delE120.....	69
<b>FIGURA 31-</b>	Representação esquemática da análise de restrição da mutação delE120 no gene GJB2.....	70
<b>FIGURA 32-</b>	Análise de restrição com a enzima <i>Mnl</i> I no gene GJB2: M – marcador de peso molecular de 100pb-Gibco BRL; Fr fragmento sem digerir; C- controle negativo; 1- probando; 2- pai; 3- mãe; 4- filho; 5- filha; 6- esposa; 7- irmã I; 8- irmã II; 9- marido da irmã II; 10 e 11- filhos da irmã I.....	70
<b>FIGURA 33-</b>	Heredograma da família 10.....	71





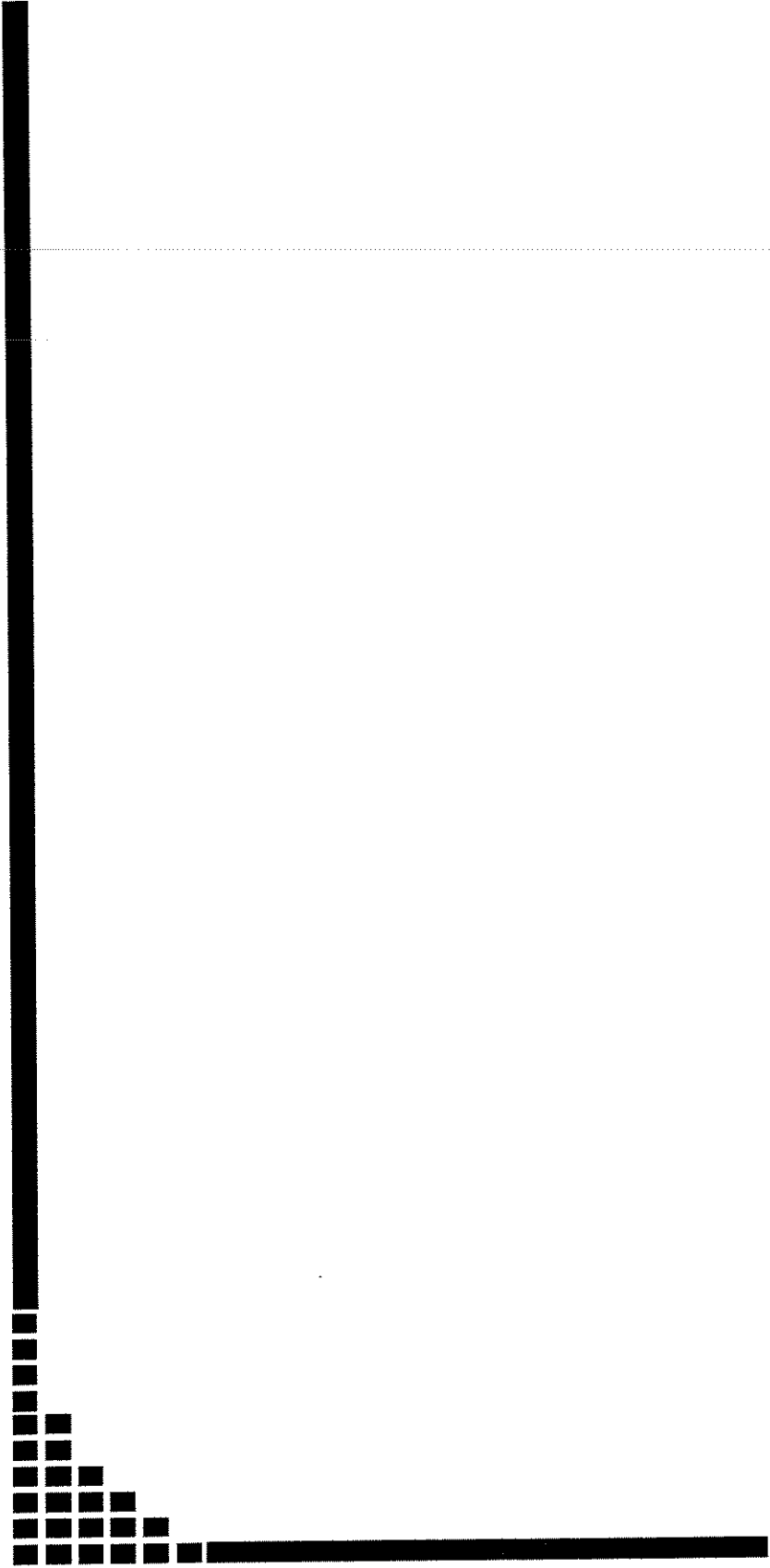
***RESUMO***

A deficiência auditiva neurosensorial está presente em cerca de 1 em cada 1000 crianças e, em muitos casos, é difícil estabelecer sua origem. Isso se deve a sua grande diversidade etiológica, e também ao fato do ouvido interno ser inacessível a procedimentos diagnósticos discriminantes. Embora não se saiba com exatidão o número de *loci* envolvidos na surdez com etiologia não esclarecida, é certo que mutações no gene **GJB2** (Cx26) estão envolvidas em 50% dos casos de surdez pré-lingual não-sindrômica de herança autossômica recessiva.

Alguns indivíduos com deficiência auditiva neurosensorial apresentam mutações no gene **GJB2** em apenas um dos alelos, sendo de grande importância esclarecer se o fenótipo observado nesses casos seria devido à interação entre diferentes conexinas expressas no aparelho auditivo resultando em um efeito dominante negativo, afetando a função da proteína normal.

Diferentes genes e mutações são apontados freqüentemente como causa de deficiência auditiva em diferentes populações na medida em que mais indivíduos vão sendo estudados. Assim, outro gene também da família de conexinas, **GJB3**, que codifica a conexina 31 (Cx31), está relacionado como causa de surdez não-sindrômica principalmente com padrão de herança autossômico dominante. O estudo de mutações no gene **GJB3** (conexina 31), tem como objetivo esclarecer alguns casos de perda auditiva nos quais não foram identificadas mutações no gene **GJB2** (conexina 26), aumentando a possibilidade de realizar o aconselhamento genético da família, além de proporcionar melhor esclarecimento a respeito do complexo mecanismo que envolve a audição humana.

É importante ressaltar que há grande variação no grau de comprometimento de capacidade auditiva devido a mutações nos diferentes genes de conexinas, dificultando o aconselhamento genético e o estabelecimento de um prognóstico para outros casos na família. Sendo assim, é sugerido o estudo mutações de no gene **GJB3**, nos casos onde foram encontradas mutações somente em um dos alelos do gene **GJB2**, poderia esclarecer alguns fenótipos observados. Portanto, o rastreamento de mutações no gene **GJB3** em indivíduos com surdez neurosensorial de etiologia não esclarecida, em casos com padrões de herança recessivo ou dominante e em casos esporádicos contribuiria com mais informações essenciais ao aconselhamento genético.

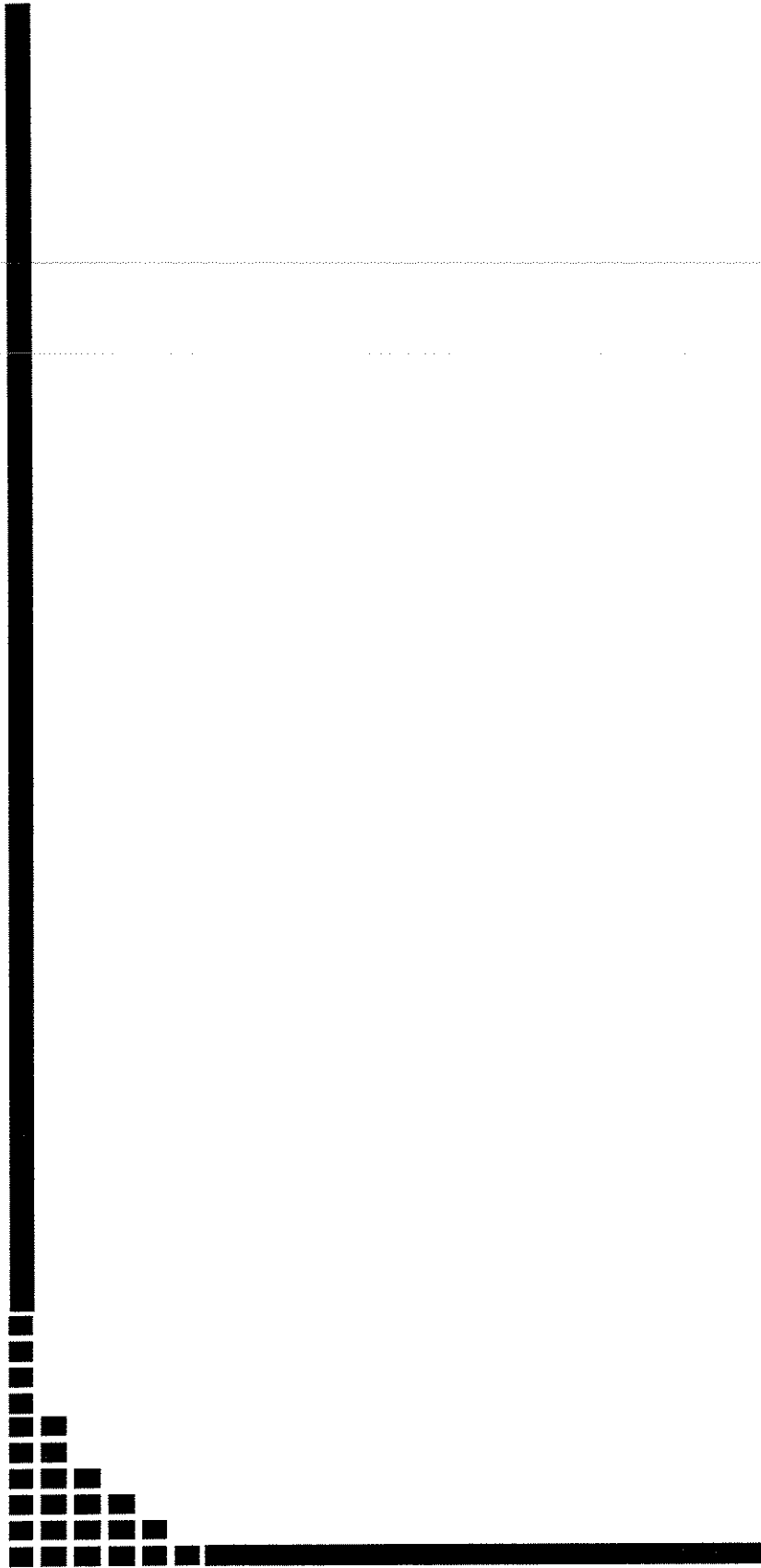


***ABSTRACT***

Deafness is one of the most common sensory defects in the general population and its prevalence increases with age. In developed countries about 60% of hearing loss cases are due to genetic factors. In Brazil the majority of cases of hearing loss are due to environmental factors. However, the proportion of genetic causes tends to increase as a result of improvement in health care, and thus modify daily medical practice in the etiologic investigation of deafness.

Recent years have seen tremendous progress localizing and cloning genes associated with inherited hearing loss. Most of cases inherited are nonsyndromic, and approximately 80% of these genes are autosomal recessive, 18% autosomal dominant, and 2% X-linked or mitochondrial inherited. Several connexin genes have been found mutated in patients with non-syndromic and syndromic deafness indicating an important role these proteins in the auditory system. Mutations in the connexin 26 (GJB2) lead to hearing impairment in most of populations all over the countries. This gene is responsible for approximately 80% of the non-syndromic recessive deafness. The GJB3 gene (Cx31) has recently been found as deafness gene. Mutations in the connexin 31 have been detected either in erythrokeratoderma variabilis and non-syndromic autosomal recessive or dominant deafness. To determine the contribution of connexin 31 to sporadic deafness, we analysed the entire gene of connexin 31 in 67 families with non-syndromic hearing impairment. We reported three amino acid changes, Y177D, 49delK and R32W, and two nucleotides variants, which represents a silent mutation. The R32W substitution has been previously described, and its involvement in hearing impairment remains uncertain.

We presume that mutations in connexin 31 gene are an infrequent cause of non syndromic deafness.



# ***INTRODUÇÃO***

## 1- FISILOGIA DA AUDIÇÃO

Todas as funções sensoriais do ouvido interno dependem de recepção mecânica, ou seja, da detecção de pequenos movimentos produzidos por forças que atuam em torno das células sensoriais do ouvido. Esses movimentos são oscilações rápidas no caso do som e movimentos mais lentos no caso da gravidade e aceleração.

O ouvido humano é formado por três partes distintas: externa, média e interna (figura 1). O ouvido externo consiste em aurícula e canal auditivo externo, o qual capta o som e o transfere para a membrana timpânica. O ouvido médio, por sua vez, é formado pela cavidade timpânica e por uma cadeia de três ossículos (martelo, bigorna e estribo), os quais coletam as vibrações recebidas pela membrana timpânica e as transmitem para a janela oval do ouvido interno. O ouvido interno consiste no aparelho vestibular e na cóclea, o qual, além de transmitir informações sonoras ao cérebro, proporciona informações sobre a aceleração e a direção da gravidade, sendo responsável pelo equilíbrio e pela coordenação dos movimentos (HUDSPETH, 1989).

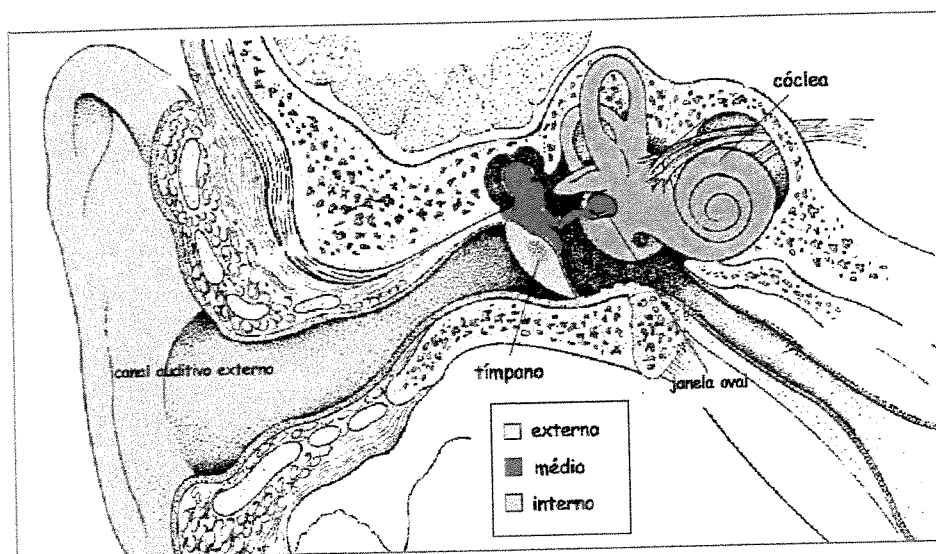


Figura 1 - Estrutura do ouvido humano. Fonte: HUDSPETH, 1989.

## 2- DEFICIÊNCIA AUDITIVA

A deficiência auditiva é um distúrbio sensorial relativamente comum na população humana que pode se manifestar em qualquer faixa etária, como resultado de uma ampla variedade de anomalias geneticamente determinadas, bem como de diversos fatores ambientais. Assim sendo, o diagnóstico etiológico de um portador de deficiência auditiva é, em geral, difícil de ser estabelecido.

Em alguns casos, a etiologia da deficiência auditiva é claramente ambiental, decorrente de fatores pré, peri ou pós-natais, como trauma acústico, exposição a drogas ototóxicas (aminoglicosídeos) e infecção bacteriana ou viral, como rubéola ou citomegalovírus. Entre os casos de etiologia genética, estima-se que 30% dos casos de surdez pré-lingual sejam síndrômicos e 70% não-síndrômicos (tabela I).

**Tabela 1** – Fatores da deficiência auditiva.

CAUSAS DE DEFICIÊNCIA AUDITIVA		
Ambiental	Pré-Natal	Infecção materna (citomegalovírus, rubéola) Uso de medicamentos durante a gestação Irradiação durante a gestação Icterícia grave ( <i>kernicterus</i> )
	Peri-Natal	Trauma de parto Anóxia Otites Meningite
	Pós-Natal	Sarampo Caxumba Traumatismos
	Sindrômico	
Genética	Não-sindrômico	Autossômico dominante Autossômico recessivo Ligado ao X Mitocondrial

### 3- CLASSIFICAÇÃO

A deficiência auditiva pode ser classificada de acordo com alguns critérios:

Em relação à localização do defeito ela pode ser **condutiva**, quando a anomalia afeta o ouvido médio ou externo; **neurossensorial** (perceptiva ou neural), quando as anomalias estão situadas entre os receptores do ouvido interno e as regiões auditivas do cérebro; ou ainda **mistas**, quando envolvem ambos os defeitos.

Considerando a o grau da perda auditiva, ela pode ser **leve**, correspondendo à perda de 27-40dB; **moderada** (41-55dB); **moderada a grave** (56-70dB); **grave** (71-90dB); e **profunda**, correspondendo a perda auditiva >90dB.

Considerando a época em que se manifesta, a deficiência auditiva pode ser **pré-lingual**, quando está presente ao nascimento ou antes da aquisição da linguagem, ou **pós-lingual**, quando se apresenta depois.

Outro critério de classificação da deficiência auditiva é a sua associação com outros sinais, podendo ser **sindrômica** quando estiver associada a malformações crânio-faciais ou cervicais, displasias esqueléticas, anomalias cutâneas ou oculares, doenças neurológicas, e disfunções renais ou metabólicas, ou **não-sindrômica** quando for o único defeito detectável.

### 4- PREVALÊNCIA DA DEFICIÊNCIA AUDITIVA

A prevalência da surdez congênita varia segundo vários autores nas diferentes populações, sendo estimado que 1 em cada 1000 crianças apresentam perda auditiva congênita, em países desenvolvidos. No Brasil, entretanto, não existem dados oficiais da prevalência da deficiência auditiva. Porém a surdez de causa ambiental é predominante (67%), sendo uma proporção de 15% de casos de surdez hereditária e 18,5% dos casos de etiologia não esclarecida (SIMÕES & MACIEL-GUERRA, 1992).

Em países desenvolvidos, estima-se que cerca de 60% dos casos de surdez pré-lingual têm bases genéticas (MURGIA *et al.*, 1999). Entre as crianças com déficit permanente de audição cerca de 90% apresentam distúrbios neurossensoriais, 5% de condução e 5% são mistos (PARVING, 1994) e, em muitos casos, é difícil estabelecer sua



origem (MORTON, 1991). Isto se deve a sua grande diversidade etiológica, além do fato do ouvido interno ser inacessível a procedimentos diagnósticos discriminantes. Portanto, em uma parcela significativa dos casos não é possível chegar a um diagnóstico etiológico, com prejuízo evidente do aconselhamento genético – nesses casos, o risco empírico de recorrência é estimado em 10%.

## 5- GENÉTICA DA DEFICIÊNCIA AUDITIVA

### 5.1- DEFICIÊNCIA AUDITIVA SINDRÔMICA

Mutações em genes responsáveis por surdez neurossensorial associadas com quadros sindrômicos são identificadas freqüentemente. Acredita-se que há mais de 400 quadros sindrômicos nos quais a perda auditiva é uma das características. A tabela II exemplifica algumas síndromes e suas características.

**Tabela 2 – Exemplos de Síndrome associadas a deficiência auditiva.**

SURDEZ ASSOCIADA COM:	SÍNDROMES
	Treacher Collins
Malformações craniofaciais e cervicais	Crouzon
	Apert
	Osteogênese Imperfeita
Displasias esqueléticas	Waardenburg
Anomalias cutâneas	Alport
Disfunção renal	Usher
Anomalias oculares	Fraser
	Pendred
	Hurler
Disfunções metabólicas	Trissomia do cromossomo 18
	Trissomia do cromossomo 21
Anomalias cromossômicas	

## 5.2- DEFICIÊNCIA AUDITIVA NÃO SINDRÔMICA

A surdez não-sindrômica é altamente heterogênea. Acredita-se que mais de 100 genes possam estar envolvidos na deficiência auditiva não-sindrômica (SOBE *et al.*, 2000), que pode se apresentar com vários padrões de herança: autossômico recessivo em 80% dos casos, autossômico dominante em 15%, ligados ao cromossomo X em 1 - 3% dos casos, e também 2% dos casos com herança materna devido a mutações em genes mitocondriais (KALATZIZ & PETIT, 1998).

Até o momento, em relação às formas não-sindrômicas de surdez, mais de 90 *loci* foram mapeados: 51 para as formas autossômicas dominantes, 39 para as formas recessivas, e 8 ligados ao cromossomo X. Dentre esses *loci* mapeados, foram clonados 32 genes nucleares e 2 genes mitocondriais.

O gene **GJB2**, que codifica a proteína conexina 26, foi o primeiro a ser identificado como responsável por surdez neurosensorial não-sindrômica com padrão de herança autossômico recessivo. A partir de então, muitos outros genes envolvidos no fenótipo de surdez neurosensorial não-sindrômica foram clonados e estão sendo estudados, como mostra a tabela III (VAN CAMP and SMITH). O presente trabalho tem como objetivo o estudo do gene **GJB3**, que codifica a proteína conexina 31.

**Tabela 3 – Genes envolvidos nas formas não-sindrômicas de surdez.**

GENE	LOCUS	FORMA	REFERÊNCIAS
GJA1 (Cx43)		Autossômica recessiva	LIU <i>et al.</i> , 2001
SLC26A5		Autossômica recessiva	LIU <i>et al.</i> , 2003
GJB2 (Cx26)	DFNB1	Autossômica recessiva	KELSELL <i>et al.</i> , 1997
	DFNA3	Autossômica dominante	KELSELL <i>et al.</i> , 1997
GJB3 (Cx31)	DFNA2	Autossômica dominante	XIA <i>et al.</i> , 1998
GJB6 (Cx30)	DFNA3	Autossômica dominante	GRIFA <i>et al.</i> , 1999
	DFNB1	Autossômica recessiva	DEL CASTILLO <i>et al.</i> , 2002
MYO7A	DFNB2	Autossômica recessiva	LIU <i>et al.</i> , 1997, WEILL <i>et al.</i> , 1997
	DFNA11	Autossômica dominante	LIU <i>et al.</i> , 1997
MYO15	DFNB3	Autossômica recessiva	WANG <i>et al.</i> , 1998
MYO3A	DFNB30	Autossômica recessiva	WALSH <i>et al.</i> , 2002
MYO6	DFNA22	Autossômica dominante	MELCHIONDA <i>et al.</i> , 2001
	DFNB37	Autossômica recessiva	AHMED <i>et al.</i> , 2003
MYO1A	DFNA48	Autossômica dominante	DONAUDY <i>et al.</i> , 2003
SLC2A4	DFNB4	Autossômica recessiva	LI <i>et al.</i> , 1998
TMIE	DFNB6	Autossômica recessiva	NAZ <i>et al.</i> , 2002
TMC1	DFNB7	Autossômica recessiva	KURIMA <i>et al.</i> , 2002
	DFNB11		
	DFNA36	Autossômica dominante	KURIMA <i>et al.</i> , 2002
TMPRSS3	DFNB8	Autossômica recessiva	SCOTT <i>et al.</i> , 2001
	DFNB10		
OTOF	DFNB9	Autossômica recessiva	YASUNAGA <i>et al.</i> , 1999
CDH23	DFNB12	Autossômica recessiva	BORK <i>et al.</i> , 2001
STRC	DFNB16	Autossômica recessiva	VERPY <i>et al.</i> , 2001
USH1C	DFNB18	Autossômica recessiva	AHMED <i>et al.</i> , 2002
TECTA	DFNA8	Autossômica dominante	VERHOEVEN <i>et al.</i> , 1998
	DFNA12		
	DFNB21	Autossômica recessiva	MUSTAPHA <i>et al.</i> , 1999
OTOA	DFNB22	Autossômica recessiva	ZWAENEPOEL <i>et al.</i> , 2002
CLDN14	DFNB29	Autossômica recessiva	WILCOX <i>et al.</i> , 2001
DIAPH1	DFNA1	Autossômica dominante	LYNCH <i>et al.</i> , 1997
KCNQ4	DFNA2	Autossômica dominante	KUBISCH <i>et al.</i> , 1999
DFNA5	DFNA5	Autossômica dominante	VAN LAER <i>et al.</i> , 1998
WFS1	DFNA6	Autossômica dominante	BESPALOVA <i>et al.</i> , 2001
	DFNA14		YOUNG <i>et al.</i> , 2001
COCH	DFNA9	Autossômica dominante	ROBERTSON <i>et al.</i> , 1998
EYA4	DFNA10	Autossômica dominante	WAYNE <i>et al.</i> , 2001
COL11A2	DFNA13	Autossômica dominante	MC GUIRT <i>et al.</i> , 1999
POU4F3	DFNA15	Autossômica dominante	VAHAVA <i>et al.</i> , 1998
MYH9	DFNA17	Autossômica dominante	LALWANI <i>et al.</i> , 2000
TFCP2L3	DFNA28	Autossômica dominante	PETERS <i>et al.</i> , 2002
POU3F4	DFN3	Ligada ao X	DE KOK <i>et al.</i> , 1995

Não surpreende a quantidade de *loci* envolvidos no fenótipo da surdez, se considerarmos que a cóclea é um dos órgãos mais complexos do ser humano. Como responsável pela audição, utiliza-se de aproximadamente 16.000 células sensoriais ciliadas que dependem, para seu bom funcionamento, de despolarização da membrana celular e

transdução mecanoelétrica, liberação da transmissão e transporte de íons, entre outros eventos (AVRAHAN, 1997).

