

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS - UNICAMP
FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS
DEPARTAMENTO DE GENÉTICA MÉDICA

***ESTUDO DE MUTAÇÕES NO GENE DA CONEXINA 26
COMO CAUSA DA DEFICIÊNCIA
AUDITIVA NEUROSSENSORIAL NÃO SINDRÔMICA***

CAMILA ANDRÉA DE OLIVEIRA

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP) para obtenção do título de Mestre em Ciências Médicas, Área de concentração em Ciências Biomédicas.

ORIENTADORA: Profa. Dra. Edi Lúcia Sartorato (CBMEG)

CO-ORIENTADORA: Profa. Dra. Andréa Trevas Maciel-Guerra (DGM-FCM)

CAMPINAS
2001



UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SEÇÃO CIRCULANTE

UNIDADE Be
CHAMADA :
T/UNICAMP
OL4e
Ex.
OMBO BC/ 96250
ROC. 16-392101
C ☐ D ☒
REC# 12511,00
ATA 13/09/01
CPD

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

CMO0159641-1

Ol4e Oliveira, Camila Andréa
Estudo de mutações no gene da conexina 26 como causa da
deficiência auditiva neurossensorial não síndrômica / Camila Andréa
de Oliveira. Campinas, SP : [s.n.], 2001.

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

1. Surdez. 2. Genes. 3. Mutação. 4. Diagnóstico. I. Edi Lúcia
Sartorato. II. Andréa Trevas Maciel-Guerra. III. Universidade
Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.

Banca examinadora da Dissertação de Mestrado

Orientador: Profa. Dra. Edi Lúcia Sartorato

Membros:

1. Prof. Dr. João Monteiro de Pina Neto - *João M. de Pina Neto*

2. Prof. Dr. Luís Alberto Magna - *[Signature]*

3. Prof. Dra. Edi Lúcia Sartorato - *Edi L. Sartorato*

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

Data: 20.04.2001

Que o respeito a este sentido tão vital - a audição - e a este órgão tão perfeito - o ouvido humano - seja compromisso enquanto vivermos, e não momentâneo.

Russo

[A língua de sinais], nas mãos de seus mestres, é uma língua extraordinariamente bela e expressiva, para a qual, na comunicação uns com os outros e como um modo de atingir com facilidade e rapidez a mente dos surdos, nem a natureza nem a arte lhes concedeu um substituto à altura. Para aqueles que não a entendem, é impossível perceber suas possibilidades para os surdos, sua poderosa influência sobre o moral e a felicidade social dos que são privados da audição e seu admirável poder de levar o pensamento a intelectos que de outro modo estariam em perpétua escuridão. Tampouco são capazes de avaliar o poder que ela tem sobre os surdos. Enquanto houver duas pessoas surdas sobre a face da Terra e elas se encontrarem, serão usados sinais.

J. Schuyler Long

*Aos meus pais, Durval e Inês,
uma benção de Deus que me foi ofertada
- dedico este trabalho*

AGRADECIMENTOS

À Profa. Dra. Edí Lúcia Sartorato pela confiança que me foi atribuída na realização desse trabalho, pela orientação científica e, principalmente pela cumplicidade e amizade durante esses últimos anos;

À Profa. Dra. Andréa Trevas Maciel-Guerra pela co-orientação e atenção oferecida no decorrer desse trabalho e pela gentileza na correção deste manuscrito;

À Nilma (Lab. de Citogenética - DGM) pelo apoio no início de minha formação científica;

Ao Prof. Dr. João Monteiro de Pina Neto e ao Prof. Dr. Luís Alberto Magna por terem, gentilmente, aceito participarem da banca examinadora;

Aos professores e funcionários do CBMEG;

À todos os amigos do laboratório de Genética Humana: Marcela, Bel, Juliana, Daniela, Eliana, Lucy, Junia, Marcelo, Fernanda II, Jair, Osmar, Andrey, André, Lúcio pela amizade, auxílio e por contribuírem direta e indiretamente na minha aprendizagem em Biologia Molecular;

À super Madá, por estar sempre disposta à ajudar, pela descontração e sabedoria;

Às amigas (as ediletes) Fernanda, Heloísa, Fabiana e Elena pelo companheirismo, pelas alegrias, pela força e paciência nos momentos mais difíceis;

Aos meus pacientes, que com certeza sem eles este trabalho não poderia ser realizado;

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pelo apoio financeiro.

À Deus, pelo fortalecimento espiritual e proteção; Aos meus pais, minha irmã Karina e meu irmão Gabriel, pelo imensurável apoio, dedicação e amor, e ao meu pequeno ser, que apesar de ainda não estar no nosso meio, me deu muita força para finalizar esse trabalho.

°C- graus Celsius
μg- micrograma
μl- microlitro
μM- micromolar
μCi- microcurrie
Ci- currie
cm- centímetros
dB - decibéis
DH5α- linhagem da bactéria *E. coli*
DNA- ácido desoxirribonucleico
EDTA- ácido etilenodiaminotetracético
g- gramas
HED- do inglês Hidrotic Ectodermal Dysplasia
LB- meio de cultura Luria-Bertani
M- molar
mA- mili Ampère
mg- miligrama
min- minutos
ml- mililitro
mm- milímetro
mM- milimolar
nm- nanômetro
mmol- milimol
N- normal
ng- nanograma
pb- pares de bases
pmol- picomol
pmoles- picomoles
PPK- do inglês Palmoplantar Keratoderma
rpm- rotações por minuto
seg- segundos
SDS- Dodecil Sulfato de Sódio
Taq- *Thermos aquaticus*
TE- Tris- EDTA
Tm- Temperatura de melting
Tris- tris-(hidroximetil)- aminomenato
U- unidades
V- volts
V/h- volts/hora
W- watts

1- INTRODUÇÃO

1.1- Anatomia e Fisiologia da audição	01
1.2- Aspectos gerais da deficiência auditiva	03
1.3- Prevalência da deficiência auditiva	05
1.4- Genética da deficiência auditiva	06
1.4.1- Deficiência auditiva síndrômica.....	06
1.4.2- Deficiência auditiva não síndrômica	09
1.5- As conexinas e suas funções	11
1.6- A cóclea e os mecanismos <i>gap junctions</i>	15
1.6.1- Células ciliadas e reciclagem de íons potássio (K^+)	16
1.7- Gene GJB2	18
1.8- Mutação 35delG	22
1.9- Outras mutações	25
1.10- Considerações finais	25

2- OBJETIVOS

2.1- Gerais	28
2.2- Específicos.....	28

3- MATERIAL E MÉTODOS

3.1- Casuística	29
3.2- Métodos	31
3.2.1- Extração de DNA genômico de sangue periférico	31
3.2.2- Amplificação do gene GJB2	32
3.2.3- SSCP	34
3.2.4- Detecção da mutação 35delG	37
3.2.4.1- Sequenciamento	37
3.2.4.1.1- Reação utilizando [α^{33} -P] – ddNTPs	38
3.2.4.1.2- Preparo do gel de acrilamida	39

3.2.4.2- Clonagem	40
3.2.4.2.1- Ligação	41
3.2.4.2.2- Transformação	41
3.2.4.2.3- Análise dos clones recombinantes	42
3.2.4.3- PCR alelo específico (AS-PCR)	42
3.2.5- Detecção da mutação 167delT	45
3.2.6- Amplificação e rastreamento de mutações nos genes PAX3 e MITF	46
 4- RESULTADOS	
4.1- Gene GJB2.....	51
4.1.1- Identificação da mutação 35delG.....	54
4.1.2- Identificação da mutação 167delT	55
4.1.3- Análise da sequência codificante do gene GJB2	56
4.1.4- Detecção de polimorfismos	58
4.1.5- Resumo das alterações encontradas.....	58
4.2- Rastreamento dos genes PAX3 e MITF.....	59
 5- DISCUSSÃO	
5.1- Mutações no gene GJB2	61
5.2- Polimorfismos	67
5.3- Pacientes com etiologia não definida	67
5.4- Relevância do diagnóstico molecular	67
5.5- Genes PAX3 e MITF	68
 6- CONCLUSÕES	69
7- SUMMARY	70
8- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	71

Tabela I – Fatores ambientais causadores de diacusia.....	04
Tabela II – Principais causas de deficiência auditiva em crianças, relatadas em cinco instituições brasileira (%)......	05
Tabela III – Idade das crianças com diagnóstico de surdez	06
Tabela IV – Exemplos de síndromes que apresentam deficiência auditiva.....	07
Tabela V – Genes envolvidos nas formas não sindrômicas de surdez.....	11
Tabela VI - Mutações descritas no gene GJB2 em pacientes com surdez não sindrômica	20
Tabela VII - Alteração no quadro de leitura da proteína Cx26 na presença da mutação 35delG	23
Tabela VIII - Frequência de heterozigotos 35delG em alguns países da Europa.....	24
Tabela IX - Frequência de heterozigotos 35delG em algumas populações.....	24
Tabela X - Famílias e indivíduos com deficiência auditiva.....	30
Tabela XI - Sequência de <i>primers</i> para a amplificação do gene GJB2	33
Tabela XII - Sequência de <i>primers</i> utilizados para detecção da mutação 35delG	44
Tabela XIII - Sequência de <i>primers</i> utilizados para a amplificação do gene MITF	47
Tabela XIV - Sequência de <i>primers</i> utilizados para a amplificação do gene PAX3	48
Tabela XV - Genótipos encontrados no gene GJB2 das famílias estudadas.....	52
Tabela XVI - Fenótipo e genótipos dos pacientes com mutação no gene GJB2	59

Figura 1 - Estrutura do ouvido humano.....	01
Figura 2 - Representação esquemática da proteína conexina (Cx26) e localização de algumas mutações.....	13
Figura 3 - Diagrama da <i>gap junction</i> . (a) Membrana de duas células adjacentes. (b) Estrutura de um <i>conexon</i>	13
Figura 4 - Estrutura do ouvido interno (cóclea e aparelho vestibular).....	15
Figura 5 - Representação esquemática de uma célula ciliada.....	17
Figura 6 - Reciclagem de íons potássio na endolinfa.....	18
Figura 7 - Ciclos utilizados na amplificação do gene GJB2	34
Figura 8 - Ciclos utilizados no sequenciamento dos genes GJB2 , PAX3 e MITF	39
Figura 9 - Representação esquemática da técnica de AS-PCR	43
Figura 10 - Ciclos utilizados na reação de AS-PCR	45
Figura 11 - Representação esquemática da análise de restrição da mutação 167delT no gene GJB2	46
Figura 12 - Ciclos utilizados na amplificação dos exons do gene MITF	48
Figura 13 - Ciclos de amplificação dos exons 6 e 8 do gene PAX3	49
Figura 14 - Ciclos de amplificação dos exons 2, 3, 4, 5A, 5B e 7 do gene PAX3	50
Figura 15 - Gene GJB2 amplificado na reação de PCR.....	51
Figura 16 - AS-PCR para mutação 35delG	54
Figura 17 - Gel de sequenciamento ilustrando a sequência normal na região da mutação 35delG , e a mutação 35delG em homozigose e em heterozigose.....	55
Figura 18 - Análise da mutação 167delT por digestão enzimática.....	56
Figura 19 - Análise da sequência de DNA do gene GJB2 ilustrando as mutações V95M e V37L	57
Figura 20 - Sequenciamento de DNA do gene GJB2 ilustrando as mutações 35delG e delE120	57
Figura 21 - Gel de sequenciamento ilustrando o polimorfismo V27I	58
Figura 22 - Gel de poliacrilamida com diferentes padrões de migração de bandas - técnica de SSCP	60

Figura 23 - Gel de sequenciamento do gene **PAX3**, ilustrando uma mutação silenciosa....60

Figura 24 - Mutações descritas neste trabalho.....62

Segundo dados da Organização Mundial de Saúde (OMS), 10% da população mundial apresenta algum tipo de problema auditivo e esta prevalência aumenta com a idade. Não há dados oficiais da prevalência da deficiência auditiva no Brasil. Em países desenvolvidos a deficiência auditiva está presente em cerca de 1 em cada 1.000 crianças, estimando-se que 60% dos casos de surdez pré-lingual isolada tenham bases genéticas. Embora no Brasil a maioria dos casos ainda sejam devidos a fatores ambientais, a proporção de casos de origem genética tende a aumentar com a melhoria na saúde pública. Até o momento já foram clonados 16 genes que causam deficiência auditiva não sindrômica de herança autossômica recessiva (NSRD). O gene **GJB2**, que determina a produção da proteína conexina 26 (**Cx26**), foi o primeiro a ser associado a NSRD, e mutações nesse gene são a principal causa genética de surdez no ser humano. A conexina 26 está envolvida na formação de *gap junctions*, canais de comunicação intercelular necessários à produção de potenciais de ação e que estão presentes em células da cóclea. Mutações no gene **GJB2** vêm sendo detectadas em várias populações; uma delas, a **35delG**, é particularmente freqüente entre Caucásios do sul da Europa. A freqüência de heterozigotos para essa mutação foi recentemente estimada em recém-nascidos de uma região próxima a Campinas como sendo de 0,97%. Neste trabalho foi realizada a análise do gene **GJB2** em 39 famílias com surdez não sindrômica, tanto familiar quanto esporádica, a fim de determinar a freqüência e o tipo de mutações nesses pacientes. Em 36 casos-índice (grupo A) foi realizada uma avaliação clínica prévia para excluir ao máximo a possibilidade de uma origem ambiental. Dados clínicos e moleculares de outros três pacientes surdos com mutação na **Cx26** previamente diagnosticados (grupo B) também foram considerados. Mutações no gene **GJB2** foram identificadas em 8 das 36 famílias do grupo A (22%), incluindo metade dos 10 pacientes com surdez familiar e 3 dos 26 casos isolados (11,5%). A mutação **35delG** foi encontrada em 84,2% (16/19) dos alelos mutados. Três outras mutações foram observadas: **V95M**, **V37I** e **delE120**. Seis pacientes eram homozigotos para a mutação **35delG**, 2 heterozigotos compostos e 3 heterozigotos, ou seja, foi encontrado somente um alelo mutado. O polimorfismo **V27I** foi encontrado em dois casos esporádicos. Esses resultados indicam que em nossa região, assim como vem sendo observado em outras populações, mutações na conexina 26 sejam a principal causa de surdez de origem genética. Assim sendo, devem ser pesquisadas tanto em casos hereditários quanto, principalmente, em casos esporádicos de origem indefinida, de modo a possibilitar o aconselhamento genético e o diagnóstico precoce de novos casos que venham a surgir nessas famílias.