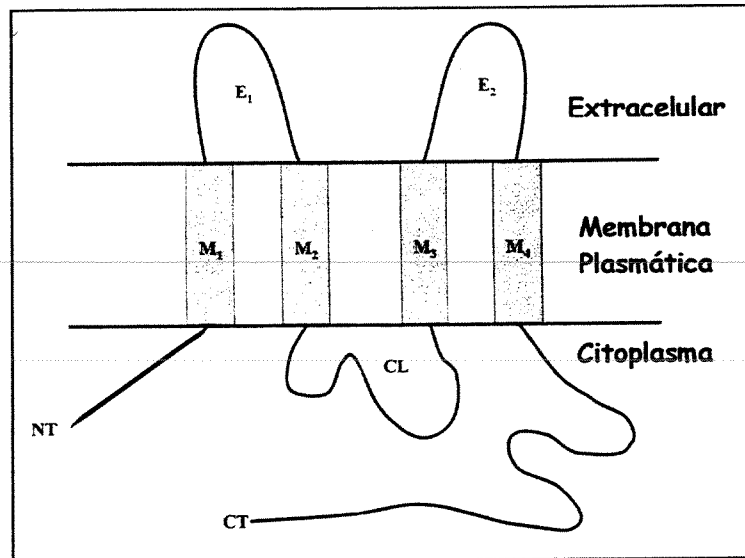
Informações sobre novos genes e suas proteínas estão revolucionando os conhecimentos dos processos moleculares envolvidos na perda auditiva que poderão facilitar o surgimento de terapias específicas que possam retardar ou prevenir o surgimento da surdez; um exemplo específico é o de contra-indicar o uso de aminoglicosídeos em portadores de mutações mitocondriais específicas que predisõem a ototoxicidade.

## 6- CONEXINAS E SUAS FUNÇÕES

A conexina 31 (Cx31) é um tipo de beta conexina codificada pelo gene **GJB3** (*gap junction protein, beta-2*). Em termos evolutivos, as conexinas podem ser agrupadas em pelo menos três subfamílias -  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ . No entanto, a nomenclatura mais comum é baseada no peso molecular da proteína, ou seja, Cx26 (**GJB2**), Cx30 (**GJB6**), Cx31 (**GJB3**), Cx32 (**GJB1**), Cx43 ( $\alpha 1$ ) e assim sucessivamente (KRUTOVSKIKH & YAMASAKI, 2000).

Mutações nesses genes causam surdez com herança autossômica recessiva (**GJB2** e **GJB3**), autossômica dominante (**GJB2**, **GJB3** e **GJB6**) ou ligada ao X (**GJB1**). Além disso, são responsáveis tanto por surdez síndrômica (**GJB2**, ceratoderma palmoplantar; **GJB3**, *eritrokeratoderma variabilis*; e **GJB1**, neuropatia periférica), como não síndrômica (**GJB2**, **GJB3** e **GJB6**) (RABIONETE *et al.*, 2000).

Os genes que codificam as proteínas conexinas são muito semelhantes entre si; apresentam uma região codificante contendo um exon separado da região não traduzida 5' por um intron de tamanho variável. Membros das famílias das conexinas (14 isoformas já identificadas em mamíferos) possuem seqüências altamente conservadas e quatro domínios transmembrânicos (M1-M4) separados por dois *loops* extracelulares (E1-E2) e um *loop* citoplasmático (CL), com suas extremidades carboxi e amino-terminal presentes no citoplasma (BRUZZONE *et al.*, 1996). A figura 2 mostra um esquema da conexina 31.



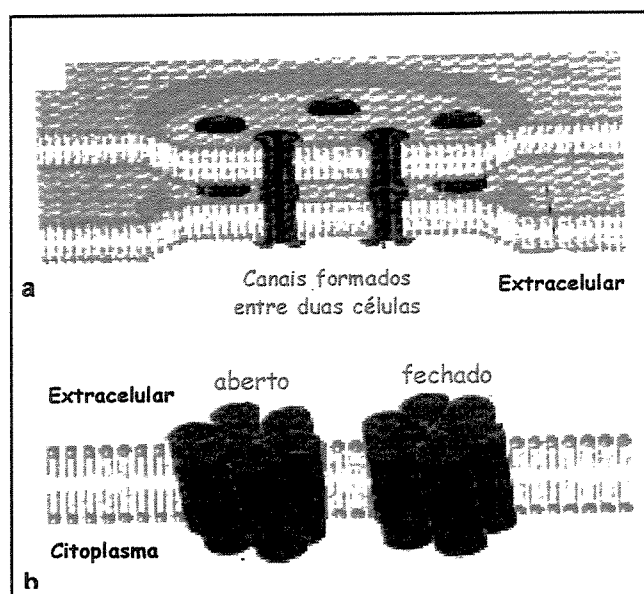
**Figura 2** – Representação esquemática da proteína Cx31. Fonte: LIU *et al.*, 2000.

Os dois *loops* extracelulares das proteínas conexas são estruturas críticas para a união dos hemicanais (*conexons*) na formação de um canal funcional. Três cisteínas, conservadas em todas as espécies de conexas, são localizadas em cada um desses dois *loops* e são cruciais para a estabilização intramolecular. Além disso, esses domínios são responsáveis pela compatibilidade seletiva entre diferentes espécies de conexas para formar canais heterotípicos funcionais (FOOTE *et al.*, 1998). A composição dos aminoácidos e o tamanho do *loop* citoplasmático são bastante variáveis entre as conexas, e é nessa região que os polimorfismos são mais frequentemente detectados em algumas dessas proteínas (KRUTOVSKIKH & YAMASAKI, 2000).

Em relação aos quatro domínios transmembrânicos, o conhecimento de suas funções é limitado. Sabe-se que, certamente, um deles está envolvido na formação dos canais *gap junctions*. Além disso, a identificação de várias mutações associadas com deficiência auditiva na mesma região do domínio M3 de três genes de conexas (Cx26, Cx31 e Cx32) sugere que este domínio é importante para o funcionamento das proteínas e que possui um papel vital na formação dos *conexons* nas células do ouvido interno (LIU, *et al.*, 2000). Os *conexons* são formados, mas o transporte é prejudicado devido a ligação

incorreta entre dois *conexons* ou à incapacidade de formação de uma *gap junction* funcional entre eles.

Um *conexon* é formado por seis moléculas de conexinas que se agrupam. *Conexons* de células vizinhas unem-se para formar o canal *gap junction* e, assim estabelecer a comunicação intercelular entre elas (figura 3). Cada *conexon* é composto de um único tipo de conexina, mas pode se unir com *conexons* de outros tipos de conexinas formando um canal heterotípico.



**Figura 3** – Representação esquemática da gap junction. (a) Membrana de duas células adjacentes e (b) estrutura de um conexon.  
Fonte: STEEL *et al.*, 1998.

Em contraste de todas as outras conexinas isoformas, a conexina 31 (Cx31) caracteriza-se por formar canais homotípicos, ou seja, os *conexons* da Cx31 só formam canais funcionais quando unidos com *conexons* da mesma proteína (STEEL, 1998). Além disso, a Cx31 apresenta uma diferença em relação às outras conexinas por apresentar um resíduo adicional de três cisteínas no *loop* extracelular E2, o que pode ser a causa dessa interação restrita da Cx31 com outras conexinas.

Os mecanismos de *gap junctions* permitem a transmissão rápida de pequenas moléculas e íons e facilitam a deflagração quase instantânea de potenciais de ação. Essas proteínas são altamente expressas em vertebrados nas camadas da epiderme. As *gap junctions* são raras entre os neurônios de mamíferos, mas são comuns em células não neurais como células gliais, epiteliais e do músculo cardíaco.

Existem outras evidências, porém, de que as conexinas podem possuir funções não diretamente relacionadas com as *gap junctions* da comunicação intercelular. Recentes experimentos de transfecção revelaram que a capacidade das conexinas regular a expressão dos genes que controlam o crescimento, a diferenciação celular e a supressão de tumorigenicidade não está necessariamente correlacionada com a capacidade das células se comunicarem via *gap junctions* (KRUTOVSKIKH & YAMASAKI, 2000).

O papel fisiológico das conexinas está ligado a muitas doenças humanas com mutações em genes específicos de conexinas. Mutações em cinco diferentes conexinas têm sido associadas à perda auditiva, Cx26, Cx31, Cx30, Cx32 e Cx43 (RABIONET *et al.*, 2000). Mutações no gene **GJB2** (Cx26) são mais prevalentes, acometendo mais de 50% dos casos de perda auditiva não síndrômica, principalmente com padrão de herança autossômico recessivo (KELSELL *et al.*, 1997). No entanto, o grau de surdez não pode ser predito apenas com base nas mutações previamente encontradas no gene da conexina 26, visto o grande número de genes envolvidos.

Uma das maiores dificuldades com relação ao aconselhamento genético de indivíduos portadores de mutações no gene da conexina 26 é que em aproximadamente 10 a 40% dos casos as mutações são detectadas em apenas um dos alelos, tornando o aconselhamento genético dessas famílias extremamente problemático.

## 7- O GENE GJB3

O gene **GJB3** que codifica a proteína conexina 31 (Cx31), está localizado no cromossomo 1p35.1. Mutações nesse gene estão associadas a surdez não síndrômica, principalmente com padrão de herança autossômico dominante e, à doença de pele chamada *eritrokeratoderma variabilis*, também com padrão dominante (RICHARD *et al.*, 1998; RICHARD *et al.*, 2000). Foram também detectados portadores de mutações no gene

**GJB3** em heterozigose com audição normal, em contraste com outros heterozigotos que apresentaram surdez progressiva. Portanto, parece que mutações no gene **GJB3** podem resultar em diferentes fenótipos, com diferentes formas de surdez transmitidas de modo recessivo ou dominante. Nesta região do cromossomo 1(p34-35), existem outros genes que codificam proteínas conexinas: **GJA4** (Cx37), **GJB5** (Cx31.1) e **GJB4** (Cx30.3). Mutações associadas com *eritrokeratoderma variabilis* foram encontradas nos genes **GJB3** e **GJB4** (GOTTFRIED *et al.*, 2002).

O gene **GJB3** foi isolado de um clone contendo 16kb de inserto, do qual 3.281pb foram seqüenciados (EMBL Acession No. AJ004856). O codon de início (ATG) está localizado na posição 797 e o codon de terminação (TGA) na posição 1.609 (WENZEL *et al.*, 1998). A proteína Cx31 humana possui 270 aminoácidos e uma seqüência única de 813pb, apresentando 82% de similaridade com a dos roedores (HOH *et al.*, 1991; HENNEMANN *et al.*, 1992). Assim, a proteína de camundongos difere da de humanos em 40 resíduos, os quais estão normalmente limitados ao *loop* citoplasmático.

## 8- CONSIDERAÇÕES GERAIS

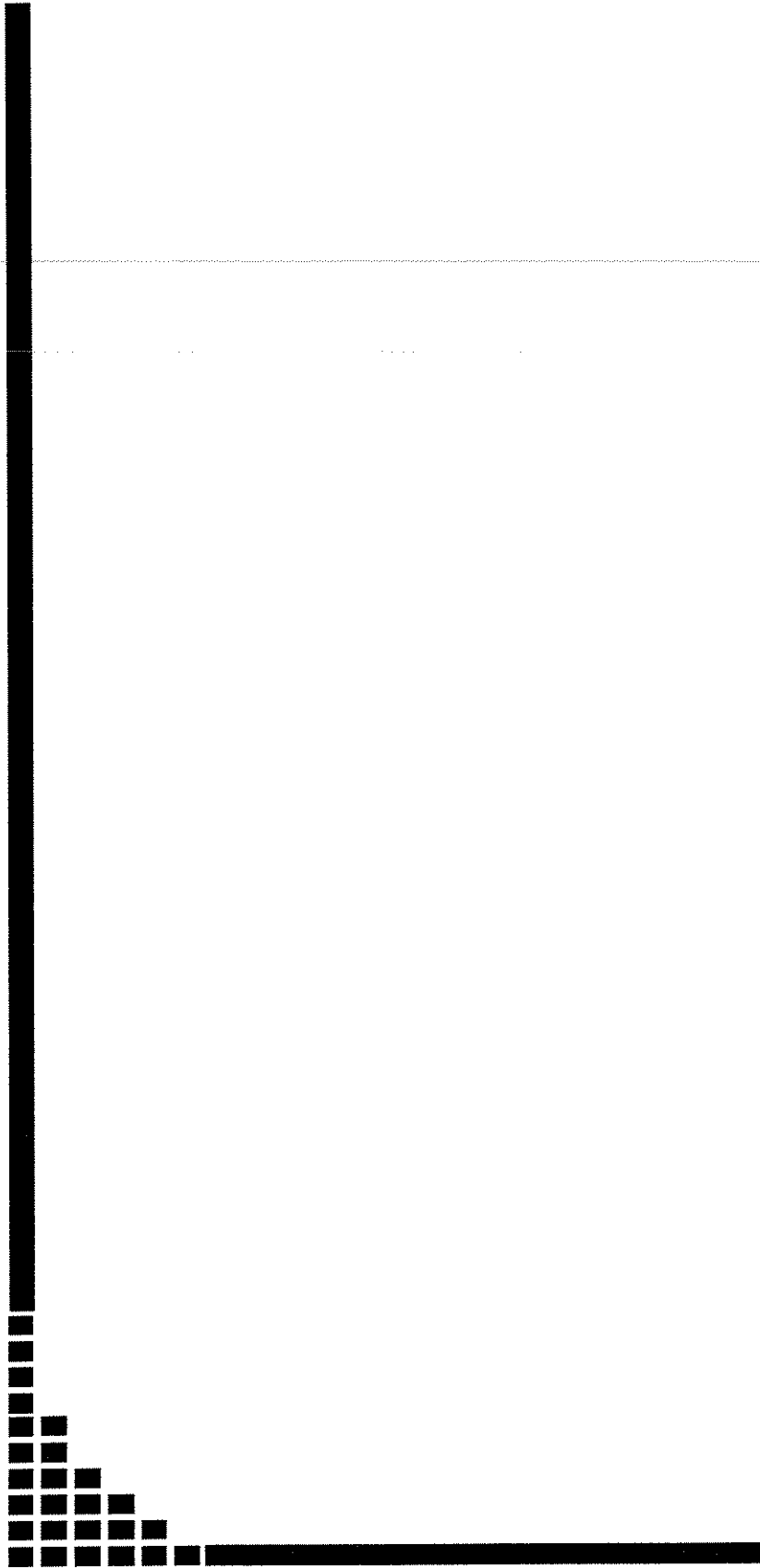
A grande quantidade de informações do projeto genoma humano tem contribuído para localização de genes relacionados à surdez, que têm sido isolados e clonados, devido ao grande número de marcadores em cromossomos humanos. A utilização de modelos animais, por intermédio de mutagênese induzida, também permite a identificação de genes relacionados à surdez em camundongos com posterior identificação de seus homólogos em humanos (HARDISTY *et al.*, 1999).

Os recentes progressos no entendimento da biologia molecular da surdez trazem algumas possibilidades de tratamento alternativo que poderão estar disponíveis no futuro, como a terapia gênica, o tratamento medicamentoso e a regeneração das células ciliadas. A terapia gênica é a possibilidade de intervenção mais evidente sobre defeitos genéticos e se baseia na introdução de uma versão normal de um gene alterado dentro de uma célula apropriada. Alguns trabalhos têm sido realizados com o intuito de introduzir genes em células neurosensoriais do ouvido interno, mas seus resultados ainda não foram avaliados (STEEL, 2000b). Uma alternativa poderia ser a terapia medicamentosa,



utilizando, por exemplo, outras conexinas que sejam capazes de substituir a **Cx26** na formação das *gap junctions*, mas cujo gene não seja normalmente expresso na cóclea. Medicamentos poderão ser desenvolvidos para ativar a expressão do gene de uma conexina alternativa nas células que precisarem formar *gap junctions* (STEEL, 2000b).

A viabilidade de *screening* de mutações no gene **GJB3**, que está associado à surdez não síndrômica e a quadros associados a enfermidades de pele (RABIONET *et al.*, 2000), pode trazer respostas para muitos casos de perda auditiva que não são decorrentes de mutações em homozigose no gene **GJB2**, permitindo o aconselhamento genético das famílias e trazendo mais informações a respeito do complexo mecanismo que envolve a audição humana. Um elemento que dificulta o aconselhamento genético é a grande variabilidade na deficiência auditiva devido a mutações em diferentes genes de conexinas dificultando, assim, o estabelecimento de um prognóstico caso venham a surgir novos casos na família (DENOYELLE *et al.*, 1999).



## ***OBJETIVOS***

## 1. OBJETIVOS GERAIS

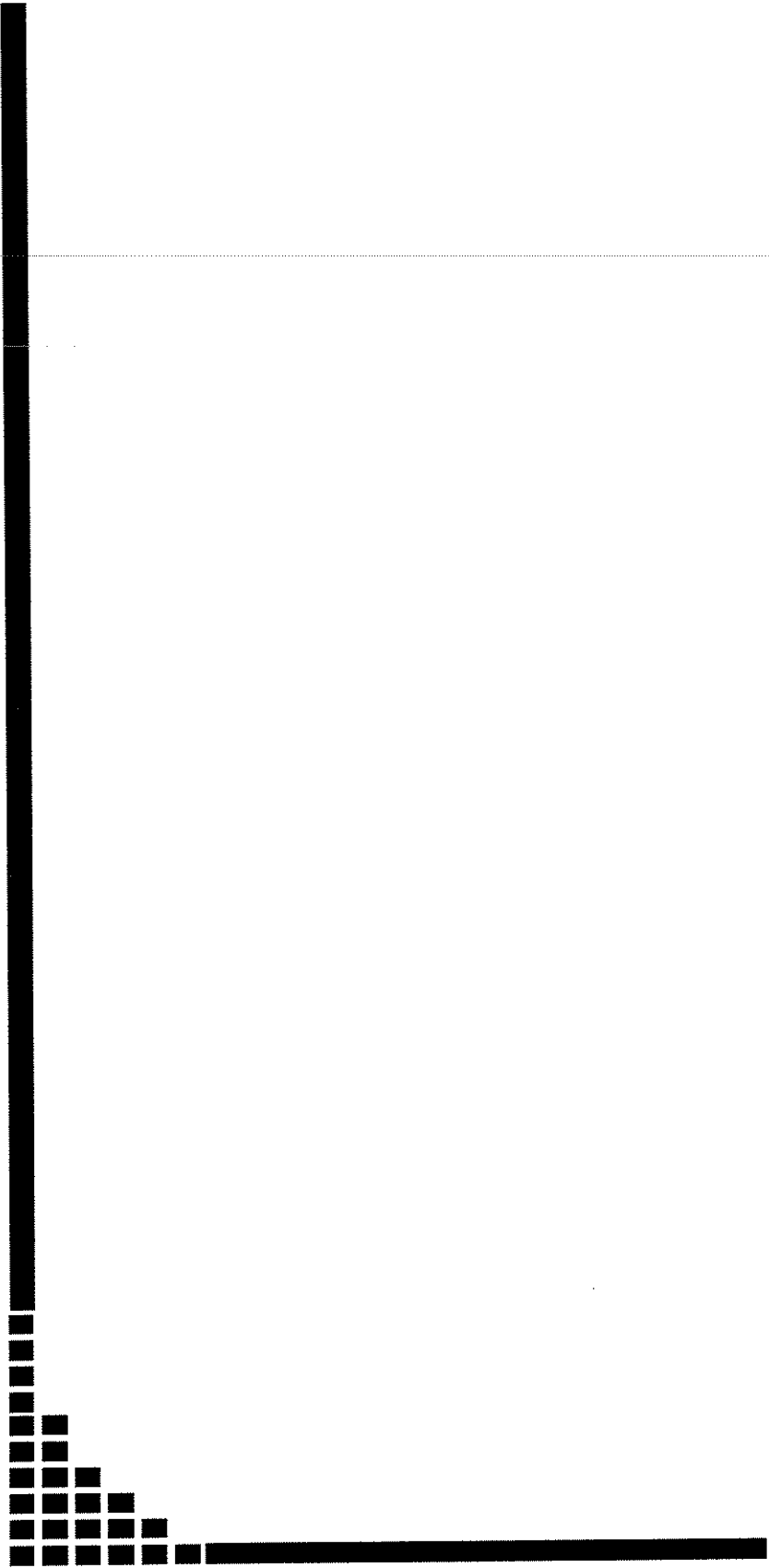
Estudo de mutações no gene **GJB3** em indivíduos portadores de deficiência auditiva neurossensorial não-sindrômica.

---

## 2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Análise molecular do gene **GJB3** em:

- indivíduos com surdez neurossensorial não-sindrômica que não apresentam alterações no gene **GJB2**;
- indivíduos com surdez neurossensorial não-sindrômica que apresentam alteração no gene **GJB2** somente em um dos alelos.



***MATERIAL E  
MÉTODOS***

## 1- CASUÍSTICA

Os indivíduos estudados foram divididos em três grupos diferentes. Alguns (Grupos A e B) apresentavam avaliação clínica prévia, excluindo ao máximo que a surdez tivesse sido por fatores ambientais ou que tivesse associada a um quadro sindrômico. Outros pacientes (Grupo C), provenientes de diferentes centros do país, não haviam sido submetidos a esta avaliação clínica e foram encaminhados por apresentarem surdez de origem não esclarecida.

Os grupos **A** e **B** compreendem os indivíduos provenientes do ambulatório de Genética do Centro de Estudos e Pesquisas em Reabilitação (CEPRE) da Faculdade de Ciências Médicas (FCM) da Unicamp, com avaliação genético-clínica e hipótese diagnóstica de deficiência auditiva não-sindrômica de origem genética (casos com recorrência familiar) ou indefinida (casos esporádicos) onde o gene **GJB2** foi previamente estudado (OLIVEIRA *et al.*, 2002). O **grupo A** corresponde aos indivíduos que não apresentavam nenhuma alteração no gene **GJB2** e o **grupo B** os indivíduos com mutação em um dos alelos deste gene.

Os indivíduos do **grupo C** são provenientes de outros centros do país sem diagnóstico genético-clínico prévio e sem análise gene **GJB2**, o qual foi analisado juntamente com o gene **GJB3**, que foram encaminhados por apresentarem deficiência auditiva de origem não esclarecida. Os grupos estudados estão representados na tabela IV.

**Tabela 4 – Relação dos indivíduos estudados.**

GRUPOS	NÚMERO DE FAMÍLIAS	NÚMERO DE INDIVÍDUOS	CASOS ISOLADOS	CASOS COM RECORRÊNCIA FAMILIAL	PROCEDÊNCIA	SELEÇÃO DOS INDIVÍDUOS
A	41	45	31 famílias	10 famílias (15,16,21,25, 26, 27, 29, 36, 47 e 54)	CEPRE Unicamp	Deficiência auditiva neurossensorial não síndrômica de etiologia não esclarecida sem mutação no gene <b>GJB2</b> .
B	9	11	7 famílias	2 famílias (31, 40)	CEPRE Unicamp	Deficiência auditiva neurossensorial não síndrômica de etiologia não esclarecida com mutação no gene <b>GJB2</b> em um dos alelos.
C	17	48	12 famílias	5 famílias (1, 4, 5, 10 e 14)	Clínicas diversas	Deficiência auditiva neurossensorial não síndrômica de etiologia não esclarecida

## 2- MÉTODOS

### 2.1- EXTRAÇÃO DE DNA GENÔMICO DE SANGUE PERIFÉRICO

O DNA genômico foi extraído de leucócitos obtidos a partir de 10 a 15 ml de sangue periférico coletados em tubos *Vacutainer* contendo EDTA 10% de acordo com o protocolo adaptado ao laboratório de Genética Humana do CBMEG e descrito a seguir:

Adicionou-se ao sangue coletado 35ml da solução A (Triton-X 100 a 1%; MgCl<sub>2</sub> 5mM; Sacarose 0,32M; Tris-HCl 10mM pH 8,0) e, após homogeneização, a mistura foi colocada em gelo por 30 minutos para ocorrer lise das hemácias. Em seguida,

centrifugou-se a 2500 rpm por 15 minutos a 4°C, retirou-se o sobrenadante e ressuspendeu-se o *pellet* em 20ml de solução A, centrifugou-se novamente por 15 minutos a 2500 rpm em temperatura ambiente e retirou-se o sobrenadante. Depois ressuspendeu-se o *pellet* em 1ml de solução B 2X concentrada (Na<sub>2</sub>EDTA 20 mM; NaCl 20 mM; Tris-HCl 20 mM pH 8,0), e adicionou-se 250µl de solução C preparada na hora (para 1 ml de solução C: 0,5 ml de solução B, 1 mg de Proteinase K (*Boehringer Mannheim GmbH, Mannheim, Alemanha*), 0,5 ml de SDS 10%). Incubou-se a amostra em banho-maria a 37°C por aproximadamente 18 horas a 56°C durante 2 horas.

Após este período de incubação, procedeu-se à purificação do DNA genômico com fenol/clorofórmio, que permite a remoção de peptídeos e proteínas de soluções aquosas. Acrescentou-se às amostras a mesma proporção (volume/volume) de fenol saturado com tampão Tris-HCl 10 mM pH 8,0, homogeneizou-se por inversão lenta os tubos por 5 minutos e centrifugou-se a 2500 rpm por 15 minutos em temperatura ambiente. Em seguida, coletou-se o sobrenadante em um novo tubo, descartando o precipitado e esta etapa de extração com fenol foi repetida por mais uma vez. À fase aquosa coletada anteriormente acrescentou-se igual volume de clorofórmio/álcool isoamílico na proporção 24:1 e centrifugou-se novamente a 2.500 rpm por 15 minutos em temperatura ambiente, para a separação da fase aquosa.

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

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

## 2.2- AMPLIFICAÇÃO DO GENE GJB3

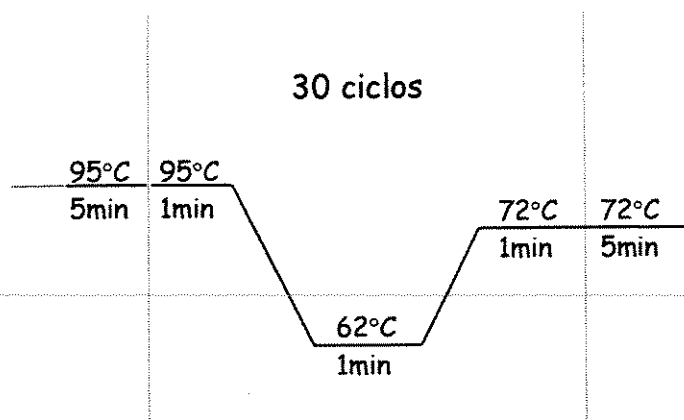
O **GJB3** é composto de apenas um exon codificante com 813 pb (GenBank, número de acesso: AF099730) amplificado pela técnica de PCR (*Polymerase Chain Reaction*) utilizando-se as seqüências de 5 pares de *primers* descritas abaixo (XIA *et al.*, 1998). Os *primers* ou iniciadores são oligonucleotídeos sintéticos a partir do qual os desoxinucleotídeos trifosfato (dNTPs) são incorporados e tem início a elongação da cadeia de DNA respeitando-se a complementaridade de bases (A-T/C-G).

**Tabela 5** – Seqüência dos cinco pares de *primers* usados na amplificação do gene GJB3.

PAR	PRIMERS 5'→3'	TAMANHO DO PRODUTO DE PCR
1	<b>Cx1F</b> – ATT CTC TCA GGT AGG CAC GG <b>Cx1R</b> – TGG TGT TGC AGT CAA AGT CC	210pb
2	<b>Cx2F</b> – TAT ACG TGG TGG CTG CAG AG <b>Cx2R</b> – CTG CGT TGT CGT ACA GCT TG	270pb
3	<b>Cx3F</b> – CTC GCT GCT GGT CAT CCT <b>Cx3R</b> – CAT ATT GAA GCC ATG CCA GA	223pb
4	<b>Cx4F</b> – TTC CTC TAC CTG CTG CAC AC <b>Cx4R</b> – GGC AGA TGA GGT AGC AGA GC	202pb
5	<b>Cx5F</b> – CCG TCT GCA TCG TAC TCA CC <b>Cx5R</b> – CCT GCC CTG TGG TCA GAT	255pb

A amplificação dos fragmentos do gene **GJB3** consistiu em 30 ciclos usando 200 a 500ng de DNA genômico, 200µM de cada desoxinucleotídeo trifosfato (dATP, dCTP, dGTP e dTTP), 20pmol de cada *primer*, 2,5U de enzima *Taq* DNA polimerase em tampão de PCR 10X (Tris-HCl 10mM pH 8,8) e 1,5mM de MgCl<sub>2</sub>, em um volume final de reação de 40µl, utilizando-se os ciclos de amplificação segundo LIU *et al.* (2000). A figura 4 representa os ciclos de amplificação utilizados de acordo com a T<sub>m</sub> de cada *primer*, a qual foi padronizada em 62°C para os cinco pares de *primers*.





**Figura 4** - Ciclos de amplificação do gene **GJB3**.

Os produtos de amplificação foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1% em tampão TBE 1X e, após coloração com brometo de etídio, o gel foi visualizado sob iluminação ultravioleta e fotografado.

### 2.3- AMPLIFICAÇÃO DO GENE GJB2

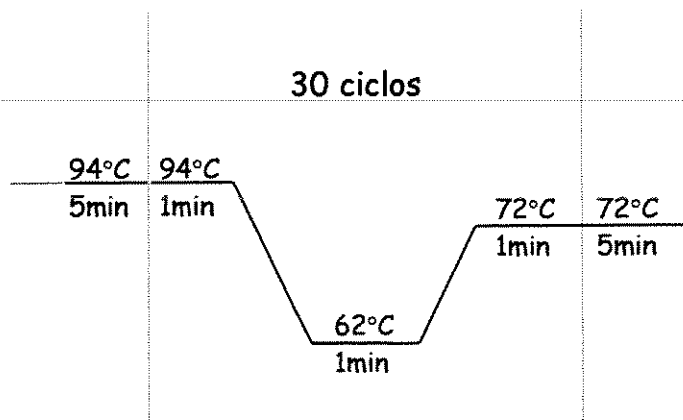
O gene **GJB2** também é composto de apenas um exon codificante (*GenBank*, número de acesso: M86849), que foi amplificado pela técnica da PCR utilizando dois pares de *primers* descritos na tabela VI de acordo com KELSELL *et al.* (1997) e DENOYELLE *et al.* (1997).

**Tabela 6** – Sequência dos *primers* usados na amplificação do gene **GJB2**.

PAR	PRIMERS 5'→3'	TAMANHO DO PRODUTO DE PCR
1	Cx1F – TCT TTT CCA GAG CAA ACC GC	284pb
	Cx1R – GAC ACG AAG ATC AGC TGC AG	
2	Cx2F – CCA GGC TGC AAG AAC GTG TG	520pb
	Cx2R – GGG CAA TGC GTT AAA CTG GC	

A amplificação do gene **GJB2** consistiu em 30 ciclos usando 200 a 500ng de DNA genômico, 200µM de cada desoxinucleotideo trifosfato (dATP, dCTP, dGTP e dTTP), 20pmol de cada *primer* (direto e inverso), 2,5U de enzima *Taq* DNA polimerase em tampão de PCR 10X (Tris-HCl 10mM pH 8,8) e 1,5mM de MgCl<sub>2</sub>, em um volume final de

reação de 50µl. A figura 5 representa os ciclos de amplificação utilizados para os dois fragmentos do gene **GJB2**.



**Figura 5 - Ciclos de amplificação do gene GJB2.**

Os produtos de amplificação do gene **GJB2** foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1% em tampão TBE 1X e, após coloração com brometo de etídio, o gel foi visualizado sob iluminação ultravioleta e fotografado.

#### **2.4- SSCP (*SINGLE STRAND CONFORMATION POLYMORPHISM*)**

A técnica consiste em analisar a migração da fita simples do gene, sendo que os fragmentos de DNA dupla fita são desnaturados e as fitas simples são separadas em gel de poliacrilamida em condições não desnaturantes. Nestas condições, cada fita simples assume uma conformação estrutural dependendo das interações internas e do pareamento de bases de sua própria seqüência nucleotídica. Portanto, são visualizados padrões de migração específicos para cada fita simples.

O gel foi preparado em placas (42cm x 33,5cm e 39,5cm x 33,5cm) separadas por espaçadores de 1mm de espessura. Na placa maior passa-se 3ml de *Repel-Silane* - Pharmacia (substância repelente à base de silicone), e na placa menor usa-se *Bind* - Pharmacia, para o gel ficar aderido à placa para posterior coloração. O gel é composto de glicerol 20%, acrilamida/bisacrilamida 40% e tampão TAE 50X (Tris-Acetato-EDTA), em

um volume final de 150ml, 800µl de persulfato de amônio 10% e 80µl de TEMED, para polimerização do gel.

Em relação ao fragmento 2 (produto de PCR amplificado com os pares de *primers* Cx2F e Cx2R) do gene **GJB3** não foi possível a padronização de condições ideais de corrida; no entanto, a técnica foi desenvolvida utilizando géis manuais, em placas de 200mm X 180mm, na mesma composição que o gel anterior só que em um volume final de 40ml, utilizando-se, portanto, 300µl de persulfato de amônio 10% e 50µl de TEMED.

Foram preparadas alíquotas com 10µl dos produtos de PCR e 10µl de uma solução desnaturante (95% de formamida, 0,05% de azul de bromofenol e EDTA 20mM em pH 8,0). Esta proporção 1:1 de solução desnaturante/PCR pode variar de acordo com a concentração do fragmento. Recomenda-se que o produto da PCR tenha uma concentração de 100ng/µl. Estas alíquotas foram desnaturadas a 95°C por 5 minutos e aplicadas ao gel.

As condições de corrida para o gel grande foram padronizadas entre 250 e 300Vh por 14 horas, e uma pré-corrída de aproximadamente 30min, e para o gel pequeno 100V também por aproximadamente 14 horas. Em seguida, o gel foi corado da seguinte forma:

**Fixação** - 10% etanol; 0,5% ácido acético, por 20 minutos à temperatura ambiente;

**Impregnação** - solução de nitrato de prata 0,15 % por 20 minutos para o gel grande e, apenas 10 minutos para o gel pequeno;

Lavagem com água destilada;

**Revelação** - 6g NaOH, 1,2 ml formaldeído, q.s.q 200ml H<sub>2</sub>O;

**Interrupção** - repetir solução de fixação.

Após a coloração, os géis foram fotografados e analisados. Uma vez encontrada alguma diferença na mobilidade eletroforética (*shift*) em relação aos controles normais, tais fragmentos foram seqüenciados.

## 2.5- CLONAGEM

Para a clonagem de seqüências do gene **GJB2** e **GJB3** foi utilizado o kit pGEM (Promega). Este kit permite a clonagem rápida e eficiente de fragmentos amplificados pela técnica de PCR. O método se baseia na característica da *Taq* polimerase de adicionar uma

simples dexosiadenosina (A) na extremidade 3' dos produtos de PCR. O vetor pGEM já é linearizado e possui na região 3' terminal um resíduo de desoxitimidina (T) permitindo que inserto e vetor com extremidades coesivas se liguem eficientemente. As etapas do processo de clonagem estão listados abaixo.

### **2.5.1- LIGAÇÃO**

Os fragmentos amplificados pela PCR foram utilizados como inserto na ligação ao plasmídeo. Na ligação do inserto ao plasmídeo utilizou-se 125ng de inserto, 50ng do vetor (proporção vetor/inserto 1:2,5), tampão 2X e 3U de enzima T4 DNA ligase em um volume total de reação de 10/ $\mu$ l. Esta reação foi incubada por 1 hora a temperatura ambiente.

### **2.5.2- TRANSFORMAÇÃO**

Foram utilizadas bactérias da linhagem DH5 $\alpha$  descritas por HANAHAN (1983). O protocolo para obtenção de células DH5 $\alpha$  competentes foi baseado segundo o descrito por NISHIMURA *et al.* (1990). No estado de competência, as bactérias tornam-se aptas a adquirirem seqüências de DNA exógeno, inclusive DNA plasmidial. O processo de captura e incorporação do DNA exógeno é denominado transformação bacteriana. A aquisição do plasmídeo contendo o inserto pelas células DH5 $\alpha$  foi desencadeada após choque térmico. Em 100 $\mu$ l de células DH5 $\alpha$  competentes foram acrescentados 5 $\mu$ l da reação de ligação. Estas células foram mantidas em banho de gelo por 30 minutos e imediatamente após este período promoveu-se a transformação através de um choque térmico a exatos 42°C por 1 minuto. Passado este período, retornou-se as amostras ao banho de gelo por 10 minutos para o fechamento dos poros da membrana celular e retenção dos plasmídios, com ou sem insertos.

Um volume de 900 $\mu$ l de meio LB (bactotripton 1%, extrato de levedura 0,5% e NaCl 1% com pH 7,5) foi adicionado às células. O meio LB continha o antibiótico ampicilina (25mg/ml) utilizado para selecionar apenas as bactérias transformadas, pois somente o plasmídeo contém o gene que confere a resistência a este antibiótico. As

amostras foram mantidas em agitador a 200-300rpm por 1 hora e a 37°C. Em seguida, 200µl de células supostamente transformadas foram plaqueados em meio LB sólido (15% de agar bacteriológico, contendo 25mg/ml de ampicilina e 50mg/ml de X-gal) e incubadas a 37°C durante por 12 horas. O X-gal (5-bromo-4-cloro-3-indolil-β, D-galactosidase) é um substrato para a enzima β-galactosidase (β-gal) cuja região amino terminal do gene está presente no plasmídio exatamente no sítio de inserção do fragmento de PCR. O produto da reação da β-gal é um composto azulado útil na identificação de clones não recombinantes. As colônias de coloração branca indicam que o inserto interrompeu a região amino terminal do gene da β-galactosidase no plasmídio inativando sua função. Este gene é portanto, um gene-repórter, e esta estratégia permite a identificação de colônias de bactérias que possuem ou não o fragmento inserido. As colônias azuis são compostas de bactérias β-gal ativa e, portanto, sem o fragmento clonado no plasmídio.

### 2.5.3- ANÁLISE DOS CLONES RECOMBINANTES

Apenas as colônias brancas foram selecionadas para a amplificação do inserto pela técnica de PCR. Uma colônia de cada vez foi coletada usando-se alça de plástico. Esta colônia isolada foi colocada em um tubo tipo *eppendorf* juntamente com a alça cortada no tamanho do mesmo. Após este procedimento seguem-se as etapas para a realização da PCR.

## 2.6- SEQÜENCIAMENTO

### 2.6.1- SEQÜENCIAMENTO MANUAL

O seqüenciamento do DNA foi realizado para identificação de mutações no gene **GJB3** a partir dos 5 fragmentos do produto de PCR. O método utilizado para o seqüenciamento é o de terminação de cadeias (SANGER *et al.*,1977), utilizando o kit *Thermo Sequenase Radiolabeled termination cycle sequencing* (AMERSHAM *Life Science*), que se baseia no seqüenciamento por incorporação de nucleotídeos terminadores da reação em cadeia da polimerase. Estes didesoxinucleotídeos trifosfatos (ddNTPs) ou terminadores (ddGTP, ddATP, ddTTP e ddCTP) uma vez incorporados na fita em síntese

interrompem o processo de incorporação de outros nucleotídeos. Antes da reação foi realizado um pré-tratamento dos produtos da PCR para eliminar *primers*, fragmentos inespecíficos e nucleotídeos não incorporados durante a reação.

#### **Reação de pré-tratamento**

5  $\mu$ l de produto de PCR (para cada uma das reações)

10U de Exonuclease I (EXO1)

2U de Fosfatase Alcalina de Camarão (SAP)

Esta reação é incubada a 37°C por 15 minutos e 80°C por 15 minutos (para a inativação das enzimas).

#### **Reação com [ $\alpha^{33}$ -P] – ddNTPs**

7 $\mu$ l da reação de pré-tratamento do produto da PCR;

1 $\mu$ l do *primer* (direto ou inverso) ~ 2pmoles;

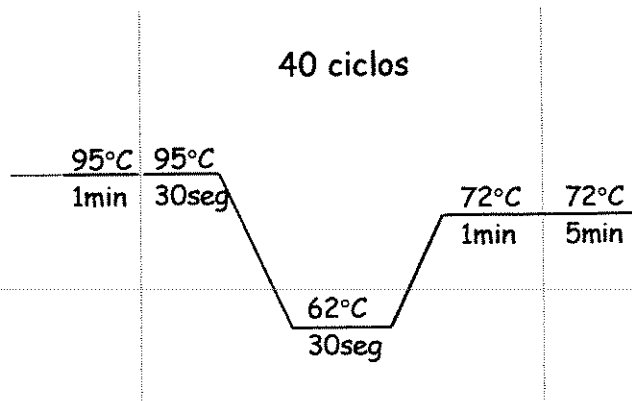
2 $\mu$ l de *reaction buffer* 10X (260mM Tris-HCl, pH 9,5; 65mM MgCl<sub>2</sub>);

8 $\mu$ l de H<sub>2</sub>O;

2 $\mu$ l enzima *Thermo Sequenase* (4U/ $\mu$ l).

Foram distribuídos 4,5 $\mu$ l dessa reação para cada um dos 4 tubos contendo a mistura de terminação que é composta de: 2 $\mu$ l dGTP *termination master mix* (7,5 $\mu$ M/ $\mu$ l dATP, dCTP, dTTP, dGTP) e 0,5 $\mu$ l (0,3 $\mu$ M/ $\mu$ l) de cada ddNTP marcado com  $\alpha^{33}$ -P: ddGTP - 0,3 $\mu$ M [ $\alpha^{33}$ -P] ddGTP (1500Ci/mmol, 450 $\mu$ Ci/ml), 11,25 $\mu$ Ci; ddATP - 0,3 $\mu$ M [ $\alpha^{33}$ -P] ddATP (1500Ci/mmol, 450 $\mu$ Ci/ml), 11,25 $\mu$ Ci; ddTTP - 0,3 $\mu$ M [ $\alpha^{33}$ -P] ddTTP (1500Ci/mmol, 450 $\mu$ Ci/ml), 11,25 $\mu$ Ci; ddCTP - 0,3 $\mu$ M [ $\alpha^{33}$ -P] ddCTP (1500Ci/mmol, 450 $\mu$ Ci/ml), 11,25 $\mu$ Ci.

A reação constou de 40 ciclos, com temperatura de anelamento correspondente ao *primer* utilizado (figura 6).



**Figura 6** - Ciclo utilizado na reação de seqüenciamento manual.

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

**Gel de acrilamida 6%:**

10,5ml de solução estoque de acrilamida a 40% contendo 3% de bisacrilamida

7ml de tampão TBE 10X

29,4g de uréia

H<sub>2</sub>O para um volume final de 70ml

Para a polimerização são adicionados

500µl de persulfato de amônio 10%

50µl de TEMED (Tetrametiletilenodiamino).

A solução foi vertida entre duas placas de vidro (com as dimensões de 42cm x 33,5cm e 39,5cm x 33,5cm) emparelhadas e tendo entre elas espaçadores sem gradiente de espessura. As placas foram previamente lavadas com detergente, acetona e etanol absoluto e somente a placa maior passou por um tratamento com 3ml de *Repel-Silane* (substância repelente à base de silicone).

As amostras foram previamente desnaturadas a 95°C por 5 minutos, aplicadas no gel de seqüenciamento (2 a 4µl) e submetidos a uma corrida eletroforética nas condições de 2000V, 50W e 50mA. O tempo de corrida foi adaptado a 2 horas de acordo com o tamanho dos fragmentos, proporcionando a leitura completa do exon.

Após a corrida eletroforética as placas foram desmontadas. Em função do *Repel-Silane* a placa maior separa-se sem dificuldade do gel que permanece na placa menor. Da placa menor o gel foi transferido para um papel 3MM (papel de filtro) nas mesmas dimensões da placa. A porosidade deste papel e sua qualidade de absorvente por capilaridade promovem a aderência do gel ao papel. Em seguida o papel foi envolto em filme de PVC para embalagem e permaneceu secando por 1 hora a 80°C num secador a vácuo. Após a secagem, este papel foi exposto a um filme sensível (Kodak Biomax) durante 72 horas.

## 2.6.2- SEQÜENCIAMENTO AUTOMÁTICO

### 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 foram quantificadas usando-se o marcador de peso molecular *Low Mass DNA Ladder* (GIBCO) para posterior seqüenciamento.

### Reação de seqüenciamento automático para produto de PCR

As reações de seqüenciamento foram corridas no seqüenciador automático ABI PRISM™ 377 (*Perkin Elmer*) utilizando-se o *BigDye™ Terminator Cycle Sequencing Kit V2.0 Ready Reaction* (ABI PRISM/PE Biosystems) e, constituíram-se:

40-80ng de DNA

3 µl do *mix BigDye*

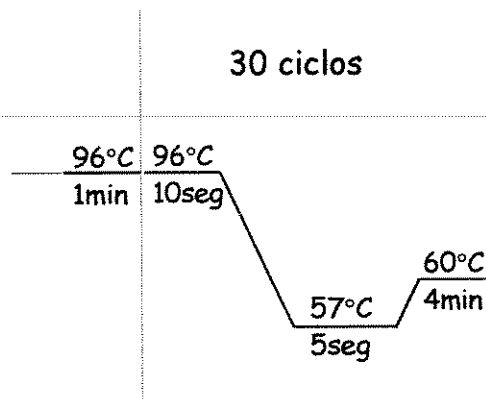
1µl do *primer* direto ou reverso (5mM/µl)

H<sub>2</sub>O deionizada para completar 10 µl.