1- INTRODUÇÃO

1.1- Anatomia e Fisiologia da audição

O ouvido humano é formado por três partes distintas: externa, média e interna (figura 1). O ouvido externo capta o som e o médio o transmite para o ouvido interno, onde o som é processado. O ouvido externo consiste em aurícula e canal auditivo externo, o qual transfere o som 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. Esta parte do ouvido, 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. É uma estrutura complexa que requer um grande repertório de genes para orquestrar o processamento do som e a função vestibular em muitos níveis, incluindo inervação neuronal, integridade estrutural, e transdução mecanoelétrica (HUDSPETH, 1989).

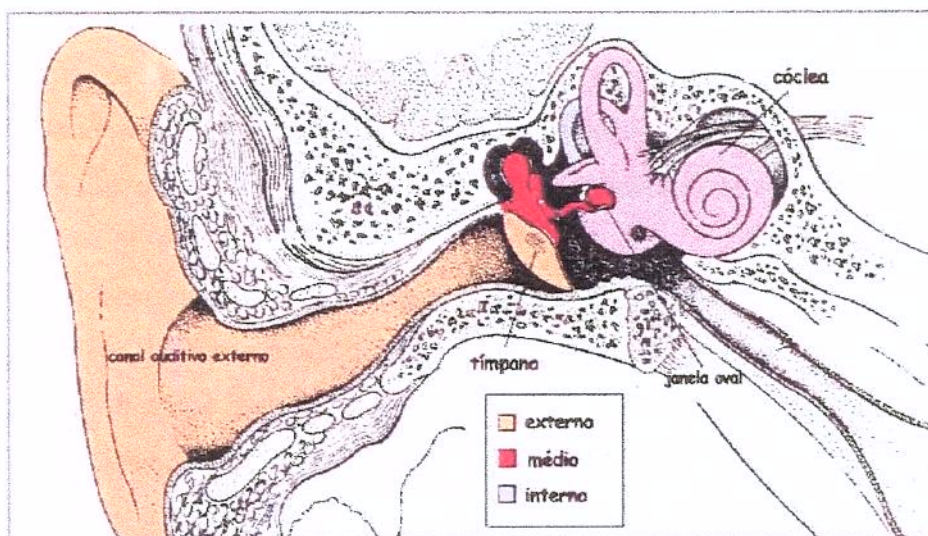


Figura 1 - Estrutura do ouvido humano.

A cóclea é um sistema de três tubos enrolados lado a lado: o canal vestibular, o canal médio, e o canal timpânico. A escala vestibular e a escala média estão separadas pela membrana de Reissner (também chamada de membrana vestibular); o canal timpânico e o canal médio estão separados pela membrana basilar. Na superfície da membrana basilar está localizado o órgão de Corti, que contém células ciliadas eletromecanicamente sensíveis. Estas células são os receptores terminais que geram impulsos nervosos em resposta às vibrações dos sons (GUYTON *et al.*, 1996; ALBERTS *et al.*, 1989).

As vibrações dos sons entram no canal vestibular a partir da platina do estribo na janela oval. Esta platina recobre a janela oval, que tem suas bordas conectadas por um ligamento anular relativamente frouxo, de modo a se deslocar para dentro e para fora com as vibrações sonoras. O movimento para dentro faz com que o líquido se desloque para dentro do canal vestibular e no canal médio, e o movimento para fora faz com que o líquido se desloque para trás (ALBERTS *et al.*, 1989).

A membrana basilar é uma membrana fibrosa que, como já foi dito, separa o canal médio do canal timpânico. Contém 20.000 a 30.000 fibras basilares que se projetam do centro ósseo da cóclea, o modíolo, em direção à parede externa. Estas fibras são estruturas semelhantes a juncos fortes e elásticos, fixadas por suas extremidades basais na estrutura óssea central da cóclea, mas livres nas suas extremidades distais, exceto por estas extremidades distais estarem incluídas na frouxa membrana basilar. Como as fibras são fortes e livres em uma das extremidades, elas podem vibrar (ALBERTS *et al.*, 1989).

O órgão de Corti é o órgão receptor que gera impulsos nervosos em resposta à vibração da membrana basilar. O órgão de Corti fica sobre a superfície das fibras basilares e da membrana basilar. Os verdadeiros receptores sensoriais no órgão de Corti são dois tipos de células pilosas: uma única fileira de células ciliadas internas, perfazendo cerca de 3.500 unidades e medindo em torno de 12 mm de diâmetro, e três a quatro fileiras de células ciliadas externas, perfazendo cerca de 12.000 e tendo diâmetro de apenas 8 mm. As bases e os lados das células ciliadas fazem sinapse com uma rede de terminações nervosas cocleares. Entre 90 e 95% destas terminações encontram-se sobre as células ciliadas

internas, o que enfatiza a importância especial destas para a detecção do som. As fibras nervosas a partir destas terminações dirigem-se para o gânglio espiral de Corti, que fica no modíolo da cóclea. O gânglio espiral, por sua vez, manda axônios – um total de cerca de 30.000 – para o nervo coclear e, depois, para dentro do sistema nervoso central ao nível superior do bulbo (ALBERTS *et al.*, 1989; KALATZIS & PETIT, 1998).

Todas as funções sensoriais do ouvido interno dependem da recepção mecânica, ou seja, da detecção de pequenos movimentos produzidos por forças que atuam em torno das células sensoriais do ouvido. Estes movimentos são oscilações rápidas, no caso do som, e movimentos mais lentos no caso da gravidade e aceleração. Todas as células responsáveis pelos diversos tipos de recepção mecânica do ouvido têm uma forma similar e característica determinada pela presença de estereocílios.

1.2- Aspectos gerais da deficiência auditiva

A deficiência auditiva é um dos distúrbios sensoriais humanos mais comuns e pode se manifestar em qualquer faixa etária, podendo ser devida a causas genéticas ou adquirida por fatores ambientais. Entre os fatores ambientais que contribuem para a deficiência auditiva estão meningite, infecções congênitas (rubéola e citomegalovírus), uso de determinados medicamentos durante a gestação, tocotraumatismo e complicações perinatais, como *kernicterus* (KALATZIS & PETIT, 1998). A tabela I mostra alguns fatores ambientais de disacusia, em algum estágio do desenvolvimento.

Tabela I – Fatores ambientais causadores de disacusia.

Pré-Natal	Infecção materna (rubéola, citomegalovírus, sífilis, etc)
	Terapia materna com drogas ototóxicas
	Irradiação (raios-X) durante gestação
Peri-Natal	Icterícia
	Trauma de parto
	Anóxia
Pós-Natal	Otites
	Meningite
	Sarampo
	Caxumba
	Traumatismos

A perda da audição pode ser classificada com relação à localização do defeito: condutiva, quando a anomalia afeta o ouvido médio ou externo; neurosensorial (perceptiva ou neural), em que as anomalias estão situadas entre os receptores do ouvido interno e as regiões auditivas do cérebro; ou ainda mista, quando há combinação de ambos os defeitos. Pode ainda ser classificada de acordo com o grau de perda: leve, correspondendo a perda de 27-40dB; moderada (41-55dB); moderada a grave (56-70dB); grave (71-90dB) e profunda (>90dB). É denominada pré-lingual quando está presente ao nascimento ou antes da aquisição da linguagem, e pós-lingual quando se apresenta após a aquisição da linguagem. Finalmente, a perda de audição pode estar associada a outras anomalias congênitas (síndrômica) ou ser o único defeito observável (não síndrômica ou isolada) (GUILFORD *et al.*, 1994; KALATZIS & PETIT, 1998).

Em muitos casos é difícil estabelecer a origem da deficiência auditiva neurosensorial. Isso se deve a sua grande diversidade etiológica, e também ao fato do ouvido interno ser inacessível a procedimentos diagnósticos discriminantes.

1.3- Prevalência da deficiência auditiva

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

Em países desenvolvidos, a prevalência da deficiência auditiva na infância é estimada em 1/1000, variando de 0,8 a 2/1000 em diferentes áreas do mundo industrializado, sendo que entre as crianças com déficit permanente de audição cerca de 90% apresentam distúrbios neurossensoriais, 5% de condução e 5% mistos (PARVING & HAUCH, 1994). Estima-se que 60% dos casos de surdez pré-lingual tenham bases genéticas (MURGIA *et al.*, 1999). Além disso, 1/1000 crianças tornam-se surdas após a aquisição da linguagem, ou seja, no período pós-lingual, formas essas que são freqüentemente menos graves e progressivas (CARRASQUILHO *et al.*, 1997).

No Brasil, a surdez de causa ambiental é predominante (67%), sendo a proporção de casos de surdez hereditária de 15%, os casos de etiologia não esclarecida de 18,5% (SIMÕES & MACIEL-GUERRA, 1992). A tabela II ilustra algumas das principais causas de surdez observadas na população brasileira em cinco diferentes centros do estado de São Paulo.

Tabela II – Principais causas de deficiência auditiva em crianças, relatada em cinco instituições do estado de São Paulo (%).

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

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

A predominância acentuada dos casos de etiologia ambiental reflete as condições médico-sanitárias da população, de cuja melhoria depende a profilaxia da deficiência auditiva em nosso meio. É importante levar em consideração ainda o diagnóstico tardio da surdez em crianças em nosso meio, o que dificulta ainda mais a determinação da etiologia da deficiência auditiva. A tabela III mostra a idade de diagnóstico da surdez em crianças em um estudo realizado na Universidade de São Paulo (USP) em 1992.

Tabela III – Idade das crianças com diagnóstico de surdez.

Idade (meses)	(%)
0-12	6,52
13-24	20,82
25-48	45,82
49-144	39,94

Em países desenvolvidos, a diminuição acentuada das causas ambientais de doenças tem aumentado a importância relativa das doenças genéticas. No Brasil, porém, o excesso de casos ambientais deve ser considerado com relação à estimativa do risco da repetição.

1.4- Genética da deficiência auditiva

A surdez hereditária pode se apresentar de forma isolada ou associar-se a outras anomalias congênitas, entre as quais malformações crânio-faciais ou cervicais, displasias esqueléticas, anomalias cutâneas ou oculares, doenças neurológicas, e disfunções renais ou metabólicas. Aproximadamente 30% dos casos de deficiência auditiva pré-lingual geneticamente determinada são síndrômicos e 70% não síndrômicos (PARKER *et al.*, 1999).

1.4.1- Deficiência auditiva síndrômica

Mutações em genes responsáveis por quadros síndrômicos associados a surdez neurosensorial vêm sendo identificadas frequentemente. Acredita-se que existam mais de

400 síndromes genéticas onde a surdez seja uma das características. A tabela IV mostra algumas dessas síndromes, nas quais a disacusia é considerada uma característica relevante.

Tabela IV – Exemplos de síndromes que apresentam deficiência auditiva.

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

Apesar do grande número de síndromes que podem associar deficiência auditiva a outros sinais clínicos, a Síndrome de Waardenburg (SW) merece especial atenção, uma vez que esta apresenta grande heterogeneidade clínica. Alguns indivíduos com SW apresentam surdez de forma aparentemente isolada, podendo-se confundir com as formas não sindrômicas de surdez (GUILFORD *et al.*, 1994).