As condições de amplificação utilizadas estão esquematizadas abaixo na figura

7.



**Figura 7** - Ciclo utilizados na reação de seqüenciamento automático.

As amostras foram precipitadas com isopropanol 75 % e mantidas a  $-20^{\circ}\text{C}$  até o momento do seqüenciamento. Antes da corrida o *pellet* é eluído em  $3\mu\text{l}$  de tampão formamida/Blue Dextran (5:1). A composição do gel de seqüenciamento encontra-se descrita abaixo, e posteriormente foi filtrado em filtro  $0,22\mu\text{m}$  (Millipore).

**Gel de acrilamida 4,5%:**

360g de uréia

10g de resina (Dowex MR-3 [I-9005])

100ml de solução de acrilamida (19:1)

100ml de TBE.10X

H<sub>2</sub>O para completar 1 litro.

**Análise das seqüências obtidas**

As seqüências obtidas foram analisadas e comparadas com a seqüência normal com o auxílio do programa Generuner.

## 2.7- ANÁLISE DE RESTRIÇÃO

A seguir são descritas análises de restrição para três mutações localizadas no gene **GJB2** e uma mutação no gene **GJB3** com as enzimas específicas para cada alteração, como mostra a tabela VII. Os produtos das digestões foram submetidos à eletroforese em gel de agarose na concentração de 1,5% em tampão TBE 1X. Posteriormente os géis foram corados com brometo de etídio e os fragmentos da digestão foram visualizados em luz ultravioleta e fotografados.

**Tabela 7** – Resumo das análises de restrição nos genes GJB2 e GJB3.

REAÇÃO DIGESTÃO	GENE ANALISADO	PRODUTO DE PCR	ENZIMA	GENÓTIPO NORMAL (TAMANHOS PB)	GENÓTIPO MUTADO (TAMANHOS PB)	MUTAÇÃO IDENTIFICADA
1	<b>GJB2</b>	Cx2 (522pb)	<i>Mnl</i> I	3 fragmentos (345, 46 e 131)	2 fragmentos (391, 131)	delE120
2	<b>GJB2</b>	Cx2 (522pb)	<i>PmaC</i> I	2 fragmentos (410, 112)	1 fragmento (522)	V95M
3	<b>GJB2</b>	Cx26-14 (383pb)	<i>Bgl</i> II	2 fragmentos (240, 143)	1 fragmento (383)	-493del10
4	<b>GJB3</b>	1 (210pb)	<i>Hpa</i> II	2 fragmentos (117, 93)	1 fragmento (210)	R32W

### 2.7.1- DETECÇÃO DA MUTAÇÃO DELE120

A presença da mutação **delE120** abole um sítio de restrição da enzima *Mnl* I, no fragmento Cx2 do gene **GJB2**, o qual é cortado em três fragmentos na ausência da mutação. A reação foi incubada a 37°C por 2 horas e é composta por:

10µl do produto de PCR

1µl BSA1%

1µl tampão

1µl enzima *Mnl* I

7µl H<sub>2</sub>O

### 2.7.2- DETECÇÃO DA MUTAÇÃO V95M

A mutação **V95M** pode ser analisada usando a enzima de restrição *PmaC I*, a qual apresenta um sítio de restrição no fragmento Cx2 normal do gene **GJB2**, portanto contando-o em dois outros fragmentos. A reação de digestão foi incubada por 3 horas a 37°C contendo:

18µl do produto de PCR

1µl tampão

1µl enzima *PmaC I*

### 2.7.3- DETECÇÃO DA DELEÇÃO -493DEL10

Esta análise foi feita usando a enzima de restrição *Bgl II*, a qual corta o fragmento Cx26 -14 do gene **GJB2** de 383pb em dois fragmentos de 143pb e 240pb, em indivíduos que não são portadores da deleção. A reação foi incubada a 37°C durante a noite.

10 µl do produto de PCR

7 µl H<sub>2</sub>O

2 µl tampão REACT 3

1 µl enzima *Bgl II*

### 2.7.4- DETECÇÃO DA MUTAÇÃO R32W

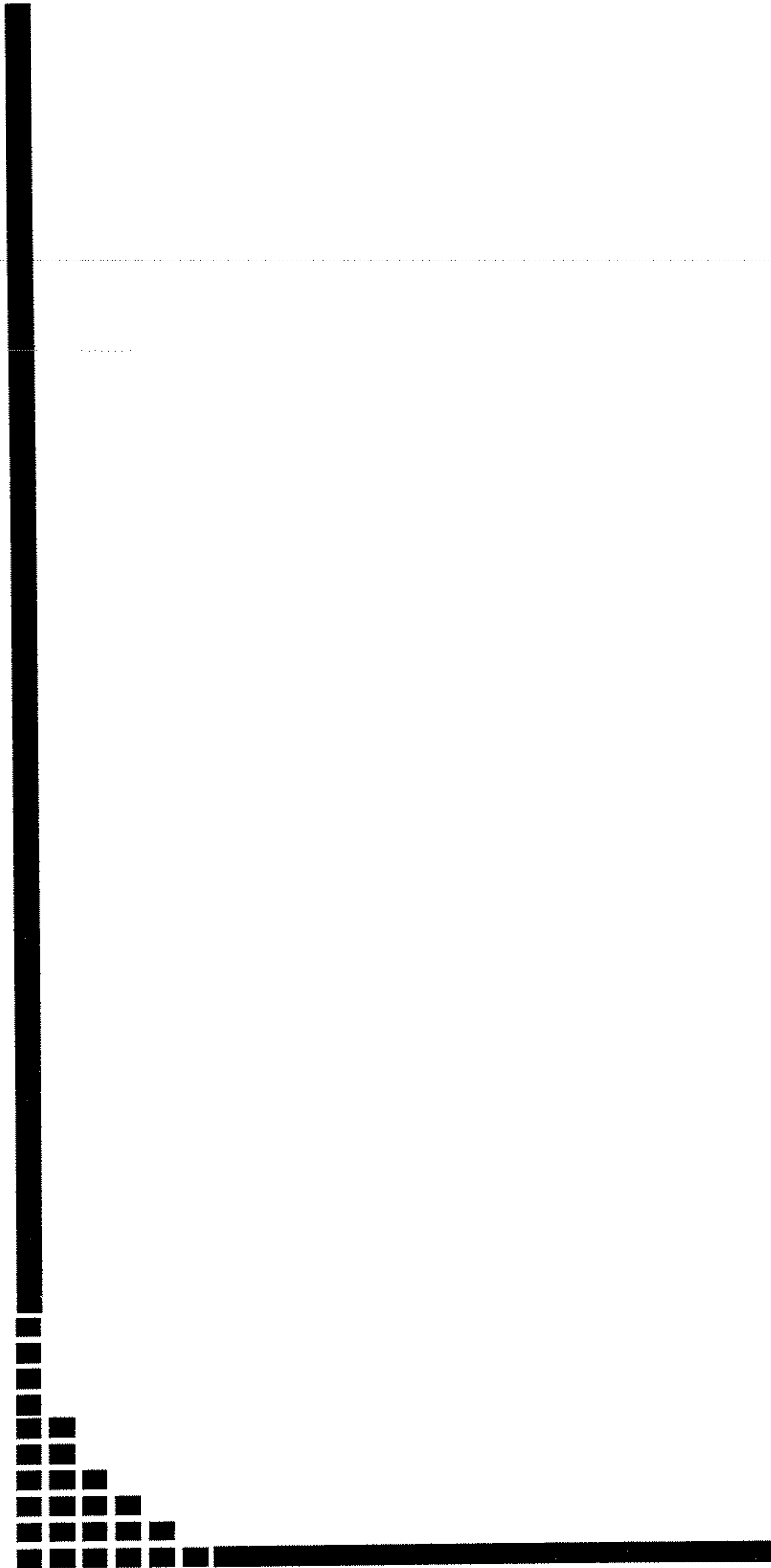
A análise da mutação **R32W** foi realizada em todos indivíduos da família 14 usando a enzima *Hpa II*, que digere um fragmento normal de 210pb do gene **GJB3** em dois fragmentos de 117pb e 93pb. A reação descrita abaixo foi incubada por 2 horas a 37°C.

10 µl do produto de PCR

7 µl H<sub>2</sub>O

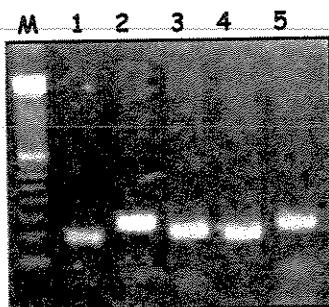
2 µl tampão REACT 8

1 µl enzima *Hpa II*



***RESULTADOS***

A amplificação do gene **GJB3** foi realizada por intermédio da técnica da PCR (reação em cadeia da polimerase), usando cinco pares de *primers* descritos por XIA *et al.* (1998). A figura 8 mostra os produtos de amplificação de todos os fragmentos em eletroforese em gel de agarose 1% mostrando o tamanho de cada fragmento conforme tabela V.



**Figura 8** – Produtos de amplificação do gene **GJB3** em eletroforese de gel de agarose. M- marcador de peso molecular de 100pb (Gibco BRL); 1- fragmento 1 com 210pb; 2- fragmento 2 com 270pb; 3- fragmento 3 com 223pb; 4- fragmento 4 com 202pb; 5- fragmento 5 com 255pb.

Toda a região codificante do gene **GJB3** (conexina 31) foi seqüenciada em 50 famílias (56 indivíduos) provenientes do CEPRE, os quais apresentam diagnóstico genético-clínico prévio e foram encaminhados por apresentarem deficiência auditiva de origem não esclarecida. Esses indivíduos foram previamente analisados quanto à presença de mutações no gene **GJB2**. A casuística foi dividida em GRUPO A, quando nenhuma alteração era observada no gene **GJB2** e GRUPO B, quando foi observada alteração em um único alelo desse gene. As mutações e polimorfismos observados estão relacionados nas tabelas VIII e IX, GRUPOS A e B, respectivamente.

**Tabela 8**– Alterações observadas nos genes **GJB2** e **GJB3** em indivíduos do GRUPO A.

FAMÍLIAS	PACIENTES	GJB2		GJB3	
		Alelo 1	Alelo 2	Alelo 1	Alelo 2
3	3*	N	N	N266	N
10	10*	N	N	Y177D	N
	Pai	N	N	N	N
	Mãe	N	N	Y177D	N
12	12*	N	N	N266	N266
	Pai	N	N	N266	N
	Mãe	N	N	N266	N
54	*54	N	N	Y177D	N

N – nenhuma alteração observada; \* casos índices.

**Tabela 9**– Alterações observadas nos genes **GJB2** e **GJB3** em indivíduos do GRUPO B.

FAMÍLIAS	PACIENTES	GJB2		GJB3	
		Alelo 1	Alelo 2	Alelo 1	Alelo 2
17	17*	V27I	N	N	N
31	31*	35delG	N	N	N
32	32*	35delG	N	N	N
33	33*	V27I	N	N	N
39	39*	35delG	N	G193	N
40	40*	35delG	N	N	N
44	44*	V37I	N	N	N
53	53*	W172X	N	N	N
	Pai	W172X	W172X		
	Mãe	N	N		
55	55*	35delG	N	N119	N

N – nenhuma alteração observada; \* casos índices.

Além disso, também foram analisados 17 famílias, com surdez neurosensorial não sindrômica provenientes de diversas clínicas do país. Esses indivíduos não apresentam diagnóstico genético clínico prévio. O gene **GJB2** foi analisado inicialmente e as mutações encontradas em ambos os genes são mostradas na tabela X.

**Tabela 10** – Alterações observadas nos genes **GJB2** e **GJB3** em indivíduos do GRUPO C.

FAMÍLIAS	PACIENTES	GJB2		GJB3	
		Alelo 1	Alelo 2	Alelo 1	Alelo 2
03	3*	N	N	49delK	N
04	4*	V27I/ K105R	N	N119	N
	Pai	N	N		
	Mãe	V27I/ K105R	N		
	Irmão	V27I/ K105R	N		
05	5*	M34T	V95M	N	N
	Pai	V95M	N		
	Mãe	M34T	N		
	Irmão	M34T	V95M		
	Irmã	M34T	V95M		
	Esposa	N	N		
08	8*	35delG	35delG	N	N
	Pai	35delG	N		
	Mãe	35delG	N		
09	9*	35delG	N	N	N
10	10*	delE120	N	N	N
	Pai	delE120	N		
	Mãe	N	N		
	Filho	N	N		
	Filha	N	N		
	Esposa	N	N		
	Irmã 1 (I1)	delE120	N		
	Irmã 2 (I2)	N	N		
	Filho 1 (I1)	delE120	N		
	Filho 2 (I1)	delE120	N		
	Esposo (I1)	N	N		
14	14*	N	N	R32W	N
	Pai			R32W	N
	Mãe			N	N
	Irmão			N	N
	Irmã 1			R32W	N
	Irmã 2			N	N
17	17*	N	N	P159	N

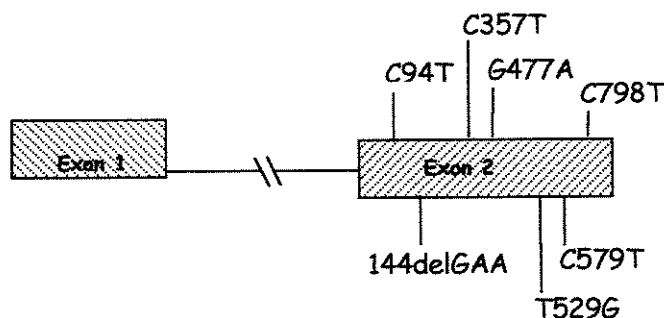
N – nenhuma alteração encontrada; \* casos índices.

A análise do gene **GJB3** (conexina 31) foi realizada completamente em 67 famílias divididas em três diferentes grupos (A, B e C). A tabela IX apresenta um resumo de todas essas alterações no gene **GJB3** encontradas na casuística desse trabalho.

**Tabela 11 – Alterações encontradas no gene GJB3.**

MUTAÇÃO	NUCLEOTÍDEO	AMINOÁCIDO	MÉTODO DE DETECÇÃO
<b>Y177D</b>	T <sup>529</sup> →G	Tyr <sup>177</sup> →Asp	Seqüenciamento
<b>49delK</b>	delGAA <sup>144</sup>	Lys <sup>49</sup>	Seqüenciamento
<b>R32W</b>	C <sup>94</sup> →T	Arg <sup>32</sup> →Trp	Seqüenciamento – Digestão
<b>N119</b>	C <sup>357</sup> →T	Asn <sup>119</sup> →Asn	Seqüenciamento
<b>N266</b>	C <sup>798</sup> →T	Asn <sup>266</sup> →Asn	Seqüenciamento
<b>P159</b>	G <sup>477</sup> →A	Pro <sup>159</sup> →Pro	Seqüenciamento
<b>G193</b>	C <sup>579</sup> →T	Gly <sup>193</sup> →Gly	Seqüenciamento

A figura 9 esquematiza e localiza as mutações e polimorfismos presentes no gene GJB3 que foram relacionados na tabela acima.



**Figura 9 – Localização das mutações encontradas no gene GJB3.**

## 1-ALTERAÇÕES ENCONTRADAS NO GENE GJB3 NOS INDIVÍDUOS DO GRUPO A.

### 1.1- FAMÍLIAS 3 E 12

Os pacientes 3 e 12, pertencentes às famílias 3 e 12, respectivamente, não apresentaram nenhuma alteração no gene GJB2 e, no gene GJB3, observou-se a mutação silenciosa N266. Trata-se de um polimorfismo neutro muito freqüente na população (MHATRE, *et al.*, 2003), resultante de uma transição C/T, na posição 798 (C<sup>798</sup>→T), a qual não muda o aminoácido asparagina nessa posição.



O **paciente 3** é heterozigoto para a alteração N266, como mostra a figura 10. Por outro lado, o **paciente 12** apresenta esta a alteração N266 em homozigose. Os pais do **paciente 12** também foram analisados, ambos são heterozigotos para a mesma alteração, e não apresentou perda auditiva.

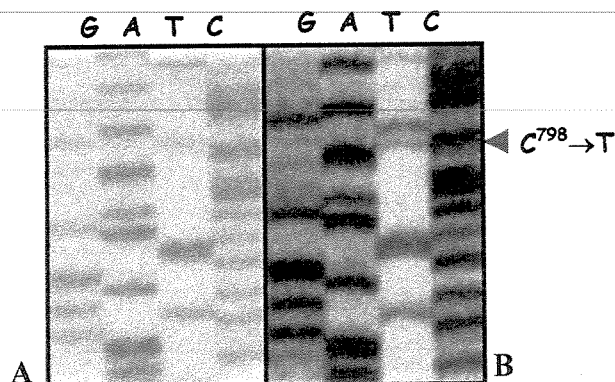
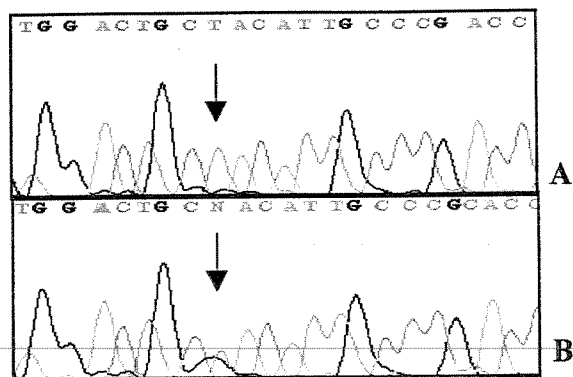


Figura 10- Gel de seqüenciamento mostrando parte da seqüência do gene GJB3: A – seqüência normal; B – paciente 3 heterozigoto para a mutação N266 (C<sup>798</sup> → T).

## 1.2- FAMÍLIAS 10 E 54

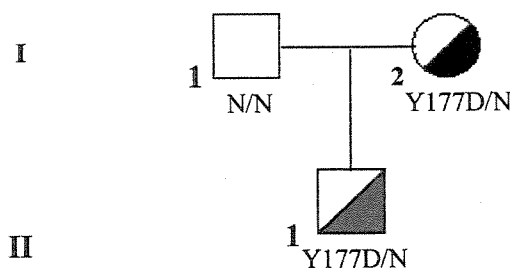
Os pacientes 10 e 54, pertencentes às famílias 10 e 54, não apresentam nenhuma alteração no gene GJB2, no entanto, no seqüenciamento direto do gene GJB3, observou-se a presença da mutação Y177D.

Esta alteração caracteriza-se por apresentar uma transição de T/G, (T<sup>529</sup> → G), em heterozigose no códon 177 (figura 11), que leva à substituição do aminoácido tirosina para ácido aspártico (Y177D), localizado no segundo *loop* extracelular da proteína.






**Figura 11** – Eletroferograma mostrando parte da seqüência do gene **GJB3**: **A** – seqüência normal; **B** – paciente heterozigoto para a mutação **Y177D** (T<sup>529</sup>→G).

No heredograma da figura 12, o paciente 10 (II-1), que possui a alteração **Y177D**, apresenta deficiência auditiva neurossensorial profunda pré-lingual. Os pais deste paciente foram estudados e a mesma alteração também foi encontrada na mãe (I-2) do propósito, a qual relatou não apresentar perda auditiva.



**Figura 12** - Heredograma da família 10.

-  Indivíduo do sexo feminino sem D.A e com mutação no gene **GJB3** em apenas um alelo.
-  Indivíduo do sexo masculino com D.A e com mutação no gene **GJB3** em apenas um alelo.
-  Indivíduo do sexo masculino sem D.A e sem mutação no gene **GJB3**.

O paciente 54, representado no heredograma da figura 13 (II-1), apresenta perda auditiva pré-lingual profunda e a alteração **Y177D** se encontra em heterozigose. Provavelmente, esta alteração foi herdada da mãe (I-2) do propósito, da qual não temos nenhuma informação a respeito da capacidade auditiva atual. Os pais são consangüíneos e possuem mais três filhos, dos quais apenas um (II-4) com perda auditiva, no entanto, sem alteração no gene **GJB3**.

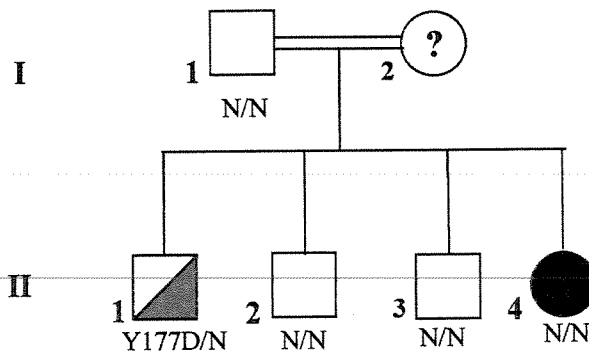


Figura 13 - Heredograma da família 54.

- Indivíduo do sexo feminino com D.A e sem mutação no gene **GJB3**.
- ▧ Indivíduo do sexo masculino com D.A e com mutação no gene **GJB3** em apenas um alelo.
- Indivíduo do sexo masculino sem D.A e sem mutação no gene **GJB3**.
- ⊙ Indivíduo do sexo feminino não submetido a exame molecular e sem diagnóstico.

Para verificar se a alteração **Y177D** é um polimorfismo freqüente na população foram analisados 100 indivíduos controles com audição normal. Esta análise foi realizada usando a técnica de SSCP. Não foi observada alteração no padrão de migração nos indivíduos controles ouvintes, quando comparado com indivíduos com a mutação **Y177D**.

## 2.-ALTERAÇÕES ENCONTRADAS NO GENE **GJB3** NOS INDIVÍDUOS DO GRUPO B

### 2.1- FAMÍLIA 39

O paciente 39, pertencente à família 39, apresentou no seqüenciamento do gene **GJB3** a transição C/T, na posição 579 ( $C^{579} \rightarrow T$ ), em heterozigose, a qual não leva a alteração do aminoácido glicina (figura 14).

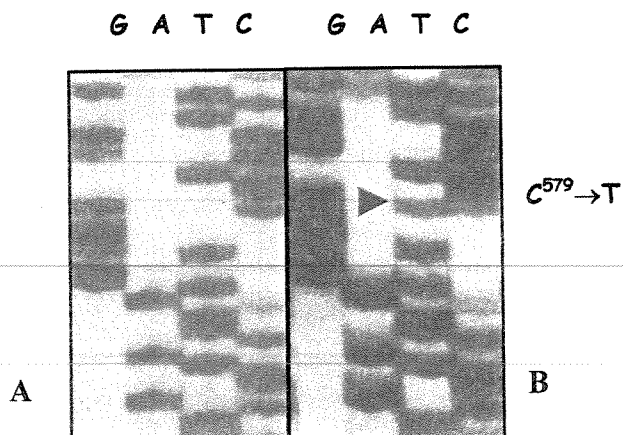


Figura 14 - Gel de seqüenciamento mostrando parte da seqüência do gene GJB3: A - seqüência normal; B - paciente heterozigoto para a mutação G193 ( $C^{579} \rightarrow T$ ).

## 2.2- FAMÍLIA 55

O paciente 55, pertencente à família 55, é heterozigoto para o polimorfismo N119 no gene GJB3. Trata-se de uma transição C/T, na posição 357 ( $C^{357} \rightarrow T$ ), como mostra a figura 15.

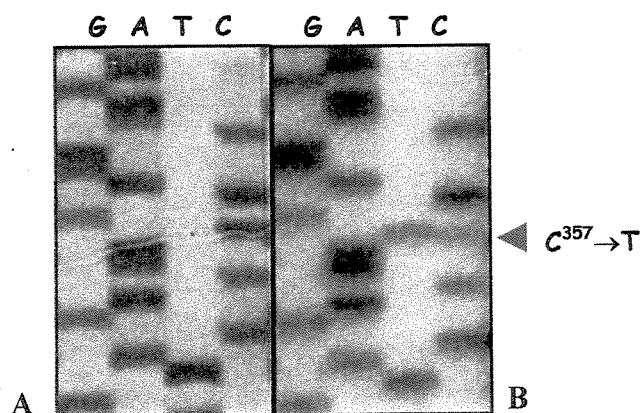


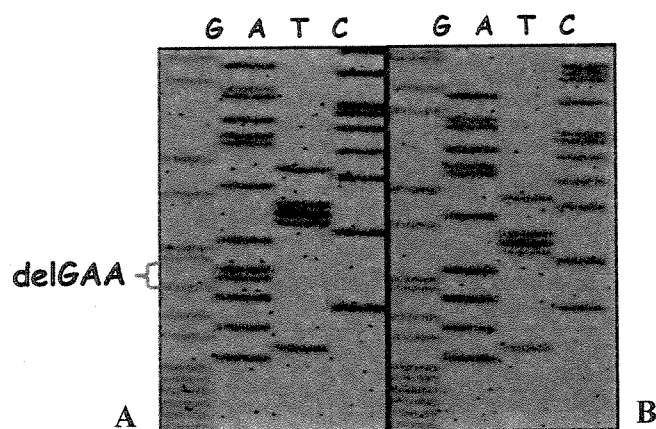
Figura 15 - Gel de seqüenciamento mostrando parte da seqüência do gene GJB3: A - seqüência normal; B - paciente heterozigoto para a alteração N119 ( $C^{357} \rightarrow T$ ).

### 3- ALTERAÇÕES ENCONTRADAS NOS INDIVÍDUOS DO GRUPO C

#### 3.1- ALTERAÇÕES NO GENE GJB3

##### 3.1.1- FAMÍLIA 3

Na família 3, o paciente 3 apresenta surdez neurossensorial moderada com início tardio. A análise do gene **GJB3** mostrou a mutação **49delK** em heterozigose; esta mutação é responsável pela deleção do códon 49 (GAA), que transcreve o aminoácido lisina. A detecção desta mutação foi feita inicialmente por seqüenciamento direto do gene, porém com a deleção em heterozigose não foi possível a interpretação dos resultados, sendo necessário o seqüenciamento passando pela etapa de clonagem para confirmação da presença da deleção (figura 16).



**Figura 16** - Gel de seqüenciamento mostrando parte da seqüência do gene **GJB3**: A – paciente heterozigoto para a mutação 49delK; B – seqüência normal.

##### 3.1.2- FAMÍLIA 14

Na família 14 diversos indivíduos apresentam perda auditiva moderada. O caso índice (paciente 14), apresenta a mutação **R32W**, localizada numa seqüência altamente conservada no primeiro domínio transmembrânico do gene **GJB3**, a qual resulta da substituição do aminoácido arginina (CGG) para o triptofano (TGG) no códon 32 do gene **GJB3**, como mostra a figura 17.

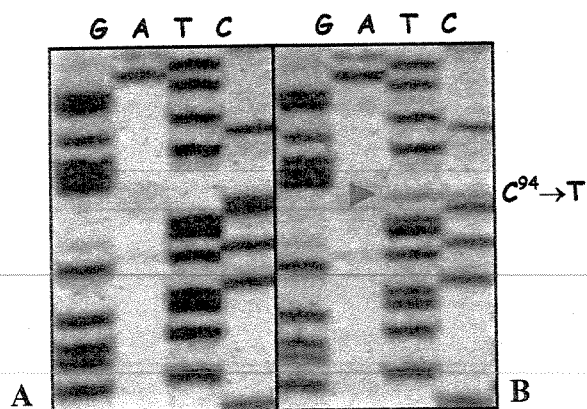


Figura 17 - Gel de seqüenciamento mostrando parte da seqüência do gene GJB3: A - seqüência normal; B - paciente heterozigoto para a mutação R32W ( $C^{94} \rightarrow T$ ).

Posteriormente todos os membros da família foram analisados por análise de restrição por meio de digestão com a enzima *Hpa* II, a qual corta o fragmento normal de 210pb do gene GJB3 em dois fragmentos representados na figura 18. A figura 19 mostra a fotografia de um gel de agarose com a amostra do paciente 14 e um controle negativo para a mutação.

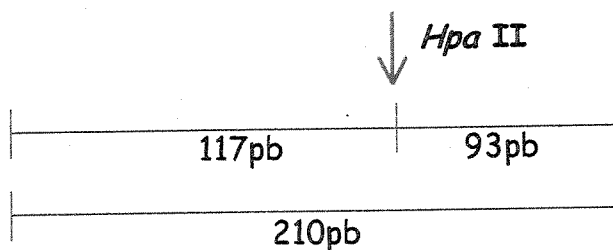


Figura 18 - Representação esquemática da análise de restrição da mutação R32W no gene GJB3.

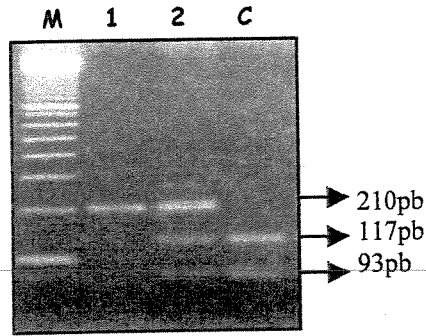


Figura 19 - Análise de restrição para a mutação R32W com a enzima *Hpa* II no gene GJB3: M- marcador de peso molecular de 100pb-Gibco BRL; 1- produto de PCR não digerido; 2- probando; C- controle negativo.

O paciente 14 (II-10) e seu pai (I-1) são heterozigotos para a mutação R32W com perda auditiva neurossensorial moderada de origem tardia, sem nenhuma alteração na pele. Outros membros da família foram analisados e uma das irmãs do paciente não é portadora da alteração, mas apresenta surdez profunda (II-6). A figura 20 esquematiza o heredograma da família 14 e representa a presença da mutação R32W associada ou não com perda auditiva.

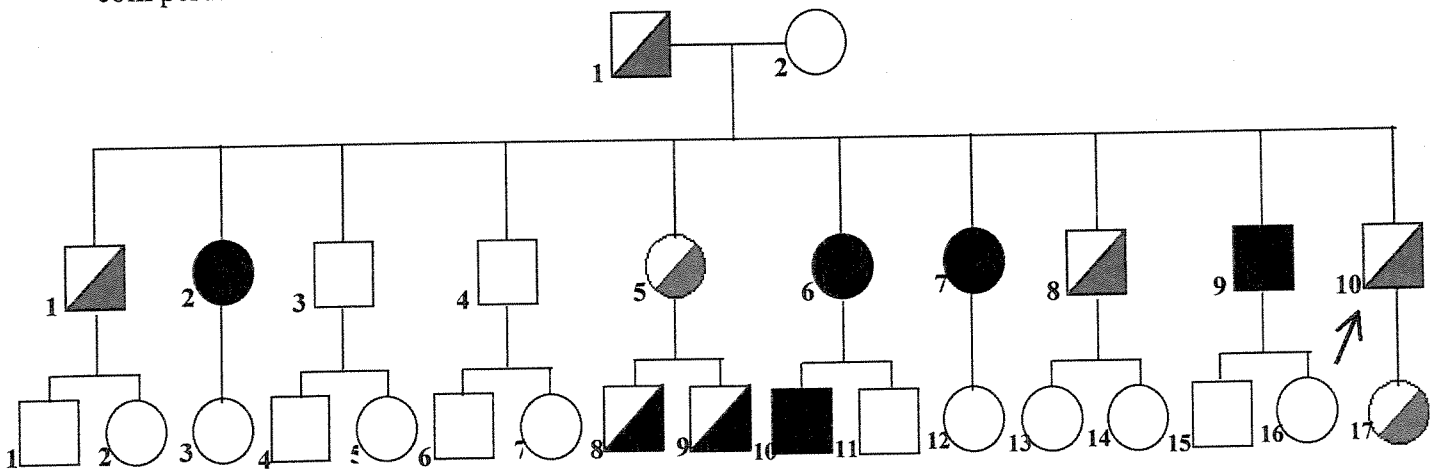









Figura 20 - Heredograma da família 14.

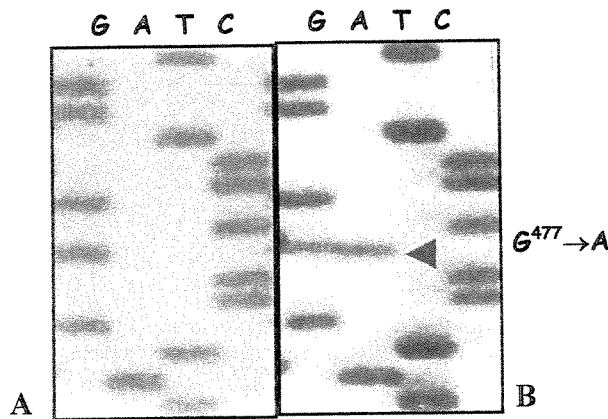
-  Indivíduo do sexo masculino com D.A. e heterozigoto para a mutação **R32W** no gene **GJB3**
-  Indivíduo do sexo feminino com D.A. e heterozigoto para a mutação **R32W** no gene **GJB3**
-  Indivíduo do sexo masculino sem D.A. e heterozigoto para a mutação **R32W** no gene **GJB3**
-  Indivíduo do sexo masculino com D.A. e sem mutação no gene **GJB3**

---

-  Indivíduo do sexo feminino com D.A. e sem mutação no gene **GJB3**
-  Indivíduo do sexo masculino sem D.A. e sem mutação no gene **GJB3**
-  Indivíduo do sexo feminino sem D.A. e sem mutação no gene **GJB3**

### 3.1.3- FAMÍLIA 17

A alteração **P159**, observada na família 17, é responsável pela transição G/A, na posição 477 ( $G^{477} \rightarrow A$ ) do gene **GJB3** (figura 21). Esta alteração foi observada em heterozigose no paciente 17, e não altera o aminoácido prolina.



**Figura 21** - Gel de seqüenciamento mostrando parte da seqüência do gene **GJB3**: A – seqüência normal; B – paciente heterozigoto para a mutação **P159** ( $G^{477} \rightarrow A$ ).



## 3.2- ALTERAÇÕES NO GENE GJB2

### 3.2.1- FAMÍLIA 4

A mutação **K105R**, ainda não descrita na literatura, foi observada em indivíduos da família 4, por meio do seqüenciamento direto do gene **GJB2**. Esta mutação provoca a conversão do aminoácido lisina para arginina no codon 105 (figura22).

O heredograma, mostrado na figura 23, representa todos os indivíduos da família 4 estudados. Todos os indivíduos portadores da mutação **K105R** também apresentam a mutação **V27I** no mesmo alelo do gene **GJB2**, sendo que ambas as alterações foram transmitidas pela mãe do paciente.

A alteração **V27I** é considerada um polimorfismo neutro descrito em muitos trabalhos, e está situado no primeiro domínio transmembrânico da proteína, provocando alteração do aminoácido valina por isoleucina na posição 27 (KELLEY *et al.*, 1998). Estudos populacionais indicaram que a alteração **V27I** não está relacionada com perda auditiva, uma vez que esta é observada na população normal.

A mutação **K105R** não foi detectada em 50 indivíduos controles com audição normal, descartando a hipótese de que se trate de um polimorfismo. Além disso, na análise do gene **GJB3** observou-se a presença do polimorfismo **N119**.

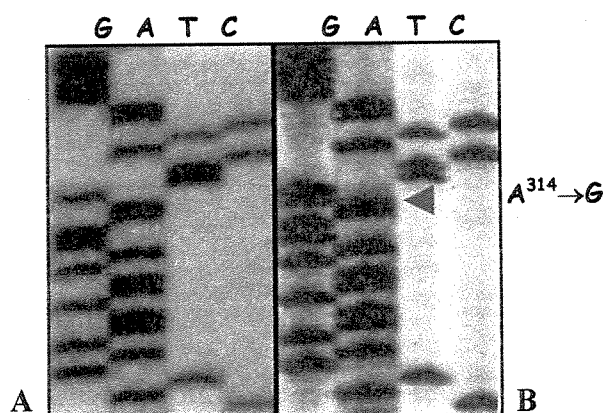


Figura 22 - Gel de seqüenciamento mostrando parte da seqüência do gene **GJB2**: A - seqüência normal; B - paciente heterozigoto para a mutação **K105R** (A<sup>314</sup>→G).

O heredograma representado na figura 23 esquematiza a análise dos indivíduos da família 4. A mutação **K105R** está segregando aparentemente de forma dominante na família materna. A paciente 4 (II-2), apresenta deficiência auditiva moderada e sua mãe (I-2) apresenta uma perda de início tardio. O irmão da paciente (II-1), também é portador da mutação, mas ainda não apresenta deficiência auditiva.

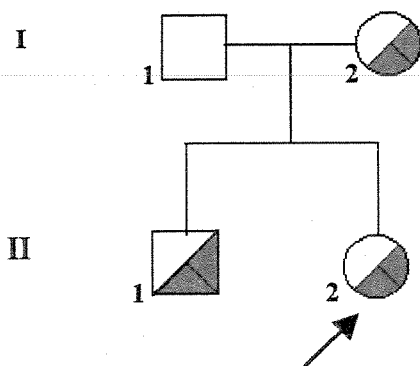



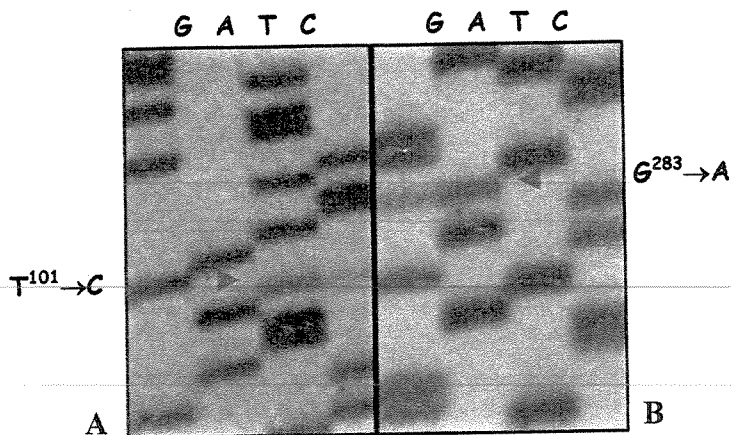


Figura 23 - Heredograma da família 4.

-  Indivíduo do sexo masculino sem D.A. e sem mutação no gene **GJB2**.
-  Indivíduo do sexo masculino com D.A. e com as mutações **V27I** e **K105R** no mesmo alelo do gene **GJB2**.
-  Indivíduo do sexo feminino com D.A. e com as mutações **V27I** e **K105R** no mesmo alelo do gene **GJB2**.

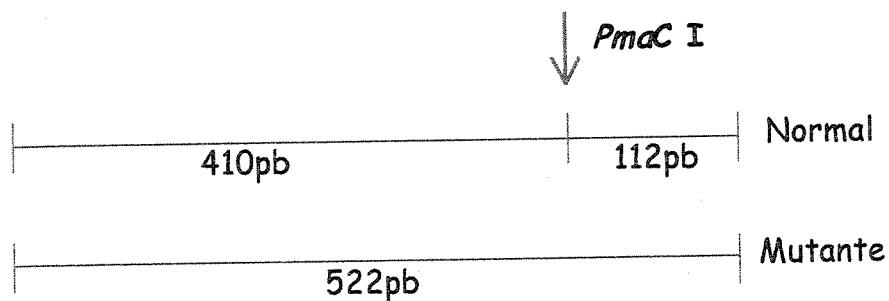
### 3.2.2- FAMÍLIA 5

O paciente 5, pertencente à família 5, é heterozigoto composto para as mutações **M34T/V95M** (figura 24). A mutação **M34T** representa a alteração do aminoácido metionina para treonina e, há controvérsias em relação ao seu padrão de herança. No entanto, sugere-se que **M34T** somente causa perda auditiva quando associada com uma Segunda mutação no gene **GJB2** ou em outro gene associado com surdez. A mutação **V95M** envolve a conversão do aminoácido valina para metionina, porém ainda não foi determinado o seu efeito na proteína.

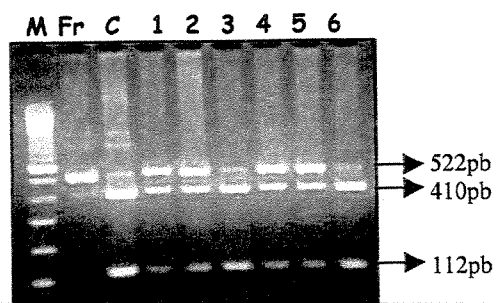


**Figura 24** - Gel de seqüenciamento mostrando partes da seqüência do gene GJB2 de indivíduo heterozigoto composto M34T/V95M: A - seqüência M34T (T<sup>101</sup>→C); B - seqüência V95M (G<sup>283</sup>→A).

A mutação V95M foi analisada em todos os indivíduos da família usando a enzima de restrição *PmaC I*. Esta enzima corta o fragmento Cx2 normal do gene GJB2 com 522pb em dois fragmentos de 410pb e 112pb e, na presença da mutação este sítio é abolido. As figuras 25 e 26 mostram a representação esquemática da análise de restrição e a digestão de todos os membros da família.

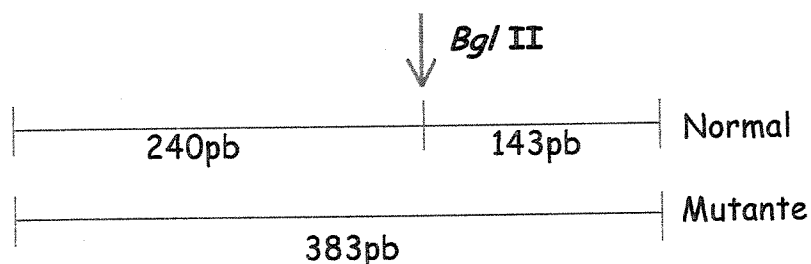


**Figura 25** - Representação esquemática da análise de restrição da mutação V95M no gene GJB2.

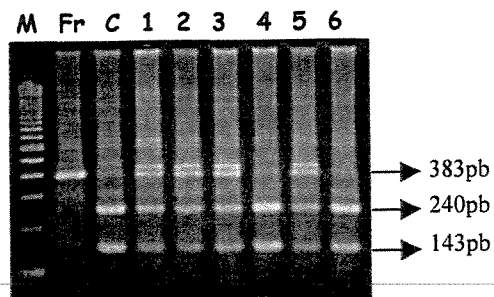


**Figura 26** - Análise de restrição para a mutação V95M com a enzima *PmaCI* no gene GJB2: M- marcador de peso molecular de 100pb-Gibco BRL; Fr- fragmento de PCR sem digerir; C- controle negativo; 1- probando; 2- pai; 3- mãe; 4- irmã; 5- irmão; 6- esposa.

A maioria dos alelos M34T (88%) são associados em *cis* com uma deleção de 10pb na seqüência 5' não codificante (HOUSEMAN *et al.*, 2001). Neste caso, todos os pacientes portadores de M34T, também apresentam a deleção -493del10. Esta análise é feita usando a enzima de restrição *Bgl II*, a qual corta o fragmento Cx26 -14 de 383pb em dois fragmentos de 143pb e 240pb, em indivíduos que não são portadores da deleção (figura 27).

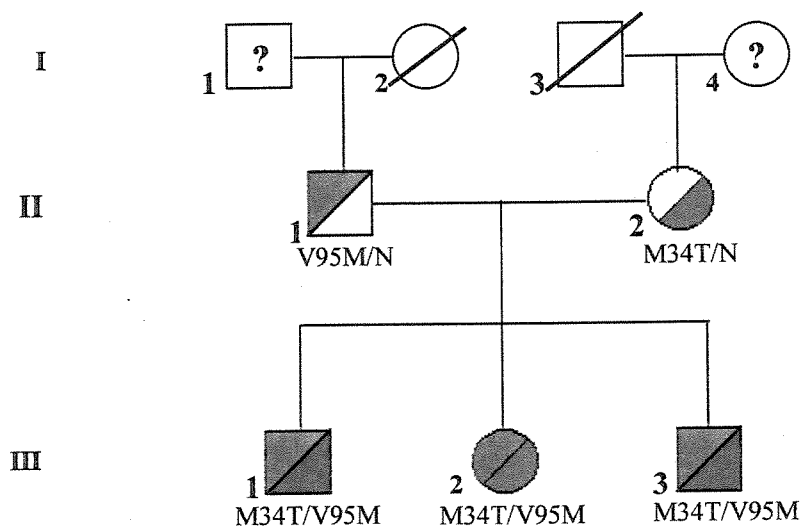


**Figura 27** - Representação esquemática da análise de restrição da mutação -493del10 no gene GJB2.



**Figura 28** - Análise de restrição com a enzima *Bgl* II no gene **GJB2**: M- marcador de peso molecular de 100pb-Gibco BRL; Fr- fragmento sem digerir; C- controle negativo; 1- probando; 2- irmã; 3- irmão; 4- pai; 5- mãe; 6- esposa.

O pai do propósito (II-1) é portador da mutação **V95M** e a mãe (II-2) da mutação **M34T**, e os irmãos são também heterozigotos compostos, porém com diferentes graus de perda auditiva, sendo que o propósito (III-1) apresenta perda auditiva leve e em seus irmãos a perda é moderada (figura 29).

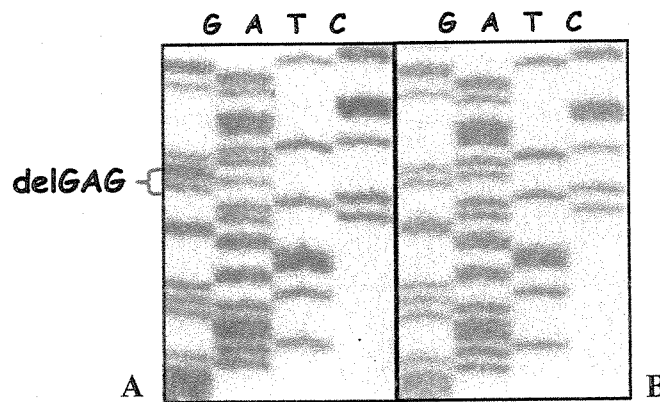


**Figura 29** - Heredograma da família 5

- ? Indivíduo do sexo masculino não submetido a exame molecular
- ? Indivíduo do sexo feminino não submetido a exame molecular
- Indivíduo do sexo masculino heterozigoto para mutação **V95M** no gene **GJB2**
- Indivíduo do sexo feminino heterozigoto para a mutação **M34T** no gene **GJB2**
- Indivíduo do sexo masculino com D.A heterozigoto composto (**V95M/M34T**)
- Indivíduo do sexo feminino com D.A heterozigoto composto (**V95M/M34T**)

### 3.2.3- FAMÍLIA 10

O paciente 10, pertencente a família 10, é heterozigoto para a deleção **delE120**, localizada em uma seqüência repetida (GAG/GAG), responsável pela perda do ácido glutâmico (GAG) no códon 120. A detecção desta mutação foi feita inicialmente por seqüenciamento direto do gene, porém na presença da deleção em heterozigose não é possível a interpretação dos resultados; portanto, foi necessário o seqüenciamento passando pela etapa de clonagem (figura 30).



**Figura 30** - Gel de seqüenciamento mostrando parte da seqüência do gene **GJB2**: A – seqüência normal; B – paciente heterozigoto para a mutação **delE120**.