A Síndrome de Waardenburg (SW) apresenta padrão de herança autossômico dominante, e manifesta-se clinicamente por deficiência auditiva e hipopigmentação de cabelos, pele e íris. Principalmente nos tipos I e II da SW, nos quais estão envolvidos, respectivamente os genes **PAX3** e **MITF**, a inconsistência do quadro clínico decorrente da expressividade variável pode obscurecer o diagnóstico (WATANABE *et al.*, 1998).

Os genes **PAX3** e **MITF**, localizados nas regiões cromossômicas 2q35 e 3p14-12.3, respectivamente, estão associados a processos de melanogênese. Tais genes estão

envolvidos nos primeiros estágios de desenvolvimento das células da crista neural para manutenção do melanócito. São expressos no tubo neural dorsal, do qual células da crista neural emergem, e podem ser responsáveis pelo controle da diferenciação celular da crista neural em melanócitos (HOLME & STEEL, 1999). Defeitos nos genes **PAX3** e **MITF** (*microphthalmia - associated transcription factor*) podem levar a surdez devido ao fato das células da estria vascular da cóclea serem derivadas da crista neural. Esses genes e alguns outros estão, portanto, na categoria de genes envolvidos em doenças de audição-pigmentação. Embora a deficiência auditiva e a heterocromia de íris sejam os indicadores mais importantes para o diagnóstico da SW, em muitos casos pode ser difícil determinar se a surdez é decorrente da SW ou tem outra origem (WATANABE *et al.*, 1998).

A síndrome de Usher, por sua vez, é caracterizada por deficiência auditiva associada com retinite pigmentosa, possui padrão de herança autossômico recessivo, e é clinicamente e geneticamente heterogênea. É a mais freqüente causa de surdo-cegueira em humanos, sendo responsável por aproximadamente 5% de todas as causas de surdez congênita. Alguns pacientes com síndrome de Usher apresentam anormalidades na organização dos microtúbulos nos axônios das células fotoreceptoras, células ciliadas nasais, e também degeneração do órgão de Corti (WEIL *et al.*, 1995).

Fenotipicamente, existem 3 tipos de síndrome de Usher: I, II e III; o tipo I apresenta deficiência auditiva congênita profunda, arreflexia vestibular e retinite pigmentosa (**RP**); tipo II, perda auditiva leve para tons baixos e grave para tons altos, resposta vestibular normal, e RP; deficiência auditiva progressiva, problemas vestibular variáveis, e RP estão associados com síndrome de Usher tipo III. Pelo menos 3 diferentes genes são responsáveis pelo mais grave tipo de síndrome de Usher, o tipo I. Estes genes estão localizados na região cromossômica 11q14 (**USH1B**), 11p (**USH1C**), e 14q (**USH1A**). O subtipo 1B é o mais comum, correspondendo a 70-80% de todos os casos de Usher (WESTON *et al.*, 1996).

A descoberta de mutações em duas miosinas não convencionais, as quais estão associadas ao fenótipo de surdez com padrão de herança autossômico recessivo em camundongos, foi de extrema importância para o estudo molecular da etiologia genética da

deficiência auditiva. No camundongo *waltzer*, a mutação está no gene da miosina 6, e no *shaker-1* na miosina 7A (GIBSON *et al.*, 1995). Em humanos, mutações na miosina 7A são responsáveis por USH1B (WEIL *et al.*, 1995).

O camundongo *shaker-1* apresenta surdez mas não cegueira; sendo assim, suspeitou-se que o gene humano da miosina 7A (**MYO7A**), localizado na região cromossômica 11q14, poderia ser responsável também por outros casos de surdez, o que foi confirmado pelo grupo de BROWN (LIU *et al.*, 1997a).

Mais tarde, esse mesmo grupo demonstrou que mutações no gene da miosina 7A também podem causar surdez não síndrômica pós-lingual, de herança autossômica dominante (**DFNA11**). Desta forma, esses estudos indicam que o gene **MYO7A** está envolvido em um amplo espectro de manifestações da surdez (LIU *et al.*, 1997b).

A variabilidade de manifestações de mutações no gene **MYO7A**, resultando em formas de surdez síndrômica e não síndrômica, pode ser explicada pela heterogeneidade alélica ou pela influência do *background* genético. Assim, uma variação nos padrões de expressão do gene levaria à variação observada no fenótipo entre Usher e surdez não síndrômica, com herança recessiva ou dominante. Portanto, o claro envolvimento desse gene em ambas as formas recomenda um rastreamento de mutações no **MYO7A** (CHEN *et al.*, 1996).

1.4.2- Deficiência auditiva não síndrômica

A surdez não síndrômica é quase exclusivamente monogênica e altamente heterogênea. Estima-se que mais de 100 genes possam estar envolvidos na sua determinação (GUILFORD, 1994). São vários os padrões de herança: recessivo ligado ao cromossomo X (DFN) em 1-3% dos casos, autossômico dominante (DFNA) em 15%, e autossômico recessivo (DFNB) na grande maioria (80%). Além disso, existem casos com herança materna devidos a mutações em genes mitocondriais (2%) (KALATZIS & PETIT, 1998).

PREZANT e colaboradores (1993) sugeriram que uma mutação específica (**A1555G**) no gene mitocondrial 12S rRNA poderia ser o fator de suscetibilidade genética que provoca a deficiência auditiva em indivíduos que fazem uso de antibióticos aminoglicosídicos. No estudo, FISCHER-GHODSIAN (1999) observou que de fato, 17 a 33% dos pacientes com surdez que haviam sido tratados com aminoglicosídicos carregam a mutação **A1555G**.

Estima-se que haja até 150 diferentes *loci* genéticos envolvidos na deficiência auditiva não sindrômica recessiva (NSRHL). Com base no mecanismo de herança, idade de início, gravidade e características audiológicas, GORLIN (1995) foi capaz de distinguir mais de 20 tipos de surdez não sindrômica. Até o momento, aproximadamente 77 *loci* foram mapeados, 39 para as formas autossômicas dominantes (DFNA), 30 para as recessivas (DFNB), 8 ligados ao cromossomo X (DFN). Dentre os *loci* mapeados, foram clonados 16 genes nucleares e 2 mitocondriais.

Três desses genes (GJB2, GJB3 e GJB6) codificam proteínas chamadas conexinas (conexina 26, 30 e 31, respectivamente) e estão envolvidos tanto em formas recessivas como dominantes de surdez (<http://www.iro.es/cx26-deaf.html>). No *locus* DFNB1 de surdez neurosensorial não sindrômica presente na região cromossômica 13q12, foi localizado o gene da conexina 26 (**GJB2**) (KELSELL *et al.*, 1997). Inicialmente identificados em famílias do Mediterrâneo e Paquistão, acredita-se hoje que seja o principal gene responsável pela surdez neurosensorial congênita (GASPARINI *et al.*, 2000). O gene **GJB2** foi o primeiro a ser identificado como responsável por surdez neurosensorial não sindrômica de padrão autossômico recessivo; a partir de então, muitos outros genes envolvidos no fenótipo da surdez neurosensorial não sindrômica foram clonados e estão sendo estudados (Tabela V) (<http://dnalab-www.uia.ac.be/dnalab/hhh/>).

Tabela V - Genes envolvidos nas formas não sindrômicas de surdez.

Gene	Locus	Forma	Localização	Referência
POU3F4	DFN3	Ligada ao X	Xq21.1	DE KOK <i>et al.</i> , 1995.
GJB2 (Cx26)	DFNB1	Autossômica recessiva	13q12	KELSELL <i>et al.</i> , 1997.
	DFNA3	Autossômica dominante	13q12	DENOYELLE <i>et al.</i> , 1998.
DFNA5	DFNA5	Autossômica dominante	7p15	VAN LAER <i>et al.</i> , 1998.
TECTA	DFNB21	Autossômica recessiva	11q23-25	MUSTAPHA <i>et al.</i> , 1999
	DFNA8/12	Autossômica dominante	1q22-24	VERHOEVENET <i>et al.</i> , 1998.
OTOF	DFNB9	Autossômica recessiva	2p22-23	YASUNAGA <i>et al.</i> , 1999.
MYO15	DFNB3	Autossômica recessiva	17p11.2	WANG <i>et al.</i> , 1998.
DIAPH1	DFNA1	Autossômica dominante	5q31	LYNCH <i>et al.</i> , 1997.
COCH	DFNA9	Autossômica dominante	14q12-13	ROBERTSON <i>et al.</i> , 1998.
KCNQ4	DFNA2	Autossômica dominante	1p34	KUBISCH <i>et al.</i> , 1999.
POU4F3	DFNA15	Autossômica dominante	5q31	VAHAVA <i>et al.</i> , 1998.
MYO7A	DFNB2	Autossômica recessiva	11q13.5	WEIL <i>et al.</i> , 1995.
	DFNA11	Autossômica dominante	11q12.3-21	LIU <i>et al.</i> , 1997b.
PDS	DFNB4	Autossômica recessiva	7q31	LI <i>et al.</i> , 1998.
GJB3 (Cx31)	DFNA2	Autossômica dominante	1p35.1	XIA <i>et al.</i> , 1998.
GJB6 (Cx30)	DFNA3	Autossômica dominante	13q12	GRIFA <i>et al.</i> , 1999
TMPRSS3	DFNB10	Autossômica recessiva	21q22.3	SCOTT <i>et al.</i> , 2001
COL11A2	DFNA13	Autossômica dominante	6p21	MCGUIRT <i>et al.</i> , 1999

1.5- As conexinas e suas funções

A conexina 26 (Cx26) é um tipo de beta conexina, também chamada **GJB2** (*gap junction protein*, beta-2). Em termos evolucionários, as conexinas podem ser agrupadas em pelo menos três subfamílias - α , β , γ . Entretanto, a nomenclatura mais comum é baseada no peso molecular da proteína, isto é, Cx26 (GJB2), Cx30 (GJB6), Cx31(GJB3), Cx32 (GJB1), Cx43 (α 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, variabilidade eritodérmica; e GJB1, neuropatia periférica), quanto não síndrômica (GJB2, GJB3 e GJB6) (RABIONETE *et al.*, 2000). Os genes das conexinas possuem uma arquitetura comum, com 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 4 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) (figura 2). Seis moléculas de conexinas se agrupam para formar um *conexon*, o qual une-se com células vizinhas equivalentes para formar o canal *gap junction* (comunicação intercelular entre células vizinhas) (figura 3). Um *conexon* é composto de um único tipo de conexina, podendo se unir com *conexons* de outros tipos de conexinas formando, assim, um canal heterotípico. São exceções os *conexons* da conexina 31 (Cx31) que somente formam canais funcionais quando unidos com *conexons* da mesma proteína, ou seja, da Cx31 (STEEL, 1998).

Os dois *loops* extracelulares das proteínas conexinas são estruturas críticas para a união dos hemicanais (*conexons*) na formação de um canal funcional. Três cisteínas, conservadas em todas as espécies de conexinas, 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 conexinas para formar canais heterotípicos funcionais (FOOTE *et al.*, 1998). A composição dos aminoácidos e o tamanho do *loop* citoplasmático são bastante variáveis entre as conexinas, e é nessa região que os polimorfismos são mais freqüentemente detectados em algumas dessas proteínas (KRUTOVSKIKH & YAMASAKI, 2000).

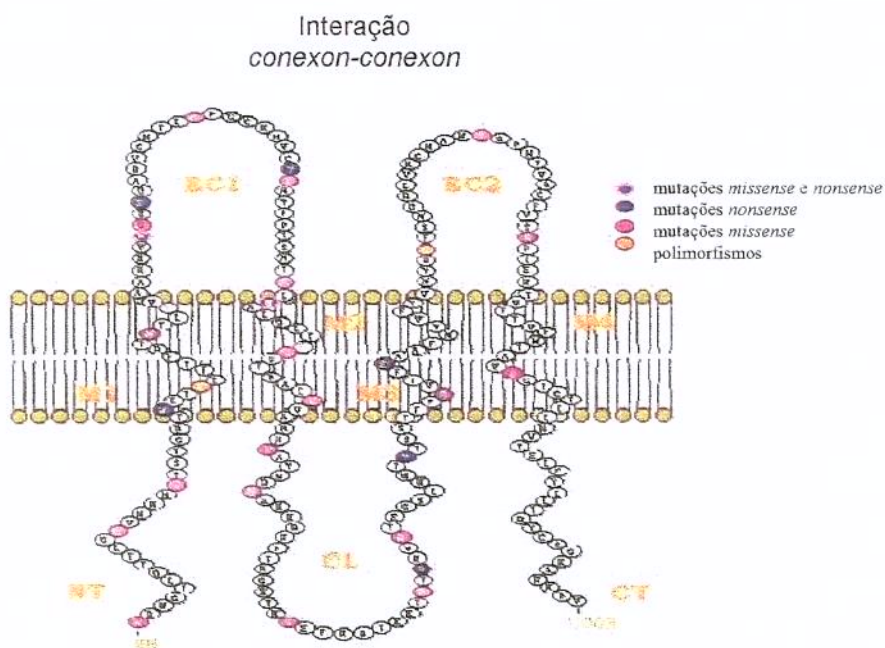


Figura 2 - Representação esquemática da proteína conexina (Cx26) e localização de algumas mutações.

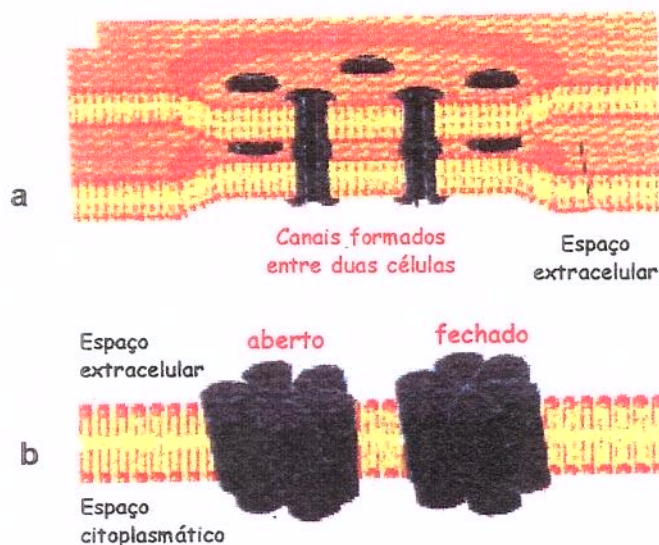


Figura 3 – Diagrama da *gap junction*. (a) Membrana de duas células adjacentes. (b) Estrutura de um *conexon*.

Mutações no terceiro domínio transmembrânico (M3) levam a perda da função de transporte intracelular. Os *conexons* são formados, mas o transporte é prejudicado devido ao ligamento incorreto entre dois *conexons* ou à incapacidade de formação de uma *gap junction* funcional entre eles. A identificação de várias mutações associadas com deficiência auditiva na mesma região do domínio M3 de três genes de conexinas (**Cx26**, **Cx31** e **Cx32**), sugere que este domínio é importante para o funcionamento das proteínas, e que desenvolve um papel vital na formação dos *conexons* nas células do ouvido interno (LIU, *et al.*, 2000).

Os mecanismos de *gap junctions* (comunicação intercelular entre células vizinhas) permitem a transmissão rápida de pequenas moléculas e íons e facilitam a produção 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 também possuir funções não diretamente relacionadas com as *gap junctions* da comunicação intercelular. Recentes experimentos em transfecção revelaram que a capacidade das proteínas conexinas regular a expressão dos genes que controlam o crescimento, a diferenciação celular e a supressão da tumorigenicidade não está necessariamente correlacionada com a capacidade das células se comunicarem via *gap junctions* (KRUTOVSKIKH & YAMASAKI, 2000).

Experiências em modelos animais demonstraram que a ausência de determinados genes das conexinas podem ter conseqüências biológicas completamente diferentes. Foi revelado que alguns desses genes são críticos para o desenvolvimento embrionário e outros estão envolvidos na etiologia de certas doenças. Desta maneira, a ausência da **Cx26** em camundongos é incompatível com a formação embrionária devido ao transporte transplacentário reduzido de glicose (GABRIEL *et al.*, 1998). Da mesma forma, a falta da **Cx43** leva a graves malformações cardíacas; várias outras conexinas são menos importantes para o desenvolvimento embrionário, porém possuem funções mais específicas (JUNEJA *et al.*, 1999).

1.6- A cóclea e os mecanismos *gap junctions*

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 (figura 4). Como responsável pela audição, a cóclea utiliza-se aproximadamente de 16.000 células sensoriais ciliadas que dependem, para seu bom funcionamento, de despolarização da membrana celular e transdução mecanoelétrica, liberação e transporte de íons, entre outros eventos (AVRAHAN, 1997).

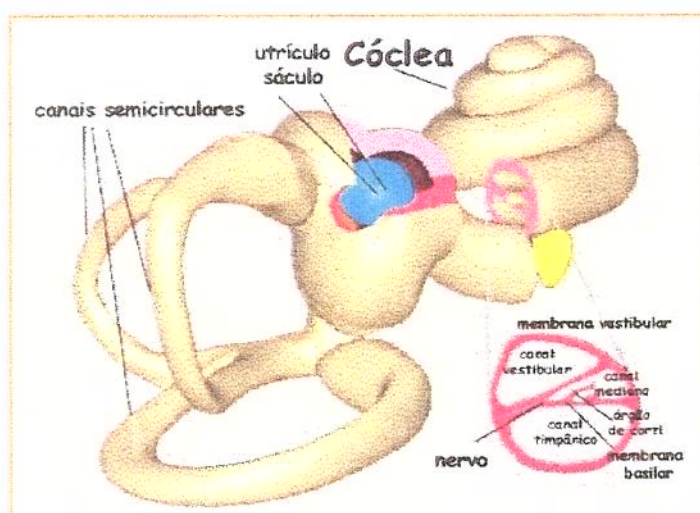


Figura 4 - Estrutura do ouvido interno (cóclea e aparelho vestibular).

Na cóclea, as *gap junctions* existem entre as células de suporte das células ciliadas, podendo formar um caminho para reciclagem dos íons K^+ para a transdução da audição, levando a um influxo endolinfático desses íons com despolarização da membrana celular (KIKUCHU *et al.*, 1995; AVRAHAN, 1997). Acredita-se que as *gap junctions* tenham um papel na reciclagem dos íons K^+ da endolinfa do ducto coclear após a estimulação das células sensoriais ciliadas; anomalias da conexina 26 levariam a um distúrbio desse fluxo de íons K^+ , levando a perda da audição (KELSELL *et al.*, 1997).

As *gap junctions* são numerosas na cóclea e na porção vestibular, onde a **Cx26** é uma das principais conexinas expressas. Um trabalho realizado por MARTIN (1999) demonstra que mutações nos domínios transmembrânicos das proteínas conexinas

influenciam na união das *gap junctions*. A comprovação foi feita por meio de sistemas de expressão *in vitro*, em que vetores de conexinas mutadas e selvagens foram construídos e transfectados em células HeLa deficientes de comunicação para obter expressões transitórias de proteínas conexinas. Uma vez que estas células não podem se comunicar, elas não transferem o corante fluorescente (*Lucifer yellow*) aos cruzamentos de *gap junctions* vizinhos, permitindo, assim, que se investigue a influência de mutações sobre a formação de *gap junctions* em canais intercelulares.

Diferentes mutações segregando de forma autossômica recessiva no gene **GJB2** têm sido associadas a surdez hereditária não sindrômica. Isto indica que as *gap junctions* são importantes para a função coclear. Inúmeras *gap junctions* estão presentes entre as células de suporte, tanto no aparelho vestibular como no epitélio sensorial do ouvido interno. A conexina 26 (**Cx26**) é altamente expressa no aparelho vestibular, assim como a **Cx32** nas células de suporte. No órgão de Corti da cóclea a **Cx26** é a conexina predominante. As *gap junctions* estão presentes entre os fibrócitos no ligamento espiral que circula a estria vascular, e entre esses fibrócitos e as células da estria basal. Durante o desenvolvimento coclear, a formação inicial e o subsequente aumento do tamanho e número de *gap junctions* na estria vascular coincidem com a geração inicial e o aumento do potencial endonuclelar. Estas e outras evidências sugerem que o papel das *gap junctions* na cóclea é o de propiciar um caminho para a passagem de íons para sustentar a endolinfa e, conseqüentemente, a audição. Mutações na conexina 26 (**Cx26**) poderão, portanto, interromper esta circulação de íons resultando em surdez (FORGE *et al.*, 1999).

1.6.1- Células ciliadas e reciclagem de íons potássio (K^+)

É clara a importância das células sensoriais ciliadas do ouvido interno na audição. Essas células possuem uma variedade de projeções, como se fossem dedos, em sua porção apical, denominadas esterílios (figura 5). Os esterílios mais altos conseguem tocar a membrana tectórica (gel extracelular). Quando vibrações chegam até a cóclea, a membrana tectórica e as células ciliadas movimentam-se sobre diferentes pontos, fazendo com que os

estereocílios se dobrem levando à despolarização das células ciliadas e à atividade sináptica (STEEL, 2000a).

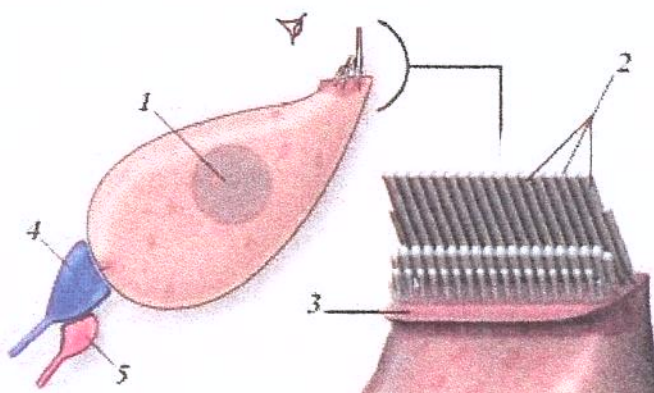


Figura 5 - Representação esquemática de uma célula ciliada. (1) núcleo; (2) estereocílios; (3) membrana cuticular; (4) nervo auditivo; (5) vaso eferente lateral.

A cóclea é o órgão que abriga as células sensoriais ciliadas responsáveis pela transdução das ondas sonoras em impulsos elétricos. Os estereocílios que estão presentes na superfície dessas células projetam-se na cavidade preenchida com um fluido chamado endolinfa (figura 6). Quando as ondas sonoras alcançam o ouvido interno, os estereocílios se defletem causando a abertura de canais vizinhos. Os íons potássio fluem através da endolinfa e entram através das células ciliadas, despolarizando as membranas celulares e iniciando os sinais elétricos que são propagados ao longo do nervo auditivo para o cérebro. A concentração de cátions na endolinfa é balanceada, tal que a concentração de íons K^+ é alta e a de Na^+ é baixa. MINOWA e colaboradores (1999) relataram que uma anormalidade nas células fibróticas cocleares que reciclam o K^+ contribui para o déficit auditivo em modelo animal e em uma forma de surdez humana.

A reciclagem de K^+ no ducto coclear parece ser muito importante para a audição. Pelo menos seis das muitas proteínas associadas com surdez em humanos e camundongos estão provavelmente envolvidas na reciclagem do K^+ (figura 6). A reciclagem dos íons K^+ é feita pelos mecanismos de *gap junctions*, e quando os genes envolvidos no processo sofrem mutações levam às formas hereditárias de surdez em humanos. Uma proteína co-

transportadora de Na-K-Cl expressa na membrana basolateral das células marginais faz parte da maquinaria da bomba de K^+ em altos níveis. Mutações no co-transporte levam a uma falha na produção da endolinfa em camundongos. As células ciliadas da cóclea são receptores sensoriais regulados que dependem, para sua sobrevivência, de uma manutenção apropriada do meio. Mutações em uma das muitas proteínas que mantêm esse ambiente resultam em uma perda gradual de células ciliadas funcionais levando a surdez progressiva e eventualmente em morte celular (STEEL, 1999a).

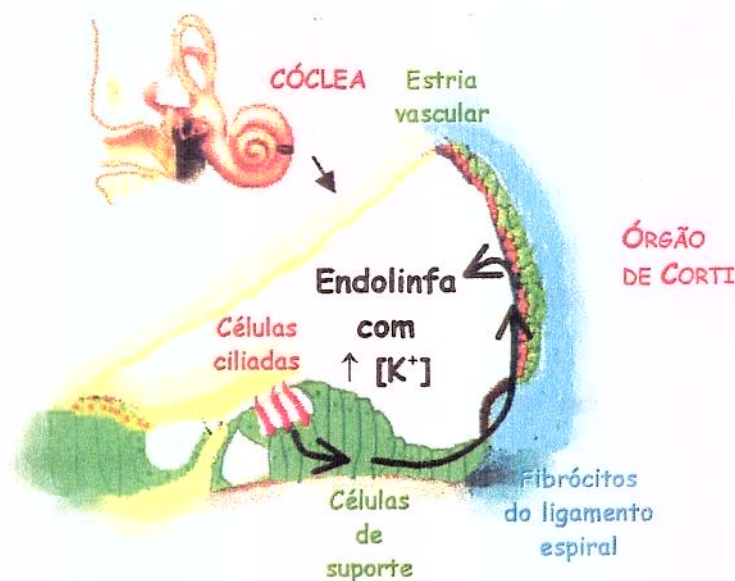


Figura 6 - Reciclagem de íons potássio na endolinfa.