A presença da deleção foi posteriormente confirmada analisando o propósito e toda sua família por meio da digestão do produto de PCR que contém a região onde está localizada a deleção com a enzima de restrição *Mnl* I, a qual abole um sítio de restrição para os indivíduos mutantes. Portanto, o fragmento Cx2 normal do gene **GJB2** é cortado

em três fragmentos de 345pb, 131pb e 46pb, e o fragmento mutante é cortado em dois fragmentos de 391pb e 131pb, como esquematizado na figura 31 e visualizado na figura 32.

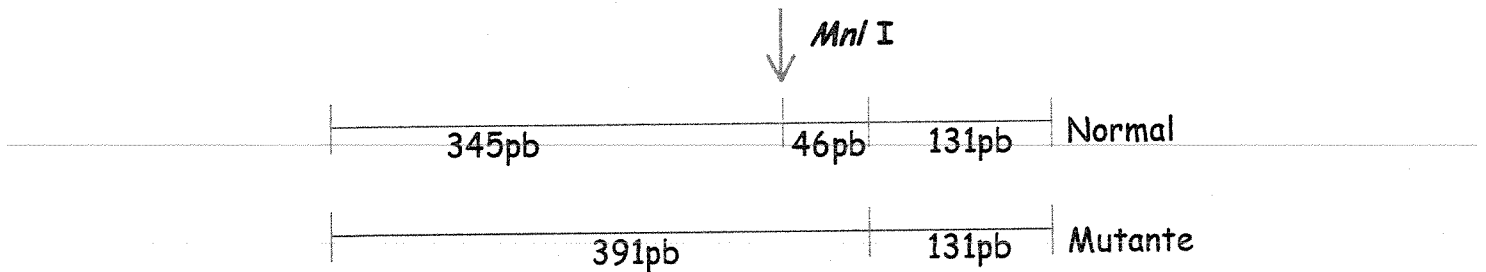


Figura 31 – Representação esquemática da análise de restrição da mutação *delE120* no gene *GJB2*.

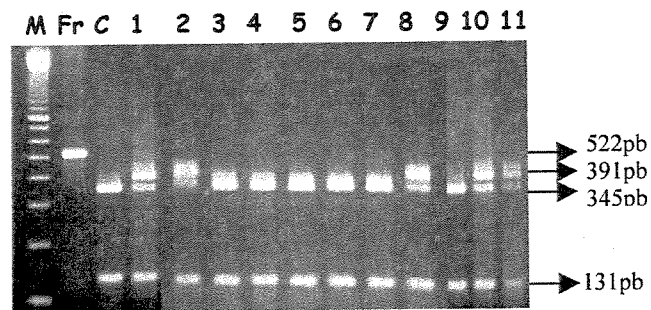


Figura 32 - Análise de restrição com a enzima *Mnl I* no gene *GJB2*: M – marcador de peso molecular de 100pb-Gibco BRL; Fr fragmento sem digerir; C- controle negativo; 1- probando; 2- pai; 3- mãe; 4- filho; 5- filha; 6- esposa; 7- irmã I; 8- irmã II; 9- marido da irmã II; 10 e 11- filhos da irmã II.

O paciente 10 e seu pai são heterozigotos para a mutação *delE120* no gene *GJB2* e apresentam perda auditiva leve, porém a irmã, onde também foi detectada a mutação não apresenta deficiência auditiva. Ambas as filhas dessa irmã heterozigota são portadoras da mutação *delE120*. Em relação ao gene *GJB3* nenhuma alteração foi encontrada (figura 33).

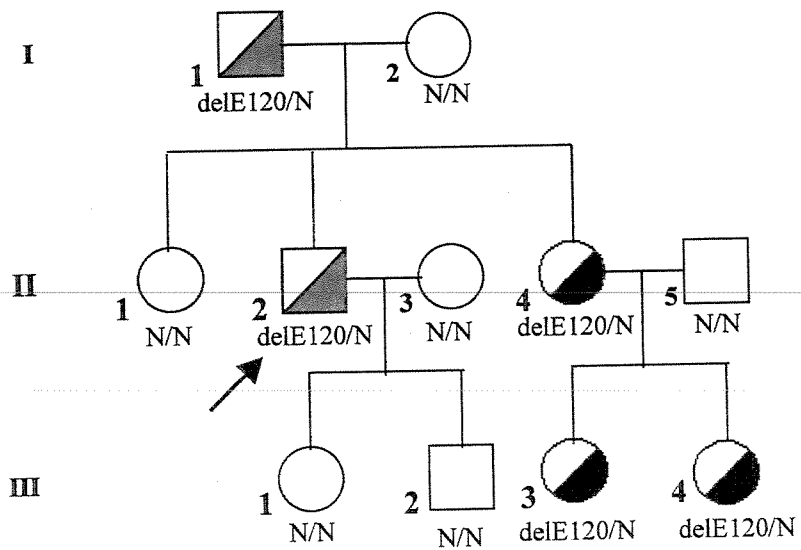




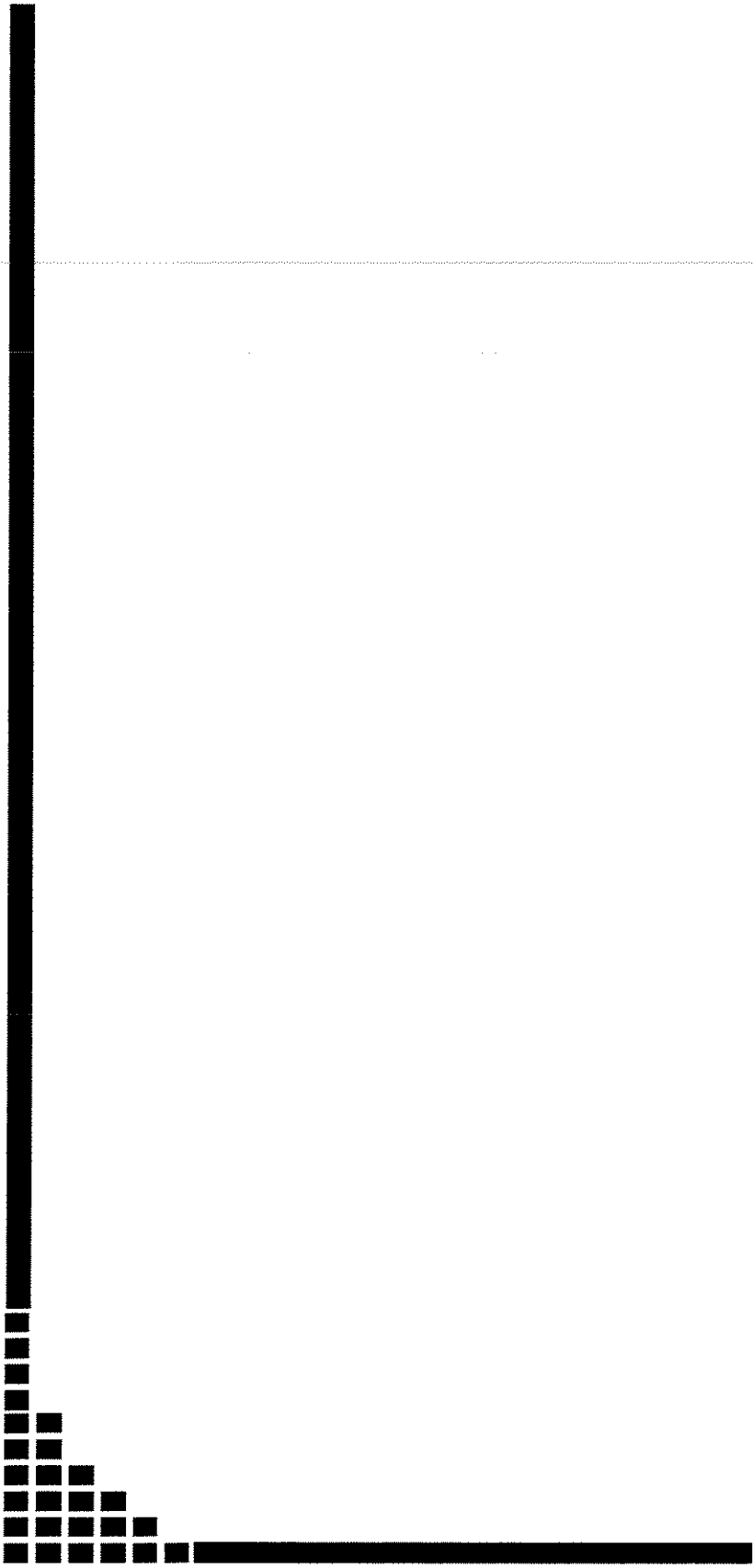


Figura 33 - Heredograma da família 10.

-  Indivíduo do sexo masculino sem D.A e com mutação no gene **GJB2** em apenas um alelo
-  Indivíduo do sexo feminino sem D.A e com mutação no gene **GJB2** em apenas um alelo
-  Indivíduo do sexo masculino sem D.A e sem mutação no gene **GJB2**
-  Indivíduo do sexo feminino sem D.A e sem mutação no gene **GJB2**





*DISCUSSÃO*

Foram encontradas duas novas mutações no gene **GJB3** não descritas na literatura, sendo uma mutação de ponto e uma deleção envolvendo a perda de três pares de bases da proteína conexina 31. A mutação **R32W** foi observada em uma família. Os efeitos dessa mutação têm sido assunto de controvérsia devido à sua expressividade variável. Foram também encontradas quatro substituições de um único nucleotídeo, os quais não alteram os aminoácidos da seqüência da proteína, sendo duas dessas alterações frequentes na população (**N119** e **N266**). A tabela XII resume as alterações encontradas nos indivíduos estudados com deficiência auditiva de origem não esclarecida.

**Tabela 12**– Alterações encontradas no gene **GJB3**.

PACIENTES	GRUPOS	ALTERAÇÕES
3	A	<b>N266</b> (C <sup>798</sup> →T)
10	A	<b>Y177D</b> (T <sup>529</sup> →G)
12	A	<b>N266</b> (C <sup>798</sup> →T)
54	A	<b>Y177D</b> (T <sup>529</sup> →G)
39	B	<b>G193</b> (C <sup>579</sup> →T)
55	B	<b>N119</b> (C <sup>357</sup> →T)
3	C	<b>49delK</b> (delGAA <sup>144</sup> )
4	C	<b>N119</b> (C <sup>357</sup> →T)
14	C	<b>R32W</b> (C <sup>94</sup> →T)
17	C	<b>P159</b> (G <sup>477</sup> →A)

As 17 famílias, pertencentes ao GRUPO C, não apresentavam análise molecular prévia de nenhum gene envolvido com deficiência auditiva. Portanto, o gene **GJB2** foi analisado inicialmente e algumas alterações foram encontradas. A tabela XIII resume as alterações encontradas no gene **GJB2** nos indivíduos pertencentes ao GRUPO C deste estudo.

**Tabela 13** – Alterações encontradas no gene **GJB2** nos indivíduos do GRUPO C.

PACIENTES	GRUPOS	ALTERAÇÕES
4	C	V27I (G <sup>79</sup> →A)
4	C	K105R (A <sup>314</sup> →G)
5	C	M34T (T <sup>101</sup> →C)
5	C	V95M (G <sup>283</sup> →A)
10	C	120delE (delGAA)

## 1- ALTERAÇÕES ENCONTRADAS NO GENE GJB3 NOS INDIVÍDUOS DO GRUPO A.

### 1.1- FAMÍLIAS 3 E 12

O paciente 3 possui deficiência auditiva neurossensorial moderada pós-lingual e, o paciente 12 perda auditiva é neurossensorial profunda pré-lingual. Os pais do paciente 12 também foram analisados, ambos são heterozigotos para a mesma alteração, mas não possuem perda auditiva. É importante ressaltar que a mutação foi descrita como um polimorfismo freqüente na população e não está associada com o fenótipo da perda auditiva.

### 1.2- FAMÍLIAS 10 E 54

O paciente 10 é heterozigoto para a mutação Y177D e apresenta surdez profunda. No entanto, sua mãe também possui mesma alteração e não tem perda da sua capacidade auditiva, descartando a possibilidade desta alteração apresentar um padrão de herança autossômica dominante. Da mesma maneira, em relação à família 54, relatou-se um grau de perda auditiva profunda no paciente 54, também heterozigoto para a mutação. Uma das irmãs do paciente apresenta perda auditiva, porém nenhuma alteração foi encontrada no gene **GJB3**. Além disso, como na família 10 há consangüinidade, não se pode descartar a parental possibilidade desta mutação estar associada com outra alteração em outro gene não detectada nesse estudo.

Para verificar se a alteração **Y177D** trata-se de um polimorfismo freqüente na população foram analisados 100 indivíduos controles com audição normal. Não foi observada a presença da alteração **Y177D** nos indivíduos controles ouvintes.

## **2.-ALTERAÇÕES ENCONTRADAS NO GENE GJB3 NOS INDIVÍDUOS DO GRUPO B**

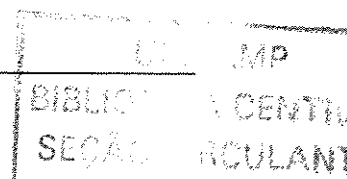
### **2.1- FAMÍLIA 39**

O paciente 39 foi encaminhado por apresentar deficiência auditiva não-sindrômica de origem não definida. O paciente é portador da mutação **35delG** no gene **GJB2** em heretozigose e, no gene **GJB3** apresenta o polimorfismo **G193**. Este polimorfismo foi observado em outro paciente e também em um indivíduo controle com audição normal, portanto não parece ser responsável pela surdez do paciente 39. Como a mutação **35delG** no gene **GJB2** apresenta padrão de herança autossômico recessivo, pode-se supor que esta mutação está associada com outra alteração em outro gene envolvido com a perda auditiva não sindrômica.

### **2.2- FAMÍLIA 55**

O paciente 55 é heterozigoto para a mutação **35delG** no gene **GJB2** e apresenta o polimorfismo **N119** no gene **GJB3**. Esta alteração já foi descrita anteriormente na literatura como um polimorfismo freqüente na população (RICHARD *et al.*, 1998), localizado no domínio C-terminal da proteína conexina 31.

O paciente foi encaminhado por apresentar perda auditiva e história de outros casos de surdez na família, mas é importante ressaltar que o polimorfismo **N119** não está envolvido com a perda de audição desta família. Da mesma forma que o paciente 39, provavelmente o paciente 55 apresenta uma segunda mutação em outro gene envolvido com surdez neurossensorial não-sindrômica não estudado neste trabalho.



### 3- ALTERAÇÕES ENCONTRADAS NO GENE GJB3 NOS INDIVÍDUOS DO GRUPO C

#### 3.1- FAMÍLIA 3

Foi observada no paciente 3 do GRUPO C da casuística desse trabalho, uma nova mutação caracterizada pela deleção do códon 49 do gene **GJB3**. Os indivíduos da família foram convocados para análise molecular e posterior aconselhamento genético, no entanto não demonstraram interesse. A única informação a respeito desta família é que o propósito apresenta perda auditiva moderada com início tardio. Com isso, não foi possível estabelecer se a alteração é a causa da perda auditiva do paciente. Para a conclusão sobre o efeito dessa mutação serão necessários estudos de outros indivíduos da família ou análise de expressão.

#### 3.2- FAMÍLIA 14

A alteração **R32W** foi identificada inicialmente em uma família com Síndrome de Vohwinkel, que representa uma associação de perda auditiva progressiva com doenças de pele (KELSEL, 2000). Nesta família, foi identificada a alteração **R32W** no gene **GJB3** associada com a mutação **D66H** e **M34T** presentes no gene **GJB2**. A relação genótipo-fenótipo dessa família sugeriu que a mutação **R32W** estava associada com perda auditiva e ceratodermia palmoplantar. No entanto, LOPEZ-BRIGAS (2001), notificou que **R32W** representa um polimorfismo neutro comum, com uma frequência alélica de 7,5% na população espanhola e não segrega com perda auditiva em várias famílias. Apesar disso, acredita-se que a expressividade da mutação **R32W** depende do *background* genético, ou seja, é possível que **R32W** somente cause surdez genética quando associada a uma segunda mutação em outro alelo do gene **GJB3** ou em outro gene associado com perda auditiva (ROUAN *et al.*, 2003)

No caso da família 14, a mutação **R32W** não está segregando com a perda auditiva dos indivíduos, visto que o paciente 14, com perda auditiva moderada e heterozigoto para a mutação **R32W**, tem uma irmã com surdez profunda sem a presença da mutação. Neste paciente e em sua irmã, a análise do gene **GJB2** foi motivada pela pesquisa das mutações **M34T** e **D66H**, não sendo encontrada nenhuma alteração. Portanto, o estudo

funcional e a análise de outras famílias serão necessários para elucidar o papel da mutação **R32W** em doenças de pele e perda auditiva.

### 3.3- FAMÍLIA 17

Esta alteração não foi descrita na literatura, mas provavelmente trata-se de um polimorfismo neutro, pois foram encontrados dois indivíduos controles, com audição normal, com alterações de migração na técnica de SSCP. Após o seqüenciamento desses indivíduos observou-se a presença da alteração **P159** em todos os casos.

## 4-ALTERAÇÕES ENCONTRADAS NO GENE **GJB2** NOS INDIVÍDUOS DO GRUPO C

### 4.1- FAMÍLIA 4

A mutação **K105R** está segregando aparentemente de forma dominante na família materna. O paciente 4 apresenta deficiência auditiva moderada e a perda auditiva na mãe foi de início tardio, por volta de 35 anos de idade; o irmão da paciente também é portador da mutação, mas ainda não apresenta deficiência auditiva.

Nesta família todos os indivíduos portadores da mutação **K105R** também apresentam a mutação **V27I**. Esta alteração é considerada um polimorfismo neutro, descrito em muitos trabalhos, e está situado no primeiro domínio transmembrânico da proteína, provocando alteração do aminoácido valina por isoleucina na posição 27 (KELLEY *et al.*, 1998). Estudos populacionais indicaram que a alteração **V27I** não está relacionada com perda auditiva, uma vez que esta é observada na população normal. A mutação **K105R** não foi detectada em 50 indivíduos controles com audição normal, descartando a hipótese de um polimorfismo. Além disso, na análise do gene **GJB3** observou-se a presença do polimorfismo **N119**.

Com isso, apesar do gene **GJB2** estar envolvido predominantemente com o padrão de herança autossômico recessivo, sugere-se, neste caso, que a mutação **K105R** esteja segregando de forma dominante.

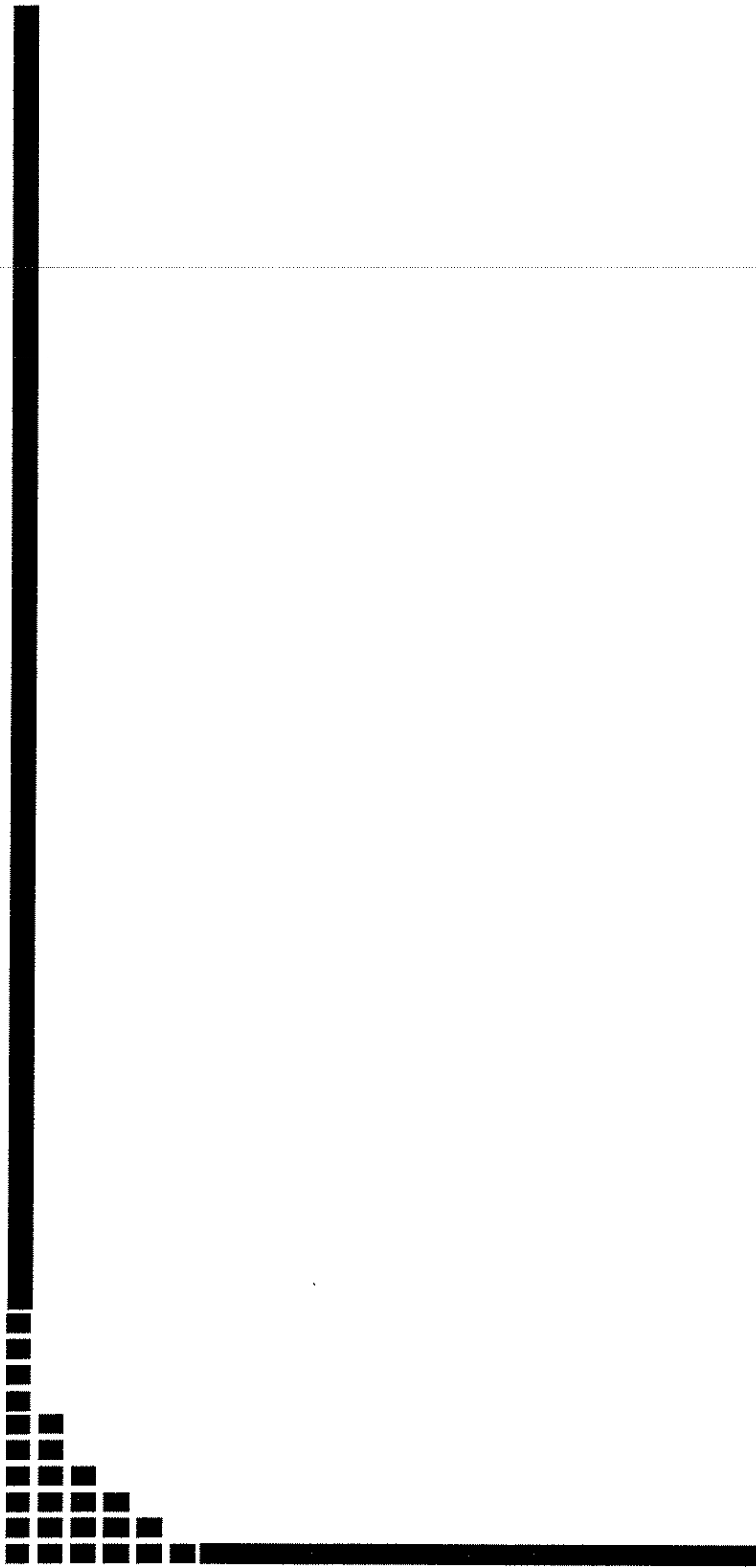
## 4.2- FAMÍLIA 5

A mutação **M34T** foi observada na família 5 associada com a mutação **V95M** no gene **GJB2**. A mutação **M34T** foi descrita inicialmente como uma mutação dominante identificada em uma família com ceratodermia palmoplantar e diferentes formas de surdez (KELSELL *et al.*, 1997). Análises subseqüentes dessa família demonstraram que a associação da mutação **M34T** com perda auditiva profunda somente estava presente quando encontrada em *trans* com a mutação dominante **D66H** (KELSELL *et al.*, 2000). No entanto, a associação da mutação **M34T** em *trans* com os alelos **V95M**, **R184W** e **35delG** em indivíduos com deficiência auditiva neurossensorial sugere um modo de herança autossômico recessivo (KELLEY *et al.*, 1998; WILCOX *et al.*, 2000) e estudos posteriores confirmaram esse relato. Assim, a mutação **M34T** somente causaria perda auditiva quando associada a uma segunda mutação no gene **GJB2** ou em outro gene associado com surdez. A mutação **V95M** envolve a conversão do aminoácido valina para metionina na interface entre o domínio de ligação citoplasmático e o segundo domínio transmembrânico da proteína Cx26 (**GJB2**). O efeito desta mutação na proteína ainda não foi determinado, visto que o aminoácido valina é conservado em todo o grupo de  $\beta$  conexinas; portanto, o aminoácido metionina substitui uma valina invariante em  $\beta$  conexinas.

O paciente 5 e seus dois irmãos são heterozigotos compostos para as mutações **M34T/V95M**, com diferentes graus de perda auditiva. Essa diferença de expressividade, provavelmente está relacionada com o *background* genético de cada indivíduo.