1.7- Gene *GJB2*

As descobertas mais importantes até o momento no estudo molecular da deficiência auditiva referem-se às mutações observadas no gene da conexina 26 (**GJB2**), que se revelaram como a origem mais frequente da surdez de herança autossômica recessiva. KELSELL e colaboradores (1997) estavam inicialmente estudando uma família que apresentava ceratoderma palmoplantar (**PPK**- calosidade anormal nas plantas dos pés e palmas das mãos) e surdez neurosensorial congênita, ambos os sinais segregando em uma mesma família. Por meio da avaliação clínica, presumiu-se que provavelmente a **PPK** não estava associada à surdez. Estudos de ligação indicaram o envolvimento da região 13q11-

12 no fenótipo, onde três *loci* tinham sido localizados: o da surdez não síndrômica autossômica recessiva (**DFNB1**), surdez não síndrômica autossômica dominante (**DFNA3**) e doença de Clouston (displasia ectodérmica hidrótica – **HED**). O gene candidato para ambas as doenças, **PPK** e **HED**, encontrado na região 13q12, foi identificado como o que codifica a proteína conexina 26 (**GJB2** ou **Cx26**). Este gene contém somente dois exons (um exon 5' não codificante, e um codificante de aproximadamente 800pb separados por uma região 5'→3' não codificante (DENOYELLE *et al.*, 1999).

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

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

Já existem mais de 50 mutações descritas no gene **GJB2**, resultando tanto em formas recessivas como dominantes de surdez não síndrômica. A maioria das mutações se encontram relacionadas com as formas recessivas (tabela VI) (<http://www.iro.es/cx26deaf.html>).

Tabela VI - Mutações descritas no gene **GJB2** em pacientes com surdez não sindrômica.

Mutações recessivas				
Nome da Mutação	Descrição	Efeito da mutação	Domínio da Proteína	Referência
-3170G→A / IVS + 1G→A M1V	G ⁻³¹⁷⁰ →A A ¹ →G	sítio de splicing Início da proteína Met 34	nenhum IC1	DENOYELLE <i>et al.</i> , 1999 GREEN <i>et al.</i> , 1999 ESTIVILL <i>et al.</i> , 1998
31del14	del14nt 31	frameshift	IC1	MURGIA <i>et al.</i> , 1999
31del38	del38nt 31	frameshift	IC1	DENOYELLE <i>et al.</i> , 1997
G12V	G ³⁵ →T	Gly12Val	IC1	RABIONET <i>et al.</i> , 2000b
35delG/30delG	delG 30-35	frameshift	IC1	ZELANTE <i>et al.</i> , 1997
35insG	insG 30-35	frameshift	IC1	ESTIVILL <i>et al.</i> , 1998
51del12insA	del12nt 52	frameshift	IC1	SOBE <i>et al.</i> , 2000
S19T	G ⁵⁶ →C	Ser19Thr	IC1	RABIONET <i>et al.</i> , 2000b
W24X	G ⁷¹ →A	Trp24Stop	TM1	KELSELL <i>et al.</i> , 1997
M34T	T ¹⁰¹ →C	Met34Thr	TM1	KELSELL <i>et al.</i> , 1997
V37I	G ¹⁰⁹ →A	Val37Ile	TM1	KELLEY <i>et al.</i> , 1998
A40E	C ¹¹⁹ →A	Ala40Glu	EC1	L.PERRONI PC
W44X	G ¹³² →A	Trp44Stop	EC1	GREEN <i>et al.</i> , 1999
G45E	G ¹³⁴ →A	Gly45Glu	EC1	ABE <i>et al.</i> , 2000
E47X	G ¹³⁹ →T	Glu47Stop	EC1	DENOYELLE <i>et al.</i> , 1997
167delT	delT 167	frameshift	EC1	ZELANTE <i>et al.</i> , 1997
Q57X	C ¹⁶⁹ →T	Gln57Stop	EC1	WILCOX <i>et al.</i> , 2000
176-191del16	del16nt 176	frameshift	EC1	ABE <i>et al.</i> , 2000 KUDO <i>et al.</i> , 2000 ESTIVILL <i>et al.</i> , 1998
Y65X	C ¹⁹⁵ →G	Tyr65Stop	EC1	CARRASQUILHO <i>et al.</i> , 1997
W77R	T ²²⁹ →C	Trp77Arg	TM2	KELSELL <i>et al.</i> , 1997
W77X	G ²³¹ →A	Trp77Stop	TM2	ABE <i>et al.</i> , 2000 FUSE <i>et al.</i> , 1999
235delC	delC 233-235	frameshift	TM2	KELLEY <i>et al.</i> , 1998
V84L	G ²⁵⁰ →C	Val84Leu	TM2	MURGIA <i>et al.</i> , 1999
L90P	T ²⁶⁹ →C	Leu90Pro	TM2	DENOYELLE <i>et al.</i> , 1999
269insT	insT 269	frameshift	TM2	DENOYELLE <i>et al.</i> , 1999
V95M	G ²⁸³ →A	Val95Met	IC2	KELLEY <i>et al.</i> , 1998
Y97X	Não descrito	Tyr97Stop	IC2	L.PERONI PC
H100Y	C ²⁹⁸ →T	His100Tyr	IC2	GREEN <i>et al.</i> , 1999
299-300delAT	delAT 299	frameshift	IC2	ABE <i>et al.</i> , 2000
314del14/ 312del14/ 310del14	del14nt 314	frameshift	IC2	DENOYELLE <i>et al.</i> , 1997 DENOYELLE <i>et al.</i> , 1999 KELLEY <i>et al.</i> , 1998
333-334delAA	delAA 333-335	frameshift	IC2	KELLEY <i>et al.</i> , 1998
S113R	T ³³⁹ →G	Ser113Arg	IC2	KELLEY <i>et al.</i> , 1998
delE120	delGlu 120	delGlu 120	IC2	DENOYELLE <i>et al.</i> , 1999
K122I	A ³⁶⁵ →T	Lys122Ile	IC2	GREEN <i>et al.</i> , 1999
Q124X	C ³⁷⁰ →T	Gln124Stop	IC2	SCOTT <i>et al.</i> , 1998

Continuação tabela VI - Mutações descritas no gene **GJB2**.

Y136X	C ⁴⁰⁸ →A	Tyr136Stop	IC2	FUSE <i>et al.</i> , 1999 ABE <i>et al.</i> , 2000 KUDO <i>et al.</i> , 2000
R143W	C ⁴²⁷ →T	Arg143Trp	IC2	BROBBY <i>et al.</i> , 1998
E147K	G ⁴³⁹ →A	Glu147Lys	TM3	MURGIA <i>et al.</i> , 1999
486insT	InsT486	frameshift	EC2	ANTONIADI <i>et al.</i> , 1999
A149T	G ⁴⁴⁵ →A	Ala149Thr	EC2	RABIONET <i>et al.</i> , 2000
509insA	insA 509	frameshift	EC2	DENOYELLE <i>et al.</i> , 1999
509del14	del14nt 509	frameshift	EC2	ANTONIADI <i>et al.</i> , 1999
P173R	C ⁵¹⁸ →G	Pro173Arg	EC2	RABIONET <i>et al.</i> , 2000
P175T	C ⁵²³ →T	Pro175Thr	EC2	DENOYELLE <i>et al.</i> , 1999
R184W	G ⁵⁵⁰ →C	Arg184Trp	EC2	WILCOX <i>et al.</i> , 2000
R184P	C ⁵⁵¹ →G	Arg184Pro	EC2	DENOYELLE <i>et al.</i> , 1997
S199F	C ⁵⁹⁶ →T	Ser199Phe	EC2	GREEN <i>et al.</i> , 1999
631delGT	delGT 631-632	frameshift	IC3	KELLEY <i>et al.</i> , 1998

Mutações Dominantes

Nome da Mutação	Descrição	Efeito da Mutação	Domínio da Proteína	Referência
M34T	T ¹⁰¹ →C	Met34Thr	TM1	KELSELL <i>et al.</i> , 1997
delE42	delGlu 42	delGlu 42	TM1	BALE <i>et al.</i> , 1999
W44S	G ¹³¹ →C	Trp44Ser	EC1	GASPARINI <i>et al.</i> , 2000
W44C	G ¹³² →C	Trp44Cys	EC1	DENOYELLE <i>et al.</i> , 1998
G59A	C ¹⁷⁶ →G	Gly59Ala	EC1	HEATHCOTE <i>et al.</i> , 2000
R75W	C ²²³ →T	Arg75Trp	EC1	RICHARD <i>et al.</i> , 1998
C202F	G ⁶⁰⁵ →T	Cis202Phe	TM4	MORLÉ <i>et al.</i> , 2000

Mutações identificadas em um único alelo*

Nome da Mutação	Descrição	Efeito da Mutação	Domínio da Proteína	Referência
H73R	A ²¹⁸ →G	His73Arg	EC1	ZARIWALA <i>et al.</i> , PC
R98Q	G ²⁹³ →A	Arg98Gin	IC2	GREEN <i>et al.</i> , 1999
R127H	G ³⁸⁰ →A	Arg127His	IC2	ESTIVILL <i>et al.</i> , 1998
R127C	G ³⁸⁰ →T	Arg127Cis	IC2	HILBERT <i>et al.</i> , PC
R184Q	G ⁵⁵¹ →A	Arg184Gln	EC2	ZARIWALA <i>et al.</i> , PC
K224Q	A ⁶⁷⁰ →C	Lys224Gin	IC3	ANTONIADI <i>et al.</i> , 1999

Polimorfismos

Aminoácido variante	Descrição	Efeito	Domínio da Proteína	Referência
V27I	G ⁷⁹ →A	Val27Ile	TM1	KELLEY <i>et al.</i> , 1998 FUSE <i>et al.</i> , 1999 KUDO <i>et al.</i> , 2000 ABE <i>et al.</i> , 2000
F83L	C ²⁴⁹ →G	Phe83Leu	TM2	SCOTT <i>et al.</i> , 1998
E114G	A ³⁴¹ →G	Glu114Gly	IC2	FUSE <i>et al.</i> , 1999 KUDO <i>et al.</i> , 2000 ABE <i>et al.</i> , 2000
T123A	A ³⁶⁷ →G	Tre123Ala	IC2	RICHARD <i>et al.</i> , 1998

Continuação **tabela VI** - Mutações descritas no gene **GJB2**.

V153I	G ⁴⁵⁷ →A	Val169Ile	TM3	HILBERT <i>et al.</i> , PC
G160S	G ⁴⁷⁸ →A	Glu160Ser	EC2	SCOTT <i>et al.</i> , 1998
C169Y	G ⁵⁰⁶ →A	Cys169Try	EC2	MURGIA <i>et al.</i> , 1999
I203T	T ⁶⁰⁸ →C	Ile203Thr	TM4	KUDO <i>et al.</i> , 2000 ABE <i>et al.</i> , 2000

IC1, IC2, IC3, domínios intracelulares; TM1, TM2, TM3, TM4, domínios transmembrana; EC1, EC2; domínios extracelulares.

* Não é possível definir se trata-se de polimorfismos ou mutações recessivas ou dominantes.

1.8- Mutação **35delG**

A mutação **35delG**, cuja detecção tem alta relevância no rastreamento das causas da surdez, é observada em indivíduos de diferentes grupos étnicos: árabes, beduínos, caucasóides, indianos, israelenses, italianos, paquistaneses, e espanhóis entre outros. Trata-se de uma simples deleção de uma guanina (G) de uma série de 6 guaninas que se estendem da posição 30 à posição 35 do gene **GJB2**. Essa deleção, que está presente no códon 10, leva a alteração no quadro de leitura de aminoácidos (*frameshift*). Com isso, a glicina é convertida para valina no códon 12, e um códon prematuro de terminação na proteína (*stop* códon) é formado no códon 13 (Tabela VII) (CARRASQUILLO *et al.*, 1997; DENOYELLE *et al.*, 1997; ZELANTE *et al.*, 1997; ESTIVILL, *et al.*, 1998; KELLEY *et al.*, 1998; SCOTT *et al.*, 1998; GASPARINI *et al.*, 2000; SOBE *et al.*, 2000).

Estudos mundiais demonstram uma alta frequência de portadores para a mutação **35delG** em diferentes regiões geográficas. A partir desses estudos algumas hipóteses estão surgindo para explicar esses achados. O fato de que em países europeus a heterozigose da mutação **35delG** é bastante frequente, principalmente na região sul, sugere que esta mutação possa ter se originado em algum lugar deste continente. A alta frequência de portadores também pode, por outro lado, indicar um efeito do fundador ou uma vantagem seletiva para os heterozigotos, ou mesmo uma combinação entre ambos (GASPARINI *et al.*, 2000). A alta frequência da mutação **35delG**, principalmente em caucasóides, poderia ainda ser atribuída ao fato de que ela ocorre entre uma sequência T(G₆)T, o que pode favorecer um erro de pareamento durante a replicação do DNA (ZELANTE *et al.*, 1997). O encontro de inserções (**35insG**) nesta mesma região, além do fato dessa mutação ser

encontrada em populações de diversas origens, favorece também a hipótese de que se trate de um *hot spot* no gene (ESTIVILL *et al.*, 1997).

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

Mutação	Comparação dos aminoácidos
35delG	Mut - Gln Thr Ile Leu Gly Val STP
	Nor - Gln Thr Ile Leu Gly Gly Val
	aa - 7 8 9 10 11 12 13

A alta prevalência de surdez pré-lingual de herança autossômica recessiva indicam como já foi dito, que muitas pessoas da população em geral sejam portadoras de mutações na conexina 26 (DENOYELLE *et al.*, 1997). De fato, recentes estudos sobre a incidência da mutação **35delG** mostraram que a frequência de heterozigotos na Europa é, em média, de 1 em cada 51 indivíduos. A frequência de portadores dessa mutação foi estudada em 17 países desse continente e também em outras populações (Tabelas VIII e IX) (GASPARINI *et al.*, 2000). Na população grega, a frequência de heterozigotos da mutação **35delG** é de 3,5%. Esta mutação é mais frequente que a mutação predominante da fibrose cística, a $\Delta F508$ (cerca de 2,3%), e semelhante à da mutação mais comum do gene da β -globina (IVS1- 110G→A), que causa talassemia β (ANTONIADI *et al.*, 1999).

Tabela VIII – Frequência de heterozigotos **35delG** em alguns países da Europa.

País	Heterozigotos/ nº indivíduos	Frequência
<i>Norte e centro da Europa</i>		
Dinamarca	2/95	1/47,5
Noruega	1/190	1/190
Estonia	5/113	1/22,5
Inglaterra	0/119	0/119
Alemanha	4/190	1/50
Bélgica	1/190	1/190
Holanda	2/89	1/44,5
França (Bretanha)	1/96	1/96
França	1/200	1/200
República tcheca	4/195	1/48,7
Eslovênia	1/182	1/182
Bulgária	1/157	1/157
<i>Sul da Europa</i>		
Portugal	4/179	1/45
Espanha	5/200	1/40
Itália	8/255	1/32
Itália (Sardenha)	4/116	1/29,5
Malta	4/144	1/36
Grécia	12/400	1/33
Turquia	4/150	1/37,5

Tabela IX – Frequência de heterozigotos **35delG** em algumas populações.

População	Heterozigotos/ nº indivíduos	Frequência
Judeus Persas	2/59	1/29,5
Judeus Iraquianos	1/115	1/115
Judeus Yemitas	0/13	-
Judeus Askenazitas	0/89	-
Judeu Norte-africanos	2/100	1/50
Árabes	1/58	1/58
Egípcios	0/95	-
Negros norte-americanos	0/190	-

A extensão da surdez determinada pela homozigose para a mutação **35delG** é bastante variável: de leve/moderada a profunda, havendo ainda alguns casos de surdez progressiva. Esta variabilidade sugere que outros fatores possam modificar os efeitos da mutação, possivelmente variações em outros genes de conexinas que possam compensar a **Cx26** inativa na função coclear (STEEL, 1999b). Essas possíveis modificações dos efeitos da mutação poderiam também explicar o encontro de indivíduos surdos que são heterozigotos para mutações no gene **GJB2** com apenas um dos alelos mutado (WILCOX *et al.*, 2000).

1.9 - Outras mutações

Uma outra mutação descrita envolvendo o gene **GJB2** é a **167delT**. Esta mutação é uma deleção de uma timina na posição 167 resultando em um códon de terminação prematuro no códon 81, e está localizada no segundo *loop* extracelular da **Cx26**. Não existem dados acerca da frequência desta mutação na população em geral, mas ela é observada em 4,3% dos Judeus Askenazitas. Nessa população, a frequência da mutação **35delG** é de 0,7% (MORELL *et al.*, 1998).

A mutação **235delC** tem sido detectada em orientais (populações japonesa e chinesa), e é responsável nessa população pela maior parte dos alelos mutados em pacientes com surdez. A frequência dessa mutação na população japonesa é estimada em 2:203. Nenhum dos estudos realizados nessas populações identificaram a mutação **35delG** (FUSE *et al.*, 1999).

1.10 - Considerações finais

Um elemento importante para o aconselhamento genético é que a gravidade da deficiência auditiva devido a mutações nesse gene é extremamente variável, o que dificulta o estabelecimento de um prognóstico caso venham a surgir novos casos na família (DENOYELLE *et al.*, 1999).

Devido à alta frequência e ao impacto clínico da deficiência auditiva congênita, sua detecção precoce tem se tornado uma questão de saúde pública. O rastreamento neonatal para identificação precoce da deficiência auditiva tem sido recomendada pelo *National Institutes of Health* desde 1993. A detecção precoce tem impacto significativo sobre a habilidade do indivíduo surdo em aprender e em se comunicar, já que pacientes com surdez profunda e mesmo aqueles com deficiência auditiva grave requerem terapia de linguagem. Além disso, a investigação da etiologia da surdez auxilia na decisão, somando-se a outros critérios, no que diz respeito ao implante coclear. Dessa forma, pacientes com diagnóstico genético poderão ser candidatos ao implante coclear (COHN *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; baseia-se na introdução de uma versão normal de um gene mutado dentro de uma célula apropriada. Alguns trabalhos estão sendo realizados buscando introduzir genes dentro 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).

As células ciliadas da cóclea são muito vulneráveis a alterações de sua homeostase, e tendem a morrer em caso de funcionamento anormal, não conseguindo replicar-se naturalmente, o que acontece em muitos casos de surdez genética. Assim sendo, uma outra linha de pesquisa no tratamento da surdez é a que busca desencadear a regeneração das células ciliadas da cóclea (STEEL, 2000b).

Dada a alta frequência de mutações no gene **GJB2** em indivíduos com surdez, combinada à alta incidência da mutação **35delG** e ainda ao fato de este ser um gene relativamente simples de ser analisado, o seu estudo em pacientes com surdez pode levar a um diagnóstico mais preciso e rápido. Isso é muito importante para o aconselhamento genético da família, e pode ainda ser um instrumento de diagnóstico precoce, como nos casos de rastreamento neonatal, permitindo que a reabilitação se inicie na época ideal, ou seja, ainda nos primeiros seis meses de vida. Considerando que em alguns casos a surdez determinada por mutações na conexina 26 pode ser progressiva, o diagnóstico precoce pode, nesse casos, permitir a estimulação das crianças nas fases críticas de aquisição da linguagem, antes que a deficiência se torne mais grave.

2- OBJETIVOS

2.1- GERAIS:

- Realizar a análise molecular do gene **GJB2** (conexina 26) numa amostra de indivíduos com surdez neurosensorial não sindrômica.
- Rastrear mutações, usando a técnica de SSCP, nos genes **PAX3** e **MITF** envolvidos na Síndrome de Waardenburg.

2.2- ESPECÍFICOS:

- Verificar a frequência de mutações do gene **GJB2** entre esses pacientes de um modo geral, e entre casos familiares e esporádicos de surdez neurosensorial.
- Verificar a frequência da mutação **35delG** e de outras mutações do gene da conexina 26.
- Verificar se há associação entre as características clínicas da surdez (época de manifestação e grau de perda auditiva) e a presença de mutações no gene da conexina 26.

3- MATERIAL E MÉTODOS

3.1- CASUÍSTICA

Foram estudados **39** casos-índice (22M:17F; $P>0,05$), com idade entre 1 a 56 anos, e 14 parentes afetados (4M:10F) por deficiência auditiva neurosensorial não sindrômica. Todos os indivíduos incluídos na amostra tiveram sua participação previamente autorizada pelos responsáveis, mediante assinatura do consentimento pós-informação (Anexo 3), após terem recebido esclarecimento sobre o estudo a ser realizado, o qual foi aprovado pelo Comitê de Ética da FCM- UNICAMP.

Foi realizada avaliação clínica prévia em **36** casos-índice (**grupo A**), a fim de excluir ao máximo a influência de fatores ambientais na etiologia da surdez por eles apresentada. Esses pacientes foram selecionados entre aqueles atendidos no Ambulatório de Genética do Centro de Estudos e Pesquisas em Reabilitação (**CEPRE**) da Faculdade de Ciências Médicas (**FCM**) da UNICAMP pela Dra. Andréa Trevas Maciel Guerra. Esse ambulatório faz parte do Serviço de Genética Clínica do Departamento de Genética Médica dessa mesma Faculdade.

Dados clínicos e moleculares de outros **3** pacientes surdos, com mutações previamente detectadas na conexina 26 (**grupo B**), foram considerados na amostra. Esses casos foram selecionados de um grupo de 26 pacientes cujas amostras de sangue foram encaminhadas diretamente ao Laboratório de Genética Humana do Centro de Biologia Molecular e Engenharia Genética (**CBMEG**) da UNICAMP, sem avaliação clínica prévia; essa avaliação foi realizada posteriormente.

Doze casos-índice, 10 originários do grupo A e 2 do grupo B, relatavam pelo menos um parente de primeiro ou de segundo grau afetado pela surdez; nenhum deles havia sido gerado por casal consanguíneo. Por sua vez, entre os 27 casos esporádicos haviam 3 com história de consanguinidade entre os genitores.

Os dados clínicos obtidos, tais como época de início e gravidade da perda auditiva, recorrência familiar e consangüinidade, estão descritos na tabela X.

Tabela X – Dados clínicos de 39 pacientes surdos, os quais foram submetidos à análise molecular no gene **GJB2**.

PACIENTE	SEXO	IDADE (ANOS)	INÍCIO DA SURDEZ	GRAVIDADE ¹	CONSANGÜINIDADE	RECORRÊNCIA FAMILIAR	GRAVIDADE ¹
GRUPO A							
1	F	16	Pós-lingual	Moderada	—	—	—
2	F	17	Pré-lingual	Profunda	—	—	—
3*	M	10	Pós-lingual	Moderada	—	Irmão Irmã Prima	Moderada Profunda Profunda
4	F	4	Pré-lingual	Profunda	—	—	—
5	M	21	Pré-lingual	Profunda	—	—	—
6	M	19	Pré-lingual	Profunda	—	—	—
7*	M	10	Pré-lingual	Profunda	—	—	—
8	M	4	Pré-lingual	Moderada	—	—	—
9	F	4	Pré-lingual	Profunda	—	—	—
10	M	9	Pré-lingual	Profunda	—	—	—
11*	M	3	Pré-lingual	Profunda	—	—	—
12	F	4	Pré-lingual	R: Profunda L: Moderada	—	—	—
13	M	1	Pré-lingual	Profunda	—	—	—
14	M	3	Pré-lingual	Profunda	—	—	—
15*	F	9	Pós-lingual	Profunda	—	Irmão	Moderada
16*	F	36	Pós-lingual	Grave	—	Filha	Grave
17*	M	4	Pré-lingual	Profunda	—	—	—
18	M	10	Pré-lingual	R: Grave L: Profunda	—	—	—
19	M	9	Pré-lingual	Profunda	—	—	—
20	M	4	Pré-lingual	Profunda	—	—	—
21*	M	15	Pré-lingual	Profunda	—	Irmã	Profunda
22*	M	3	Pré-lingual	Profunda	Primos 1º grau	—	—
23	M	5	Pré-lingual	Grave	—	—	—
24	F	4	Pré-lingual	R: Profunda L: Grave	—	—	—
25*	M	56	Pós-lingual	Profunda	—	Irmã	Profunda
26*	M	4	Pré-lingual	Profunda	—	Tias paternas	Moderada
27	M	11	Pré-lingual	Grave	—	Tio materno	Grave
28	F	6	Pós-lingual	R: Profunda L: Moderada	—	—	—
29*	F	21	Pré-lingual	Profunda	—	Irmão	Profunda
30	F	11	Pós-lingual	Moderada	—	—	—
31*	F	1	Pré-lingual	Profunda	—	Pai, mãe, tia paterna, tia materna	Profunda
32*	F	6	Pré-lingual	Profunda	—	—	—
33	F	41	Pós-lingual	Moderada	Primos 1º grau	—	—
34	F	3	Pré-lingual	Profunda	—	—	—
35	F	3	Pré-lingual	Profunda	Primos 1º grau	—	—
36*	F	21	Pré-lingual	Profunda	—	Irmã Irmã Irmã	Profunda Moderada Moderada

Continuação **tabela X** – Dados clínicos de 39 pacientes surdos, os quais foram submetidos à análise molecular no gene **GJB2**.

GROUP B							
37*	M	14	Pós-lingual	Moderada	—	Tio paterno	Profunda
38*	M	3	Pré-lingual	Profunda	—	—	—
39*	F	3	Pré-lingual	Profunda	—	Irmão	Profunda

(M) masculino; (F) feminino; (R) direita; (L) esquerda.

¹ leve: 27 a 40dB; moderada: 41 a 55dB; moderada a grave: 56 a 70dB; grave: 71 a 90dB; profunda: >90dB.

(*) heredograma no anexo 1.