## 4.3- FAMÍLIA 10

A família 10 apresenta alguns indivíduos heterozigotos para a mutação **dele120**. E apesar dessa mutação já ter sido descrita em indivíduos com surdez e padrão de herança autossômico recessivo, segundo os resultados apresentados nessa família pode-se descartar a possibilidade da interação desta mutação com outra alteração em outro gene que não tenha sido detectada nesse estudo. Evidentemente que o *background* genético de cada indivíduo deve ser levado em consideração. Sendo assim, outros genes devem ser avaliados nessa família para que se possa concluir o diagnóstico.



## **CONCLUSÃO**

UNICAMP  
BIBLIOTECA CENTRAL  
FACULDADE DE CIÊNCIAS



A análise molecular de indivíduos com deficiência auditiva é de extrema relevância na população. A natureza genética dos casos esporádicos de surdez muitas vezes não é investigada e as famílias que possuem um único indivíduo com perda auditiva neurossensorial não-sindrômica certamente se beneficiam dessas análises. O uso de testes moleculares em conjunto com os audiológicos ajuda na detecção precoce da surdez, que é importante para os pacientes, em particular nos casos de surdez progressiva, pois a estimulação da linguagem em seu período crítico fará com que as crianças aprendam a se comunicar antes que a surdez se torne mais grave.

É importante ressaltar que a alta frequência de deficiência auditiva neurossensorial está associada com mutações no gene **GJB2**, além da alta prevalência da mutação **35delG**, como descrito em muitos trabalhos.

Em relação ao gene **GJB3**, foram encontradas duas novas alterações. A mutação **Y177D** foi observada em duas famílias. Em ambas as famílias a mutação parece não segregar com o fenótipo da surdez. Apesar dessa alteração não ter sido observada em 50 indivíduos com acuidade normal ela parece não ser a causa da surdez nos pacientes estudados. Mais estudos serão necessários para saber os efeitos dessa mutação no gene **GJB3**. A outra alteração observada, a deleção **49delK**, que também ainda não foi descrita na literatura, não foi possível concluir se realmente ela é a causa da perda auditiva do paciente, sendo necessário o estudo de outros indivíduos da família.

Sendo assim, apesar de várias alterações terem sido encontradas no gene **GJB3**, de acordo com os resultados ora mencionados, alterações nesse gene parecem não ser, isoladamente, frequentes como causa de deficiência auditiva neurossensorial-não-sindrômica. São necessários outros estudos para a avaliação do efeito das novas mutações encontradas.

Finalmente, indivíduos pertencentes à mesma família, com mutações no gene **GJB2**, podem apresentar diferentes graus de perda auditiva. Considerando o gene **GJB3**, essa heterogeneidade clínica também acontece, como visto em alguns casos descritos neste trabalho. Alguns autores, explicam as diferenças clínicas, observadas em pacientes com deficiência auditiva e mutações nos diferentes genes envolvidos, referindo-se ao *background* genético dos indivíduos. Outros apontam para a presença de genes supressores, sendo que alguns já foram inclusive localizados por estudos de ligação.



*REFERÊNCIAS  
BIBLIOGRÁFICAS*

AHMED, Z.M.; SMITH, TN.; RIAZUDDIN, S. *et al.* Nonsyndromic recessive deafness DFNB18 and Usher syndrome type IC are allelic mutations of USH1C. *Hum Genet.* **110(6)**: 527-531, 2002.

AHMED, Z.M.; MORELL, R.J.; RIAZUDDIN, S.; GROPMAN, A.; SHAUKAT, S.; AHMAD, M.M.; MOHIDDIN, S.A.; FANANAPAZIR, L.; CARUSO, R.C.; HUSNAIN, T.; KHAN, S.N.; RIAZUDDIN, S.; GRIFFITH, A.J.; FRIEDMAN, T.B.; WILCOX, E.R. Mutations of MYO6 Are Associated with Recessive Deafness, DFNB37. *Am J Hum Genet.* **72(5)**: 1315-22, 2003.

AVRAHAM, K.B. Motors, channels and sounds of silence. *Nature Medicine.* **6**: 608-609, 1997.

BESPALOVA, I.N.; VAN CAMP, G.; BOM, S.J.; BROWN, D.J.; CRYNS, K.; DEWAN, A.T.; ERSON, A.E.; FLOTHMANN, K.; KUNST, H.P.; KURNOOL, P.; SIVAKUMARAN, T.A.; CREMERS, C.W.; LEAL, S.M.; BURMEISTER, M.; LESPERANCE, M.M. Mutations in the Wolfram syndrome 1 gene (WFS1) are a common cause of low frequency sensorineural hearing loss. *Hum Mol Genet.* **10(22)**: 2501-8, 2001.

BORK, J.M.; PETERS, L.M.; RIAZUDDIN, S.; BERNSTEIN, S.L.; AHMED, Z.M.; NESS, S.L.; POLOMENO, R.; RAMESH, A.; SCHLOSS, M.; SRISAILPATHY, C.R.; WAYNE, S.; BELLMAN, S.; DESMUKH, D.; AHMED, Z.; KHAN, S.N.; KALOUSTIAN, V.M.; LI, X.C.; LALWANI, A.; RIAZUDDIN, S.; BITNER-GLINDZICZ, M.; NANCE, W.E.; LIU, X.Z.; WISTOW, G.; SMITH, R.J.; GRIFFITH, J.A.; WILCOX, E.R.; FRIEDMAN, T.B.; MORELL, R.J. Usher syndrome 1D and nonsyndromic autosomal recessive deafness DFNB12 are caused by allelic mutations of the novel cadherin-like gene CDH23. *Am J Hum Genet.* **68(1)**: 26-37, 2001.

BRUZZONE, R.; WHITE, T.W.; PAUL, D.L. - Connections with connexins: the molecular basis of direct intercellular signaling. *Eur. J. Biochem. Rev.*, **238(1)**: 1-27, 1996.

DE KOK, Y.J.; DER MAAREL, S.M.; NER-GLINDZICZ, M.; HUBER, I.; MONACO, A.P.; MALCOLM, S.; PEMBREY, M.E.; ROPERS, H.H.; CREMERS, F.P. Association between X-linked mixed deafness and mutations in the POU domain gene POU3F4. *Science.* **267(5198)**: 685-8, 1995.

DEL CASTILLO, I.; VILLAMAR, M.; MORENO-PELAVO, M.A.; DEL CASTILLO, F.J.; ÁLVAREZ, A.; TELLERÍA, D., MENÉNDEZ, I. AND MORENO, F. – A deletion involving the connexin 30 gene in nonsyndromic hearing impairment. *N Engl J Med*, **346**: 243-249, 2002.

DENOYELLE, F.; WEIL, D.; MAW, M.A.; WILCOX, A.S.; LENCH, N.J.; ALLEN-POWELL, D.R.; OSBORN, A.H.; DAHL, H.H.M.; MIDDLETON, A.; HOUSEMAN, M.J.; DODÉ, C.; MARLIN, S.; BOULILA-ELGAÏED, A.; GRATI, M.; AYADI, H.; BENARAB, S.; BITOUN, P.; LINA-GRANAE, G.; GODET, J.; MUSTAPHA, M.; LOISELET, J.; EL-ZIR, É.; AUBOIS, A.; JOANNARD, A.; LEVILLIERS, J.; GARABÉDIAN, E.N.; MUELLER, R.F. - Prelingual deafness: high prevalence of a 35delG mutation in the connexin 26 gene. *Hum. Mol. Genet*, **6(12)**: 2173-77, 1997.

DONAUDY, F.; FERRARA, A; ESPOSITO, L.; HERTZANO, R.; BEN-DAVID, O; BELL, RE.; MELCHIONDA,S.; ZELANTE, L.; AVRAHAM, KB.; GASPARINI, P. Multiple mutations of MYO1A, a cochlear-expressed gene, in sensorineural hearing loss. *Am J Hum Genet*. **72(6)**: 571-7, 2003.

FOOTE, C.I.; ZHOU, L.; ZHU, X.; NICHOLSON, B.J. - The pattern of disulfide linkages in the extracellular loop regions of connexin 32 suggests a model for the docking interface of gap junctions. *J. Cell. Biol.*, **140(5)**: 1187-97, 1998.

GOTTFRIED, I.; LANDAU, M.; GLASER, F.; DI W.E.; OPHIR, J.; MEVORAH, B.; BEN-TAL, N.; KELSELL, D.P.; AVRAHAM, K.B. – A mutation in GJB3 is associated with recessive erythrokeratoderma variabilis (EKV) and leads to defective trafficking of the connexin 31 protein. *Hum. Mol. Genet.*, **11(11)**: 1311-16, 2002.

GRIFA, A; WAGNER, CA.; D'AMBROSIO, L.; MELCHIONDA, S.; BERNARDI, F.; LOPEZ-BIGAS, N.; RABIONET, R.; ARBONES, M.; MONICA, MD.; ESTIVILL, X.; ZELANTE, L.; LANG, F.; GASPARINI, P. Mutations in GJB6 cause nonsyndromic autosomal dominant deafness at DFNA3 locus. *Nat Genet*. **23(1)**: 16-18, 1999.

HANAHAN, D. - Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J. Mol. Biol*. **166**: 557-80, 1983.

HARDISTY, RE.; MBURU, P.; BROWN, SD. ENU mutagenesis and the search for deafness genes. *Br J Audiol*. **33(5)**: 279-283, 1999.

HENNEMANN, H., SCHWARTZ, H.J. & WILLECKE, K. Characterization of gap junction genes expressed in F9 embryonic carcinoma cells: molecular cloning of mouse connexin 31 and -45 cDNAs. *Eur. J. Cell Biol.* 57, 51-58, 1992.

HOH, J.H.; SCPTT, A.J.; JEAN-PAUL, R. Molecular cloning and characterization of a new member of the gap junction gene family, connexin-31. *J. Biol. Chem.* 266: 6524-6531, 1991.

HOUSEMAN, M.J.; ELLIS, L.A.; PAGNAMENTA, A.; DI, W-L.; RICHARD, S.; OSBORN, A.H.; DAHL, H-H. M.; TAYLOR, G.R.; BITNER-GLINDZIC, M.; REARDON, W.; MULLER, R.F.; KELSELL, D.P. Genetic analysis of the connexin-26 M34T variant: identification of genotype M34T/M34T segregating with mild-moderate non-syndromic sensorineural hearing loss. *J. Med. Genet.* 37: 20-25, 2001.

HUDSPETH, A.J. How the ear's works work. *Nature.* 341: 397-404, 1989.

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

KELLEY, P.M.; HARRIS, D.J.; COMER, B.C.; ASKEW, J.W.; FOWLER, T.; SMITH, S.D.; KIMBERLING, W.J. - Novel mutations in the connexin 26 gene (GJB2) that cause autosomal recessive (DFNB1) hearing loss. *Am. J. Hum. Genet.*, 62(4): 792-99, 1998.

KELSELL, D.P., DUNLOP, J., STEVENS, H. P., LENCH, N.J., LIANG, J.N., PARRY, G., MUELLER, R.F.; LEIGH, I.M. Connexin 26 mutations in hereditary non-syndrome sensorineural deafness. *Nature*, 387: 80-83, 1997.

KELSELL, D.P., WILGOSS, A.L.; RICHARD, G.; STEVENS, H.P.; MUNRO, C.S.; LEIGH, I.M. - Connexin mutations associated with palmoplantar keratoderma and profound deafness in a single family. *Eur. J. Hum. Genet.* 8: 141-144, 2000.

KRUTOVSKIKH, V. & YAMASAKI, H. - Connexin gene mutations in human diseases. *Mutation Research*, 462: 197-207, 2000.

KUBISCH, C.; SCHROEDER, BC.; FRIEDRICH, T.; LUTJOHANN, B.; EL-AMRAOUI, A.; MARLIN, S.; PETIT, C.; JENTSCH, T.J. KCNQ4, a novel potassium channel expressed in sensory outer hair cells, is mutated in dominant deafness. *Cell.* 96(3): 437-46, 1999.

KURIMA, K.; PETERS, L.M.; YANG, Y.; RIAZUDDIN, S.; AHMED, Z.M.; NAZ, S.; ARNAUD, D.; DRURY, S.; MO, J.; MAKISHIMA, T.; GHOSH, M.; MENON, P.S.; DESHMUKH, D.; ODDOUX, C.; OSTRER, H.; KHAN, S.; RIAZUDDIN, S.; DEININGER, P.L.; HAMPTON, L.; SULLIVAN, S.L.; BATTEY, J.F.; KEATS, B.J.; WILCOX, E.R.; FRIEDMAN, T.B.; GRIFFITH, A.J. Dominant and recessive deafness caused by mutations of a novel gene, TMC1, required for cochlear hair-cell function. *Nat Genet.* **30(3)**:277-84, 2002.

LALWANI, AK.; GOLDSTEIN, JA.; KELLEY, MJ.; LUXFORD, W.; CASTELEIN, CM.; MHATRE, AN. Human nonsyndromic hereditary deafness DFNA17 is due to a mutation in nonmuscle myosin MYH9. *Am J Hum Genet.* **67(5)**: 1121-8, 2000.

LI, X.C.; EVERETT, L.A.; LALWANI, A.K.; DESMUKH, D.; FRIEDMAN, T.B.; GREEN, E.D.; WILCOX, E.R. A mutation in PDS causes non-syndromic recessive deafness. *Nat Genet.* **18(3)**: 215-217, 1998.

LIU, X.Z.; WALSH, J.; MBURU, P.; KENDRICK-JONES, J.; COPE, M.J.; STEEL, K.P.; BROWN, S.D. Mutations in the myosin VIIA gene cause non-syndromic recessive deafness. *Nat Genet.* **16(2)**: 188-190, 1997.

LIU, X.Z.; XIA, X.J.; XU, L.R.; PADYA, A.; LIANG, C.Y.; BLANTON, S.H.; BROWN, S.D.M.; STEES, K.P.; NANCE, W.E. Mutation in connexin31 underlie recessive as well as dominant non-syndromic hearing loss. *Hum. Mol. Genet.*, **9**: 63-67, 2000.

LIU, X.Z.; XIA, X.J.; ADAMS, J.; CHEN, Z.Y.; WELCH, K.O.; TEKIN, M.; OUYANG, X.M.; KRISTIANSEN, A; PANDYA, A; BALKANY, T.; ARNOS, K.S.; NANCE, W.E. Mutations in GJA1 (connexin 43) are associated with non-syndromic autosomal recessive deafness. *Hum. Mol. Genet.*, **10(25)**: 2945-2951, 2001.

LIU, X.Z.; OUYANG, X.M.; XIA, X.J.; ZHENG, J.; PANDYA, A; LI, F.; DU, L.L.; WELCH, K.O.; PETIT, C.; SMITH, R.J.; WEBB, B.T.; YAN, D.; ARNOS, K.S.; OREY, D.; DALLOS, P.; NANCE, W.E.; CHEN, Z.Y. Prestin, a cochlear motor protein, is defective in non-syndromic hearing loss. *Hum. Mol. Genet.*, **12(10)**: 1155-62, 2003.

LÓPEZ-BRIGAS, N.; RABIONET, R.; ARBONES, M.L.; ESTIVILL, X. R32W variant in connexin 31: mutation or polymorphism for deafness and skin disease? *Eur J Hum Genet.* **9**: 70, 2001.

LYNCH, ED.; LEE, MK.; MORROW, JE.; WELCSH, PL.; LEON, PE.; KING, MC.. Nonsyndromic deafness DFNA1 associated with mutation of a human homolog of the *Drosophila* gene *diaphanous*. *Science*. **278(5341)**: 1223-4, 1997.

McGUIRT, WT.; PRASAD, SD.; GRIFFITH, AJ.; KUNST, HP.; GREEN, GE.; SHPARGEL, KB.; RUNGE, C.; HUYBRECHTS, C.; MUELLER, RF.; LYNCH, E.; KING, MC.; BRUNNER, HG.; CREMERS, CW.; TAKANOSU, M.; LI, SW.; ARITA, M.; MAYNE, R.; PROCKOP, DJ.; VAN CAMP, G.; SMITH, RJ. Mutations in COL11A2 cause non-syndromic hearing loss (DFNA13). *Nat Genet*. **23(4)**: 413-9, 1999.

MELCHIONDA, S.; AHITUV, N.; BISCEGLIA, L.; SOBE, T.; GLASER, F.; RABIONET, R.; ARBONES, ML.; NOTARANGELO, A.; DI IORIO, E.; CARELLA, M.; ZELANTE, L.; ESTIVILL, X.,; ARAHAM, KB.; GASPARINI, P. MYO6, the human homologue of the gene responsible for deafness in Snell's waltzer mice, is mutated in autosomal dominant nonsyndromic hearing loss. *Am J Hum Genet*. **69(3)**: 635-40, 2001.

MHATRE, A.N., WELD, E., LALWANI, A.K. Mutation analysis of Connexin 31 (GJB3) in sporadic non-syndromic hearing impairment. *Clin Genet.*, **63**: 154-159, 2003.

MORTON, N.E. Genetic epidemiology of hearing impairment. *Ann. N Y Acad. Sci.*, **630**: 16-31, 1991.

MURGIA, A.; ORZAN, E.; POLLI, R.; MARTELLA, M.; VINANZI, C.; LEONARDI, E.; ARSLAN, E.; ZACCHELLO, F. - Cx26 deafness: mutation analysis and clinical variability. *J. Med. Genet*, **36(11)**: 829-832, 1999.

MUSTAPHA, M.; WEIL, D.; CHARDENOUX, S.; ELIAS, S.; EL-ZIR, E.; BECKMANN, J.S.; LOISELET, J.; PETIT, C. An alpha-tectorin gene defect causes a newly identified autosomal recessive form of sensorineural pre-lingual non-syndromic deafness, DFNB21. *Hum. Mol. Genet.*, **8(3)**: 409-412, 1999.

NAZ, S.; GIGUERE, C.M.; KOHRMAN, D.C.; MITCHEM, K.L.; RIAZUDDIN, S.; MORELL, R.J.; RAMESH, A.; SRISAILPATHY, S.; DESHMUKH, D.; RIAZUDDIN, S.; GRIFFITH, A.J.; FRIEDMAN, T.B.; SMITH, R.J.; WILCOX, E.R. Mutations in a novel gene, TMIE, are associated with hearing loss linked to the DFNB6 locus. *Am J Hum Genet*. **71(3)**: 632-636, 2002.

- NISHIMURA, A.; MORITA, M.; NISHIMURA, Y.; SUGINO, Y. - A rapid and highly efficient method for preparation of competent *Escherichia coli* cells. *Nucleic. Acids. Res.* **18**: 6169, 1990.
- OLIVEIRA, C.A.; MACIEL-GUERRA, A.T.; SARTORATO, E.L. Deafness resulting from mutations in the GJB2 (connexin 26) gene in Brazilian patients. *Clin. Genet.* **61**: 354-358, 2002.
- PARVING, A. & HAUCH, A.M. The causes of profound hearing impairment in a school for the deaf – a longitudinal study. *Br j Audiol* **28 (2)**: 63-69, 1994.
- PETERS, LM.; ANDERSON, DW.; GRIFFITH, AJ.; GRUNDFAST, KM.; SAN AGUSTIN, TB.; MADEO, AC.; FRIEDMAN, TB.; MORELL, RJ. Mutation of a transcription factor, TFCP2L3, causes progressive autosomal dominant hearing loss, DFNA28. *Hum. Mol. Genet.*, **11(23)**: 2877-85, 2002.
- RABIONET, R.; GASPARINI, P.; ESTIVILL, X. Connexin and deafness Homepage. Disponível em: <<http://www.iro.es/cx26deaf.html>>. Acesso em: jul. 2003, 15:12.
- RABIONET, R.; GASPARINI, P.; ESTIVILL, X. - Molecular genetics of hearing impairment due to mutations in gap junction genes encoding beta connexins. *Hum. Mut.* **16(3)**: 190-202, 2000.
- RICHARD, G.; SMITH, L.E.; BAILEY, R.A.; ITIN, P.; HOHL, D.; EPSTEIN JR, E.H.; DIGIOVANNA, J.J.; COMPTON, J.G. AND BALE, S.J. Mutations in the human connexin gene GJB3 cause erythrokeratoderma variabilis. *Nature Genet.*, **20**: 366-369, 1998.
- RICHARD, G.; BROWN, N.; SMITH, L.E.; TERRINONI, A.; MELINO, G.; MACKIE, R.M.; BALE, S.J.; OITTO, J. The spectrum of mutations in erythrokeratodermias – novel and de novo mutations in GJB3. *Hum. Genet.*, **106**: 321-329, 2000.
- ROBERTSON, NG.; LU, L.; HELLER, S.; MERCHANT, SN.; EAVEY, RD.; MCKENNA, M.; NADOL, JB. JR.; MIYAMOTO, RT.; LINTHICUM, FH. Mutations in a novel cochlear gene cause DFNA9, a human nonsyndromic deafness with vestibular dysfunction. *Nat Genet.* **20(3)**: 299-303, 1998.
- ROUAN, F.; LO, C.W.; FERTALA, A.; WAHL, M.; JOST, M.; ROBECK, U.; UITTO, J.; RICHARD, G. Divergent effects of two sequence variants of GJB3 gene (G12D and R32W) on the function of connexin 31 in vitro. *Experimental Dermatology*, **12**: 191-197, 2003.



- SANGER, F.; NICKLEN, S.; COULSON, A. R. – DNA sequencing with chain terminating inhibitors. *Proc. Nat. Acad. Sci.* **74**: 5463-5467, 1977.
- SCOTT, H.S.; KUDOH, J.; WATTENHOFER, M.; SHIBUYA, K.; BERRY, A.; CHRAST, R.; GUIPPONI, M.; WANG, J.; KAWASAKI, K.; ASAKAWA, S.; MINOSHIMA, S.; YOUNUS, F.; MEHDI, S.Q.; RADHAKRISHNA, U.; PAPASAVVAS, M.P.; GEHRIG, C.; ROSSIER, C.; KOROSTISHEVSKY, M.; GAL, A.; SHIMIZU, N.; BONNE-TAMIR, B.; ANTONARAKIS, S.E. Insertion of beta-satellite repeats identifies a transmembrane protease causing both congenital and childhood onset autosomal recessive deafness. *Nat Genet.* **27(1)**: 59-63, 2001.
- SIMÕES, A.M. & MACIEL-GUERRA, A.T. – A surdez evitável: predominância de fatores ambientais na etiologia da surdez neurosensorial profunda. *Jornal de Pediatria* **68**: 254-257, 1992.
- SOBE, T.; VREUGDE, S.; SHAHIN, H.; BERLIN, M.; DAVIS, N.; KANAAN, M.; YARON, Y.; ORR-URTREGER, A.; FRYDMAN, M.; SHOHAT, M.; AVRAHAM, K.B. - The prevalence and expression of inherited connexin 26 mutations associated with nonsyndromic hearing loss in the Israeli population. *Hum Genet.*, **106**:50-51, 2000.
- STEEL, K. P. One connexin, two diseases. *Nature Genet.*, **20**: 319-320, 1998.
- STEEL, K.P. - New interventions in hearing impairment. *BMJ.*, 320:622-5, 2000b.
- VAN CAMP, G. AND SMITH, R.J.H. Hereditary hearing loss homepage. Disponível em: <<http://dnalab-www.uia.ac.be/dnalab/hhh/>>. Acesso em: 25 jul. 2003, 15:00.
- VAN LAER, L.; HUIZING, EH.; VERSTREKEN, M.; VAN ZUIJLEN, D.; WAUTERS, JG.; BOSSUYT, PJ.; VAN DE HEYNING, P.; MCGUIRT, WT.; SMITH, RJ.; WILLEMS, PJ.; LEGAN, PK.; RICHARDSON, GP.; VAN CAMP, G. Nonsyndromic hearing impairment is associated with a mutation in DFNA5. *Nat Genet.* **20(2)**: 194-7, 1998.
- VAHAVA, O.; MORELL, R.; LYNCH, ED.; WEISS, S.; KAGAN, ME.; AHITUV, N.; MORROW, JE.; LEE, MK.; SKVORAK, AB.; MORTON, CC.; BLUMENFELD, A.; FRYDMAN, M.; FRIEDMAN, TB.; KING, MC.; AVRAHAM, KB. Mutation in transcription factor POU4F3 associated with inherited progressive hearing loss in humans. *Science.* **279(5358)**: 1870-1, 1998.