3.2 – MÉTODOS

A análise molecular dos genes **GJB2**, **PAX3** e **MITF** foi realizada de acordo com as técnicas que se seguem:

3.2.1 - Extração de DNA genômico de sangue periférico

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

Ao sangue coletado adicionou-se 35ml da solução A (Triton-X 100 a 1%; $MgCl_2$ 5mM; Sacarose 0,32M; Tris-HCl 10mM pH 8,0). Após homogeneização a mistura foi colocada em gelo por 30 minutos para que ocorresse a lise das hemácias. Em seguida, centrifugou-se a 2500 rpm por 15 minutos a 4°C, e retirou-se o sobrenadante. Ressuspendeu-se o *pellet* (aglomerado de células e restos celulares formado com o processo de centrifugação) novamente em 20ml de solução A, agitando-se por inversão até este se desprender do fundo do tubo, centrifugou-se novamente por 15 minutos a 2500 rpm em temperatura ambiente, desprezando o sobrenadante. Esta etapa foi realizada quantas vezes fossem necessárias até que o *pellet* estivesse limpo.

Continuando o procedimento, ressuspendeu-se o *pellet* em 1ml de solução B, 2X concentrada (Na_2EDTA 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, Germany* , 0,5 ml de SDS 10%). Incubou-se em banho-maria a 37°C durante a noite. Após o período de incubação, procedeu-se à purificação do DNA genômico com fenol/clorofórmio. O fenol 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 dos 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-se o precipitado. Esta etapa de extração com fenol foi repetida mais uma vez. À fase aquosa coletada acrescentou-se igual volume de clorofórmio/álcool isoamílico na proporção 24:1. Novamente os tubos foram centrifugados a 2.500 rpm por 15 minutos em temperatura ambiente e separou-se a fase aquosa.

O DNA foi precipitado na fase aquosa adicionando-se 0,1 volume de acetato de sódio 3M, pH 5,5 e 2 volumes de etanol absoluto gelado. O precipitado de DNA foi obtido após inversão lenta dos tubos. Com o auxílio de um bastão o DNA foi coletado e em seguida lavado com etanol 70% para retirada do excesso de sal. Dependendo do volume de DNA precipitado ressuspendeu-se em 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 durante a noite para que o DNA entrasse em solução. A concentração final de DNA foi estimada por leitura de absorção óptica a 260nm em espectrofotômetro e sua integridade foi verificada em gel de agarose 0,8% após eletroforese em tampão Tris-Borato-EDTA, ou 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). O gel foi 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.

3.2.2 – Amplificação do gene GJB2

O gene **GJB2** compõe-se de apenas 1 exon codificante (*GenBank*, número de acesso: M86849), que foi amplificado pela reação em cadeia da polimerase (**PCR** – do inglês **polymerase chain reaction**). Para esta reação foram sintetizados iniciadores de

acordo com KELSELL *et al.* (1997) e DENOYELLE *et al.* (1997). Os iniciadores ou *primers* são oligonucleotídeos sintéticos a partir do qual os desoxinucleotídeos trifosfato (dNTPs) são incorporados e tem início a síntese de DNA respeitando-se a complementaridade de bases (A-T/C-G). As seqüências dos oligonucleotídeos construídos, a posição de anelamento e o tamanho (em pares de bases) dos fragmentos amplificados por cada par de *primers* (direto **Cx1F** e inverso **Cx1R**) são mostrados na tabela XI.

Tabela XI – Seqüência de *primers* para a amplificação do gene **GJB2**.

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

A amplificação do gene **GJB2** 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* (direto e inverso), 2,5U de enzima *Taq* DNA polimerase em tampão de PCR 10X (Tris-HCl 10mM pH 8,8) e 1,5mM de MgCl₂, em um volume final de reação de 50µl.

Na amplificação dos fragmentos foram utilizados os ciclos de amplificação determinados segundo KELSELL *et al.* (1997); DENOYELLE *et al.* (1997) e também de acordo com a T_m de cada *primer* utilizado como mostra a figura 7.

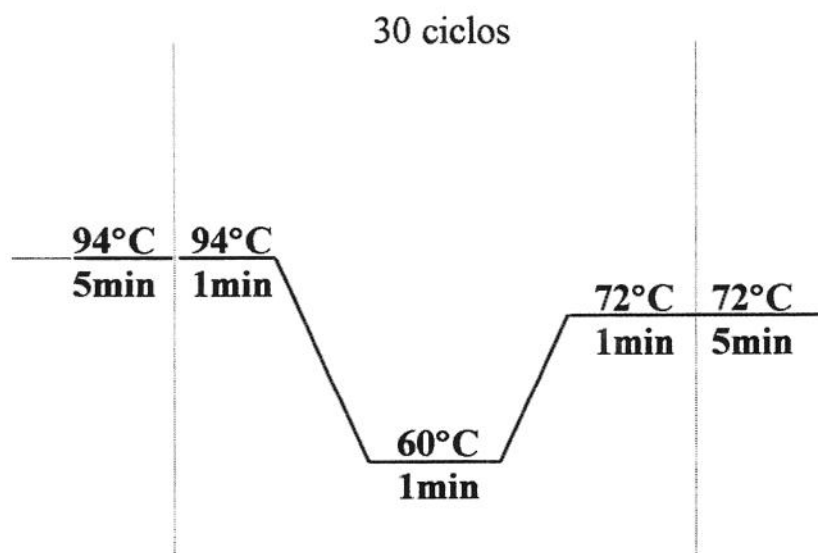


Figura 7 - Ciclos utilizados na amplificação do gene **GJB2**.

Os produtos de amplificação foram submetidos a eletroforese em gel de agarose 1% em tampão Tris-Borato-EDTA, ou 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). O gel foi corado com brometo de etídio (na concentração final de 0,5µg/ml) que foi feito a partir de solução estoque de brometo de etídio a 10mg/ml: 5µl desta solução estoque foram diluídos em 100ml de água Milli Q e os fragmentos amplificados foram visualizados sob iluminação ultravioleta e fotografados.

3.2.3 - SSCP

Por meio da análise de polimorfismo de conformação da fita simples de DNA, SSCP (do inglês - **s**ingle **s**trand **c**onformation **p**olymorphism) os exons amplificados dos genes **MITF** e **PAX3** foram rastreados. Neste método, 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 pareamento de bases de sua própria sequência

nucleotídica. Padrões de migração específicos para cada fita simples são visualizados, dependendo da temperatura da corrida e da concentração do gel.

A análise dos fragmentos pela técnica de PCR-SSCP foi realizada utilizando-se géis de poliacrilamida 10% contendo 10% de glicerol (PAGE-*polyacrilamide gel eletrophoresis*) ou *PhastGel*, que são géis pré-moldados para o sistema *Phast System* (Pharmacia - Biotech), ambos com subsequente coloração com prata.

Alíquotas de 2µl dos produtos da reação de PCR são misturados em 2µl de uma solução desnaturante composta de 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. A mistura é então desnaturada a 95°C por 5 minutos e em seguida incubada em gelo até o momento da aplicação da amostra no gel.

O método SSCP é mais sensível na detecção de alterações moleculares em fragmentos de PCR de até 350pb, a partir do qual perde-se muito em confiabilidade dos resultados obtidos. Inicialmente o exon 9 do gene **MITF** foi amplificado num tamanho final de 652pb. Buscando-se aumentar a eficácia da técnica SSCP na triagem do exon 9 foi feita uma digestão desse exon com a enzima *Bam* HI, originando fragmentos de 399pb e de 253pb. A descrição da reação de digestão com a enzima *Bam* HI foi feita perfazendo um volume final de 20µl. A reação foi realizada por 2 horas à 37°C da seguinte forma:

- 17µl do produto de PCR
- 1µl enzima *Bam* HI
- 2µl tampão REACT 3

Ao se utilizar géis pré-moldados de 12,5% com tampão nativo (L-alanina 0,88M; Tris 0,25M, pH 8,8) foi necessário se fazer uma pré-corrida. As condições de corrida foram entre 150 e 300 Vh na temperatura de 4°C. Para géis pré-moldados de 20% utilizou-se

tampão SDS (Tricina 0,20M; Tris 0,20M; SDS 0,55%, pH 8,1), sem pré-corrida e nas mesmas condições do gel de 12,5%.

Foram utilizadas placas 200mm X 180mm para os géis manuais com a seguinte composição:

- 20ml de glicerol 20%
- 10ml de acrilamida/bisacrilamida 40%
- 0,8ml de TAE 50X (Tris-Acetato-EDTA) para um volume final de 40ml.

Para a polimerização adicionaram-se 300µl de persulfato de amônio 10% e 50µl de TEMED. Foram aplicados 8µl do produto de reação com 4µl de *stop solution* (formamida 95%, 20 mM de EDTA pH 8,0 e 0,05% de azul de bromofenol) no gel que foi submetido à eletroforese com 350V por 4 horas em tampão TAE 1X e temperatura aproximada de 20°C. Os géis no sistema manual foram corados pela prata 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 10 minutos;
- Lavagem com 200 ml de água destilada;
- Revelação - 6g NaOH, 1,2 ml formaldeído, completar o volume para 200ml;
- Interrupção - repetir solução de fixação. Após a coloração, os géis foram fotografados.

Os géis no sistema Phast System foram corados pela prata da seguinte forma:

- Etanol 10% e ácido acético 0,5% por 1.5 min a 40°C;
- Solução de nitrato de prata 0,2%, dissolvida em solução de etanol 10% e ácido acético 0,5% por 8 min a 40°C;
- Água MilliQ (2X) por 0,2 min a 20°C;

- Solução de hidróxido de sódio 2% com 100µl/ml de formaldeído por 5 min a 20°C;
- Etanol 10% e ácido acético 0,5% por 2 min a 40°C;
- Solução de glicerol 10% por 5 min a 40°C.

Após a secagem dos géis à temperatura ambiente, realizou-se a análise visual do padrão de migração de bandas. Uma vez encontrada alguma diferença na mobilidade eletroforética com relação aos controles normais, o fragmento que apresentou o *shift* de banda foi sequenciado.

3.2.4 – Detecção da mutação 35delG

3.2.4.1– Sequenciamento

O sequenciamento do DNA foi realizado para a identificação de mutações no gene **GJB2** e também nos fragmentos de PCR dos genes **PAX3** e **MITF** que apresentaram bandas de migração anômala nos géis de SSCP.

Para o sequenciamento foi utilizado o método de terminação de cadeias (SANGER *et al.*, 1976), utilizando o kit *Thermo Sequenase Radiolabeled termination cycle sequencing* (AMERSHAN Life Science). Este método se baseia no sequenciamento por incorporação de nucleotídeos terminadores da reação em cadeia da polimerase. Estes didesoxinucleotídeos trifosfatos (ddNTPs) terminadores ou (ddGTP, ddATP, ddTTP e ddCTP) uma vez incorporados na fita em síntese interrompem o processo de incorporação de outros nucleotídeos.

Foram utilizados 10µl do produto da PCR, sendo 5µl para cada uma das reações (direta e inversa). Cada 5µl do produto de amplificação foi previamente tratado com 10U Exonuclease I (**EXO I**) e 2U de Fosfatase Alcalina de Camarão (**SAP**). A reação contendo 5µl do produto de PCR, 1µl de EXO I (10U/µl) e 1µl de SAP (2U/µl) foi incubada a 37°C

por 15 minutos e 80°C por 15 minutos (para a inativação das enzimas). Neste tratamento são eliminados DNA em fita simples (*primers*, fragmentos inespecíficos) e nucleotídeos não incorporados durante a reação de PCR.

3.2.4.1.1- Reação utilizando [α^{33} -P] – ddNTPs

A mistura da reação para sequenciamento foi a seguinte:

- 7µl da reação de pré-tratamento do produto da PCR;
- 1µl do *primer* (direto ou inverso) ~ 2pmoles;
- 2µl de *reaction buffer* 10X (260mM Tris-HCl, pH 9,5; 65mM MgCl₂);
- 8µl de H₂O;
- 2µl enzima *Thermo Sequenase* (4U/µl).

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

Uma gota de óleo mineral foi acrescida a cada tubo para evitar evaporações. A reação de sequenciamento consistiu de 40 ciclos nas condições especificadas na figura 8.

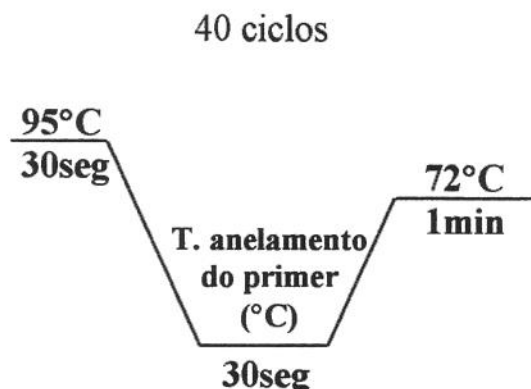


Figura 8 - Ciclos utilizados no sequenciamento do gene **GJB2**, **PAX3** e **MITF**. A temperatura de anelamento é correspondente ao *primer* utilizado em cada gene.