- VERHOEVEN, K.; VAN LAER, L.; KIRSCHHOFER, K.; *et al.* Mutations in the human alpha-tectorin gene cause autosomal dominant non-syndromic hearing impairment. *Nat Genet.* **19(1)**:8, 1998.
- VERPY, E.; MASMOUDI, S.; ZWAENEPOEL, I.; LEIBOVICI, M.; HUTCHIN, T.P.; DEL CASTILLO, I.; NOUAILLE, S.; BLANCHARD, S.; LAINE, S.; POPOT, J.L.; MORENO, F.; MUELLER, R.F.; PETIT, C. Mutations in a new gene encoding a protein of the hair bundle cause non-syndromic deafness at the DFNB16 locus. *Nat Genet.* **29(3)**: 345-349, 2001.
- WALSH, T.; WALSH, V.; VREUGDE, S.; HERTZANO, R.; SHAHIN, H.; HAIKA, S.; LEE, MK; KANAAN, M.; KING, MC.; AVRAHAM, K.B. From flies' eyes to our ears: mutations in a human class III myosin cause progressive nonsyndromic hearing loss DFNB30. *Proc Natl Acad Sci USA.* **99(11)**: 7518-23, 2002.
- WANG, A.; PROBST, F.J.; FRIDELL, R.A.; RAPHAEL, Y.; SAUNDERS, T.L.; LIANG, Y.; MORELL, R.J.; TOUCHMAN, J.W.; LYONS, R.H.; NOBEN-TRAUTH, K.; FRIEDMAN, T.B.; CAMPER, S.A. Correction of deafness in shaker-2 mice by an unconventional myosin in a BAC transgene. *Science.* **280(5368)**: 1444-7, 1998.
- WAYNE, S.; ROBERTSON, NG.; DECLAU, F.; CHEN, N.; VERHOEVEN, K.; PRASAD, S.; TRANEBJARG, L.; MORTON, CC.; RYAN, AF.; VAN CAMP, G.; SMITH, RJ. Mutations in the transcriptional activator EYA4 cause late-onset deafness at the DFNA10 locus. *Hum. Mol. Genet.* **10(3)**: 195-200, 2001.
- WEIL, D.; KUSSEL, P.; BLANCHARD, S.; LEVY, G.; LEVI-ACOBAS, F.; DRIRA, M.; AYADI, H.; PETIT, C. The autosomal recessive isolated deafness, DFNB2, and the Usher 1B syndrome are allelic defects of the myosin-VIIA gene. *Nat Genet.* **16(2)**:191-3, 1997.
- WENZEL, K.; MANTHEY, D.; WILLECKE, K.; GRZESCHIK, K.H.; TRAUB, O. Human gap junction protein connexin 31: Molecular cloning and expression analysis. *Biochemical and Biophysical Research Communications.*, **248**, 910-915, 1998.
- WILCOX, A.S.; SAUNDERS, K.; OSBORN, A.H.; ARNOLD, A.; WUNDERLICH, J.; KELLY, T.; COLLINS, V.; WILCOX, L.J.; GARDNER, R.J.MC.; KAMARINOS, M.; CONE-WESSON, B.; WILLIAMSON, R.; DAHL, H.H.M. - High frequency hearing loss correlated with mutations in the GJB2 gene. *Hum. Genet.* **106(4)**: 399-405, 2000.

WILCOX, E.R.; BURTON, Q.L.; NAZ, S.; RIAZUDDIN, S.; SMITH, T.N.; PLOPLIS, B.; BELYANTSEVA, I.; BEN-YOSEF, T.; LIBURD, N.A.; MORELL, R.J.; KACHAR, B.; WU, D.K.; GRIFFITH, A.; RIAZUDDIN, S.; FRIEDMAN, T.B. Mutations in the gene encoding tight junction claudin-14 cause autosomal recessive deafness DFNB29. *Cell*. **104(1)**: 165-72, 2001.

XIA, J.H.; LIU, C.Y.; TANG, B.S.; PAN, Q.; HUANG, L.; DAI, H.P.; ZHANG, B.R.; XIE, W.; HU, D.X.; ZHEN, D.; SHI, X.L.; WANG, D.; XIA, K.; YU, K.P.; LIAO, X.D.; FENG, Y.; YANG, Y.F.; XIAO, J.Y.; XIE, D.H. & HUANG, J.Z. Mutations in the gene encoding gap junction protein beta-3 associated with autosomal dominant hearing impairment. *Nature Genet*. **20**: 370-373, 1998.

YASUNAGA, S.; GRATI, M.; COHEN-SALMON, M.; EL-AMRAOUI, A.; MUSTAPHA, M.; SALEM, N.; EL-ZIR, E.; LOISELET, J.; PETIT, C. A mutation in OTOF, encoding otoferlin, a FER-1-like protein, causes DFNB9, a nonsyndromic form of deafness. *Nature Genet*. **21(4)**: 347-9, 1999.

YOUNG, T.L.; IVES, E.; LYNCH, E.; PERSON, R.; SNOOK, S.; MACLAREN, L.; CATER, T.; GRIFFIN, A.; FERNANDEZ, B.; LEE, M.K.; KING, M.C.; CATOR, T. Non-syndromic progressive hearing loss DFNA38 is caused by heterozygous missense mutation in the Wolfram syndrome gene WFS1. *Hum. Mol. Genet*. **10(26)**: 3111, 2001.

ZWAENEPOEL, I.; MUSTAPHA, M.; LEIBOVICI, M.; VERPY, E.; GOODYEAR, R.; LIU, X.Z.; NOUAILLE, S.; NANCE, W.E.; KANAAN, M.; AVRAHAM, K.B.; TEKAIA, F.; LOISELET, J.; LATHROP, M.; RICHARDSON, G.; PETIT, C. Otoancorin, an inner ear protein restricted to the interface between the apical surface of sensory epithelia and their overlying acellular gels, is defective in autosomal recessive deafness DFNB22. *Proc Natl Acad Sci USA*. **99(9)**: 6240-5, 2002.



***ANEXOS***

## Screening for mutations in the connexin 31 gene in Brazilian patients with non-syndromic deafness

Alexandrino F<sup>1</sup>, Oliveira CA<sup>1</sup>, Reis FC<sup>1</sup>, Maciel-Guerra AT<sup>2</sup>, Sartorato EL<sup>1</sup>.

CBMEG/Human Genetics Laboratory<sup>1</sup> and Department of Medical Genetics/FCM<sup>2</sup>,  
Campinas, SP, Brazil.

Short Title: Mutations in the connexin 31 gene in Brazilian patients.

Corresponding author: Dra. Edi Lucia Sartorato

UNICAMP/CBMEG – Cidade Universitária Zeferino Vaz, Barão Geraldo.

Campinas - São Paulo

Zip code: 13083-970

Brazil.

Tel.: +55 19 37881147

Fax: +55 19 37881089

e-mail: [sartor@unicamp.br](mailto:sartor@unicamp.br)

### Abstract

Deafness is a complex disorder that involves a high number of genes and environmental factors. At this moment, there has been enormous progress in non-syndromic deafness research, with the identification of 90 loci and 33 nuclear and 2 mitochondrial genes (<http://dnalab-www.uia.ac.be/dnalab/hhh/>).

Mutations in the GJB3 gene encoding the gap junction protein connexin 31 (Cx31) have been pathogenically linked to erythrokeratoderma variabilis and non-syndromic autosomal recessive or dominant hereditary hearing impairment. To determine the contribution of connexin 31 to sporadic deafness, we analysed the entire gene of connexin 31 in 67 families with non-syndromic hearing impairment and no mutation in the connexin 26 gene. Single coding exon of connexin 31 was amplified from genomic DNA and then sequenced.

We reported three amino acid changes, Y177D, 49delK and R32W, and two nucleotides variants which represents a silent mutation. The R32W substitution has been previously described, and its involvement in hearing impairment remains uncertain.

We presume that mutations in connexin 31 gene are an infrequent cause of non syndromic deafness.

---

## **Key Words**

Connexin31 (GJB3) – gap junctions – hearing impairment – mutations.

## **Introduction**

Hearing impairment is the most prevalent sensorial deficit in the general population and its prevalence increases with age (1). Genetic factors represent the major cause of hearing loss, with about 60% of cases being due to genetic factors in developed countries (2,3). In Brazil, most cases to hearing loss are due to environmental factors, such as congenital infections (mainly rubella), perinatal anoxia, kernicterus and meningitis (4). However, the proportion of genetic causes tends to increase as a result of improvements in health care.

In some cases, different mutations at the same locus have been found to cause syndromic and non-syndromic forms of deafness. Approximately 90% of genetic deafness is non-syndromic, and in this group the majority of cases are autosomal recessive forms, in which the patients are born from parents with normal hearing, while the remaining 10% or less are born from deaf parents (5).

Recently, some forms of deafness have been described in which the hearing loss may result from the combined effects of genes at two or more loci.

Direct evidence of the critical physiological role of connexins has come through the linkage of several human diseases with pathogenic mutations in specific connexin gene.

Connexins are transmembrane proteins that are related in intercellular channels. These gap junctions channels permit the rapid exchange of ions and are thought to play an important

role for maintaining hearing function by the load circulation of potassium between the fluids of the inner ear (6,7). The blockage of K<sup>+</sup> circulation causes hearing impairment.

A number of relevant genes have been cloned. DFNB1 was the first locus implicated in non-syndromic deafness. The causative gene GJB2, which encodes the protein connexin 26, accounts for up to 50% of recessive non-syndromic hearing impairment in many populations (8-11).

Several connexins are known to be expressed in the cochlea and involved in deafness. The GJB3 gene (Cx31) has recently been found as deafness gene encoding ion channels regulating K<sup>+</sup> recycling pathway.

Mutations in the connexin 31 have been detected either in erythrokeratoderma variabilis (12,13), or in non-syndromic autosomal recessive or autosomal dominant deafness (14,15). In this study we extended our analysis and after the sequencing of GJB2 gene we analysed the GJB3 gene in 67 families with no mutations in GJB2 gene.

## **Material and Methods**

Blood specimens and clinical data were collected from human subjects with approval by the appropriate institutional review board and informed consent of those subjects.

For mutations analysis of single coding region GJB3 gene was PCR amplified using the five pairs of primers that were described elsewhere (15). PCR was performed in a 40µl total volume containing 200ng of genomic DNA, 20pmols of each primer, 200µM of each dNTP, 1,5mM MgCl<sub>2</sub> and 2,5 U of *Taq* DNA polymerase. The conditions for the reactions were 94°C for 5 min, 30 cycles of 94°C for 1 min, 62°C for 1 min and 72°C for 1 min, and a final extension of 72°C for 5 min. Direct sequencing of PCR products were performed with the ABI Prism BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit (ABI PRISM/PE Biosystems) and the products resolved on ABI PRISM<sup>TM</sup> 377 (*Perkin Elmer*). For mutation analysis, the denatured PCR products were run on a 1mm thick 12% non-denaturing polyacrylamide gel and SSCPs detected using silver staining as previously described (15).

## Results and Discussion

The entire GJB3 gene was sequenced in families with non-syndromic hearing loss after initial screening for mutation in GJB2 alleles. Two new mutations in GJB3 gene were found.

One mutation is a (T-G) transition leading to a missense mutation Y177D in the position 529 situated in the second extracellular loop of the connexin 31 gene (Fig. 1). This mutation was found in two unrelated patients with profound hearing loss and no skin lesion in heterozygous condition.

The first patient has a profound hearing loss and probably inherited the mutation from his mother, whose hearing status is unknown. In the other patient, the mutation was also found in his hearing father in heterozygous condition. Therefore, the pathogenicity of this mutation could not be confirmed. To exclude the possibility that the Y177D mutation is simply a polymorphism, we have studied samples from 50 unrelated control subjects, but no mutation was found.

The role of this mutation remains to be cleared. In fact, there are many others mutation in connexin genes that could act as a polymorphism in different backgrounds, such as R32W, which we will discuss later.

The other novel mutation found is a deletion of three nucleotides (GAA) in the GJB3 gene that results in the missing of a lysine amino acid in codon 49 (49delK) and is shown in figure 2. This patient presents moderate sensorineural deafness with late onset and no other clinical abnormalities.

The R32W mutation was first described associated with two sequence variants in GJB2 gene (M34T and D66W) in two affected members of a family with hearing loss and palmoplantar keratoderma (16). The amino acid substitution R32W is located in the highly conserved sequence of the first transmembrane domain. C→T transversion at nt 1227 changes the amino acid arginine to a noncharged amino acid tryptophan. Other studies extended the analysis of this mutation to patients with peripheral neuropathy (2/110), deafness (7/153) and control subjects (8/46) (17). R32W was reported as a common



polymorphism with an allelic frequency of 7,5% in the Spanish population, and does not segregate with hearing impairment in several families (18).

Recently, the biologic relevance of R32W mutation was studied in terms of gap junction activity, suggesting that this mutation is functionally inconsequential polymorphism of Cx31 (19).

---

In our study, we found the R32W mutation in heterozygous condition in a large family with many individuals with different degrees of hearing impairment. The pedigree of the family is shown in figure 3.

The patient II-10 and his father were heterozygous for a R32W and present moderate sensorineural deafness with late onset. On the other hand, in his sister II-6, who presents profound hearing loss and was submitted to a cochlear implant, the R32W mutation was not detected. Therefore, the deafness is not segregating with this mutation.

The presence of the R32W mutation can be detected by restriction analysis digesting with *Hpa* II enzyme, which in the absence of R32W alteration cuts the PCR product (210bp) in two fragments of 117bp and 93bp.

We also identified two single nucleotide substitutions which do not affect the connexin 31 amino acid sequence (P159 and G193). The P159 polymorphism occurs within the position 477 and represents a G to A transition in a heterozygous form and does not change the proline amino acid.

The transition C to T at nucleotide 579 results in a G193 alteration which does not cause change in the glycine amino acid at this position.

### Conclusions

Clinical data of patients with GJB3 mutations indicate that there is a wide variability in the age of onset of hearing loss, with some changes being also present in subjects with apparent normal hearing. This variability depends on the type and location on the GJB3 change.

In this study, mutations of GJB3 gene (Cx31) were not considered to be a major cause of non-syndromic hearing impairment after GJB2 gene (Cx26).

In agreement with other authors, we suggest that the Cx31 mutation is not a common cause of deafness. Further studies are necessary to confirm the relevance of the mutations in this gene in order to detect whether some of them may acts as a modifying allele.

### **Acknowledgements**

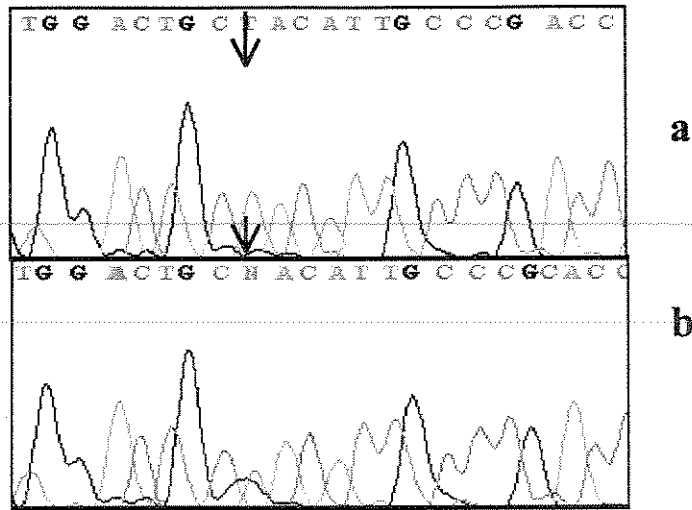
This work was supported by Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP).

---

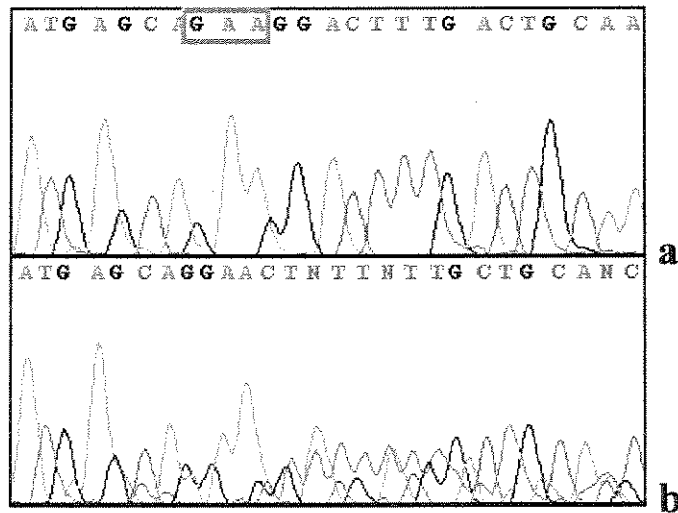
### **References**

1. Rabionet R, Gasparini P, Estivill X. Molecular genetics of hearing impairment due to mutations in gap junctions genes encoding beta connexins. *Hum Mutat* 2000; 16: 190-202.
2. Cohen MM, Gorlin RJ. Epidemiology, etiology and genetic patterns. In: Gorlin RJ, Toriello HV, Cohen MM, eds. *Hereditary Hearing Loss and its Syndromes*. Oxford: Oxford University Press, 1995: 9-21.
3. Morton NE. Genetic epidemiology of hearing impairment. *Ann Mew York Acad Sci* 1991; 630: 16-31.
4. Simões AM & Maciel-Guerra AT. A surdez evitável: predominância de fatores ambientais na etiologia da surdez neurossensorial profunda. *J Pediatria* 1992; 68: 254-257.
5. Nance WE, Arnos KS, Carey JC et al. Genetics evaluation guidelines for the etiologic diagnosis of congenital hearing loss. *Genet Med* 2002; 4(3): 162-171.
6. Goodenough DA, Goliger JA, Paul DL. Connexin, connexons, and intercellular communication. *Annu Rev Biochem* 1996; 65: 475-502.
7. Bruzzone R, White TW, Paul DL. Connections with connexins: the molecular basis of direct intercellular signaling. *Eur J Biochem* 1996; 238: 1-27.
8. Kelsell DP, Dunlop J, Stevens HP, Lench NJ, Liang JN, Parry G, Mueller RF, Leigh IM. Connexin 26 mutations in hereditary non-syndrome sensorineural deafness. *Nature* 1997; 387: 80-83.
9. Zelante L, Gasparini P, Estivill X et al. Connexin 26 mutations associated with the most common form of non-syndromic neurosensory autosomal recessive deafness (DFNB1) in Mediterraneans. *Hum Mol Genet* 1997; 6: 1605-1609.

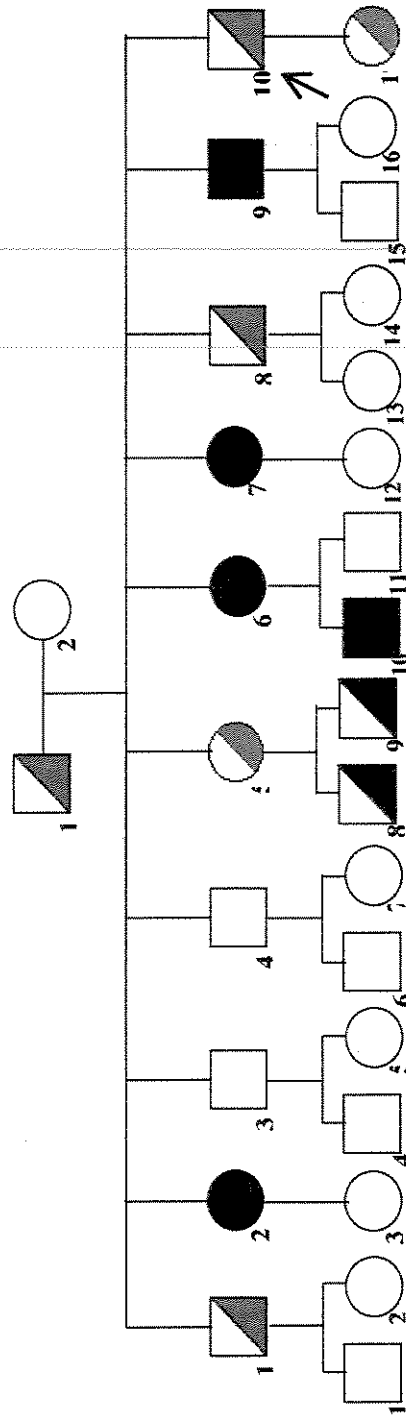
10. Estivill X, Fortina P, Surrey S et al. Connexin 26 mutations in sporadic and inherited sensorineural deafness. *Lancet* 1998; 351: 394-398.
11. Green GE, Scott DA, McDonald JM, Woodworth GG, Sheffield VC, Smith RJ. Carrier rates in the Midwestern United States for GJB2 mutations causing inherited deafness. *Jama* 1999; 281: 2211-2216.
12. Richard G, Smith LE, Bailey RA, Itin P, Hohl D, Epstein Jr ER, Digiovanna JJ, Compton JG, Bales SJ. Mutations in the human connexin gene GJB3 cause erythrokeratoderma variabilis. *Nature Genet* 1998; 20: 366-369.
13. Richard G, Brown N, Smith LE et al. The spectrum of mutations in erythrokeratodermis – novel and de novo mutations in GJB3. *Hum Genet* 2000; 106: 321-329.
14. Xia JH, Liu CY, Tang BS et al. Mutations in the gene encoding gap junction protein beta-3 associated with autosomal dominant hearing impairment. *Nature Genet* 1998; 20: 370-373.
15. Liu XZ, Xia XJ, Xu LR, Padya A, Liang CY, Blanton SH, Brown SDM, Sees KP, Nance WE. Mutation in connexin31 underlie recessive as well as dominant non-syndromic hearing loss. *Hum Mol Genet* 2000; 9: 63-67.
16. Kelsell DP, Wilgoss AL, Richard G, Stevens HP, Munro CS, Leigh IM. Connexin mutations associated with palmoplantar keratoderma and profound deafness in a single family. *Eur. J. Hum. Genet* 2000; 8: 141-144.
17. López-Brigas N, Rabionet R, Martínez E, Banchs I, Volpini V, Vance JM, Arbonés ML, Estivill X. Identification of seven novel SNPs (five nucleotide and two amino acid substitutions) in the connexin 31 (GJB3) gene. *Hum Mutat* 2000; 15: 481-482.
18. López-Brigaz N, Rabionet R, Arbonés ML, Estivill X. R32W variant in connexin 31: mutation or polymorphism for deafness and skin disease? *Eur J Hum Genet* 2001; 9: 70.
19. Mhatre AN, Weld E, Lalwani AK. Mutation analysis of Connexin 31 (GJB3) in sporadic non-syndromic hearing impairment. *Clin Genet* 2003; 63: 154-159.



**Figs. 1-** Sequence analysis of GJB3 gene illustrating Y177D alteration. A single peak (T) is observed at nucleotide 529 in the Cx31 sequence from a control (a) and a doublet (T/G) is observed at nucleotide 529 (N) in a patient from the study (b).



**Figs. 2-** Partial sequence of GJB3 gene in the region of 49delK (GAA) alteration showing the wild type (a) and the 49delK in heterozygosity (b)



**Fig. 3-** Pedigree of the family with R32W mutation:

- ◻ Individual heterozygous for a R32W mutation and with sensorineural deafness
- ◼ Individual heterozygous for a R32W mutation and normal hearing
- ◐ Individual with sensorineural deafness and absence of R32W mutation