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.

3.2.4.1.2 - Preparo do gel de acrilamida

O gel utilizado é de poliacrilamida a 6%, composto por 10,5ml de solução estoque de acrilamida a 40% contendo 3% de bisacrilamida, 7ml de tampão TBE 10X, 29,4g de uréia e água destilada para um volume final de 70ml. Para a polimerização, foram adicionados 500µl de persulfato de amônio 10% e 50µl de TEMED (Tetrametiletenodiamino). A solução foi vertida em um aparato montado entre duas placas de vidro (com as dimensões de 42cm x 33,5cm e 39,5cm x 33,5cm) emparelhadas e tendo entre elas espaçadores sem gradiente de espessura. As placas foram previamente lavadas com detergente, acetona e etanol absoluto e somente a placa maior sofreu um tratamento com 3ml de *Repel-Silane* (substância repelente à base de silicone). Antes da aplicação das amostras no gel de sequenciamento, realizou-se uma pré-corrida em tampão TBE 1X para um aquecimento prévio do gel.

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

Decorrido o tempo necessário da corrida eletroforética, as placas foram desmontadas. Em função do *Repel-Silane* a placa maior separou-se sem dificuldade do gel o qual permaneceu na placa menor. Da placa menor o gel foi transferido para um papel 3MM (papel de filtro) nas mesmas dimensões da placa. O papel de filtro é lançado sobre o gel na 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 deixou-se secando por 1 hora a 80°C num ambiente a vácuo. Após a secagem do papel, este foi exposto a um filme sensível (Kodak Biomax) durante a noite à -70°C e com intensificador.

Para a detecção da mutação **35delG** o fragmento contendo esta região foi amplificado usando o par de *primers* *Cx1F* /*Cx1R* e, em seguida em alguns casos clonado usando o kit pGEM (Promega). Pelo menos oito clones foram sequenciados pelo método de terminação de cadeias (SANGER *et al.*,1976), utilizando o kit *Thermo Sequenase Radiolabeled terminator cycle sequencing* (AMERSHAN Life Science).

3.2.4.2 - Clonagem

Para a clonagem de seqüências do gene **GJB2** foi utilizado o kit pGEM (Promega). Este kit permite a clonagem rápida e eficiente de fragmentos amplificados pela técnica de PCR. O método se baseou na característica da *Taq* polimerase de adicionar uma simples dextrosiadenosina (A) na extremidade 3' dos produtos de PCR. O vetor pGEM, que é fornecido pelo Kit, e já é linearizado, possui na região 3' terminal um resíduo de desoxitimidina (T) permitindo que inserto e vetor com extremidades abruptas se liguem eficientemente. As etapas do processo de clonagem estão listadas abaixo.

3.2.4.2.1 – Ligação

Os fragmentos amplificados pela PCR foram utilizados como inserto na ligação ao plasmídeo sem passar pela etapa de purificação. 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/ μ l. Esta reação foi incubada por 1 hora a temperatura ambiente.

3.2.4.2.2 -Transformação

Foram utilizadas bactérias da linhagem DH5 α descritas por HANAHAN (1983). O protocolo para obtenção de células DH5 α 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 é denominado transformação bacteriana. A aquisição do plasmídeo contendo o inserto pelas células DH5 α foi desencadeada após choque térmico. Em 100/ μ l de células DH5 α competentes foram acrescentados 5/ μ l da reação de ligação. Estas células foram mantidas em banho de gelo por 30 minutos e imediatamente após 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. Em seguida, adicionou-se 900/ μ l de meio LB (meio composto de bactotriptona 1%, extrato de levedura 0,5% e NaCl 1% diluídos em água destilada e com pH 7,5 ajustado com NaOH a 10N). O meio LB continha ainda antibiótico ampicilina na concentração 50/ μ g/ml para selecionar apenas as bactérias transformadas, pois somente o plasmídeo contém informação que confere a resistência a este antibiótico. As amostras foram mantidas em agitador a 200-300rpm por 1 hora e a 37°C. Depois de deixar crescendo durante este período, 200/ μ l de células supostamente transformadas foram plaqueados em placas de Petri e deixadas em estufa a 37°C durante a noite. As placas de Petri continham meio LB sólido composto por 15% de agar bacteriológico diluídos em meio LB líquido com pH 7,5 (ajustado a com NaOH 10N) ao qual foi adicionado o antibiótico ampicilina. Antes de plaquear as células transformadas, às placas com meio LB sólido acrescentou-se 14/ μ l de X-gal (5-bromo-4-cloro-3-indolil- β ,

D-galactosidase) na concentração 50mg/ml. O X-gal 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 e de fácil percepção nas colônias proliferadas na placa de Petri. A coloração branca nas colônias indica que o inserto interrompeu a região amino terminal do gene da β -galactosidase no plasmídio. Este gene trata-se, portanto, de 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.

3.2.4.2.3 - 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 *ependorf* juntamente com a alça cortada no tamanho do mesmo. Após este procedimento seguem-se as etapas para a realização da PCR como mostra o item 3.2.2 (métodos).

3.2.4.3 - PCR alelo específico (AS-PCR)

Uma outra técnica utilizada para a detecção da mutação **35delG** é a reação em cadeia da polimerase alelo específico (**AS-PCR** – do inglês **allele specific PCR**). Para esta reação foram sintetizados **ARMS primers** (do inglês **Amplification-Refractory Mutations System**) para detecções de mutações de ponto, de acordo com SCOTT *et al.* (1998). Na padronização da técnica de **AS-PCR**, várias etapas foram modificadas para que se conseguisse um resultado confiável, tais como: volume final da reação, concentração de $MgCl_2$ e número de ciclos. Observou-se que o número de ciclos era determinante para o resultado final, uma vez que o aumento ou a diminuição de apenas 1 ciclo fez com que o resultado se alterasse. Além disso, foram utilizados controles positivos e negativos para a mutação **35delG** previamente detectados por sequenciamento direto.

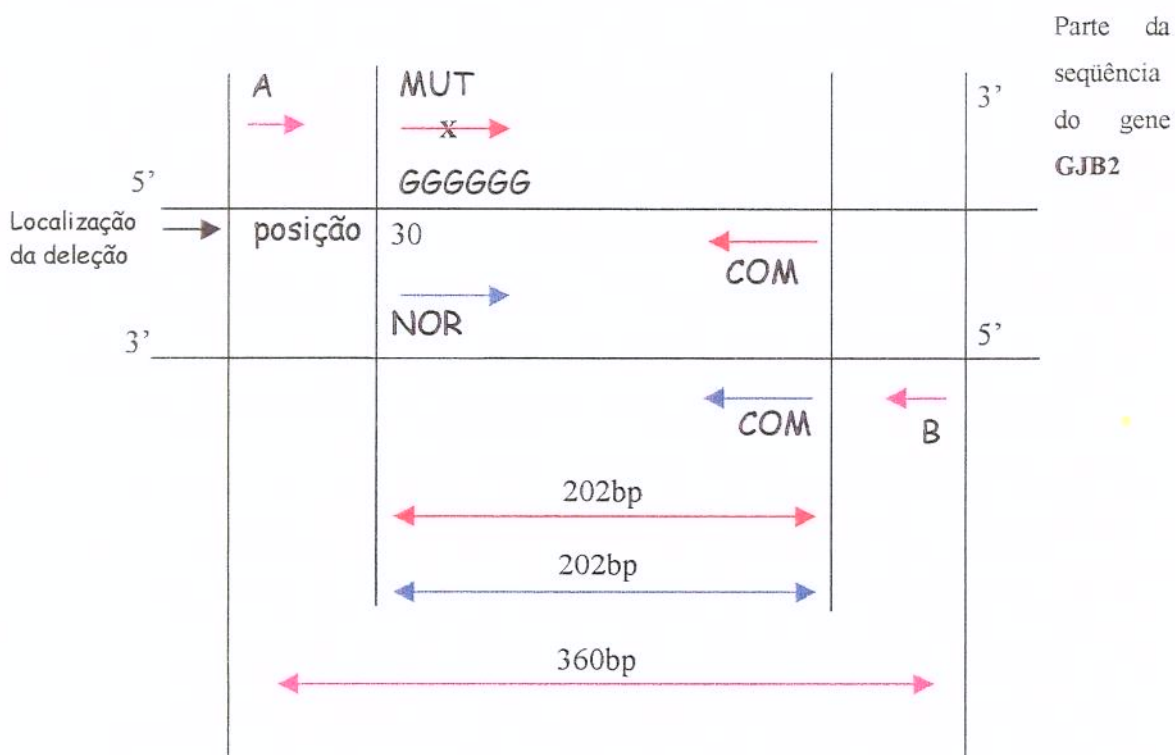


Figura 9 - Representação esquemática da técnica de AS-PCR.

Tabela XII – Sequência de *primers* utilizados para detecção da mutação **35delG**.

<i>Primer</i>	Sequência 5'→3'
NOR	- TTG GGG CAC GCT GCA GAT CCT GGG GAG
MUT	- TTG GGG CAC GCT GCA GAT CCT GGG GAT
COM	- GAA GTA GTG ATC GTA GCA CAC GTT CTT GCA
A	- CCC ACC TTC CCC TCT CTC CAG GCA AAT GGG
B	- GGG CCT CAG TCC CAA CAT GGC TAA GAG GTG

A reação da **AS-PCR** foi realizada da seguinte forma:

- 200 a 500ng de DNA genômico em 30,0µl de reação de PCR;
- Tampão de PCR 10X (Tris-HCl 10mM pH 8.8), 1,17mM de MgCl₂, 170µM de cada desoxinucleotídeo trifosfato (dNTP);
- 10pmol ou 0,05µg do *primer* normal (NOR) ou mutante (MUT);
- 10pmol ou 0,05µg do *primer* comum (COM);
- 10pmol ou 0,03µg dos *primers* controle A e controle B;
- BSA 1% (Albumina de Soro Bovino);
- 1U de enzima *Taq* DNA polymerase;

O ciclo utilizado na **AS-PCR** é visualizado na figura 10. Os produtos de PCR foram analisados por eletroforese em gel de agarose 1,5% em tampão Tris-Borato-EDTA, ou TBE 1x (TBE 10 x é composto de Tris Base a 0,089M, Ácido Bórico a 0,089M e EDTA a 0,002M e em pH 8,0) contendo brometo de etídeo (na concentração 0,5µg/ml).

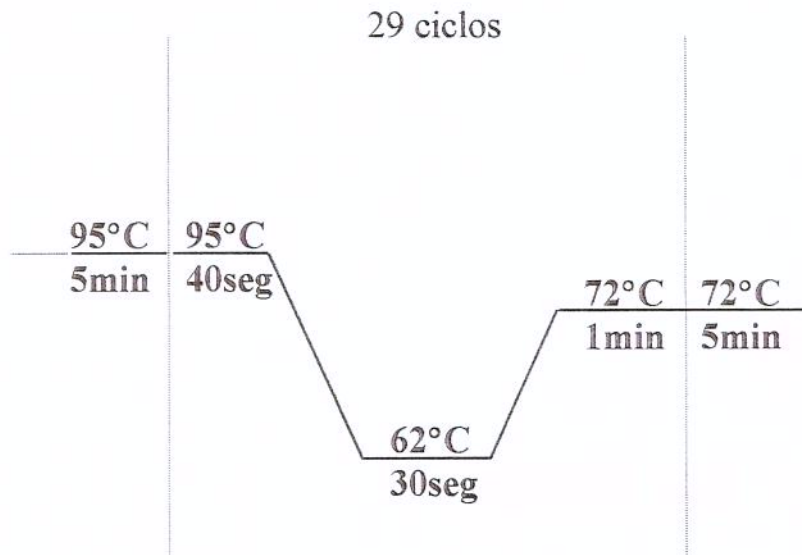


Figura 10 - Ciclos utilizados na reação de AS-PCR.

3.2.5 – Detecção da mutação 167delT

A detecção da mutação **167delT** no gene da **GJB2** foi feita por análise de restrição usando a enzima *Pst* I. A região contendo a deleção foi amplificada usando os *primers* Cx1F e Cx1R. A reação de digestão foi feita perfazendo um volume final de 20µl. A reação foi realizada por 3 horas a 37°C da seguinte forma:

- 17µl do produto de PCR;
- 1µl enzima *Pst* I;
- 2µl tampão REACT 2.

A deleção da base T na posição 167 do gene **GJB2** aboli o sítio de *Pst* I (cTgca↓g) na sequência. Dessa forma, indivíduos normais para essa mutação apresentam fragmentos de 150, 69, 52 e 15pb após a digestão com a enzima *Pst* I, enquanto que os alelos mutantes apresentam as bandas de 218, 52 e 15pb, como esquematizado na figura 11.

Os produtos da digestão foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1000 GIBCO BRL® na concentração 2% em tampão Tris-Acetato-EDTA, ou TAE 1x (TAE 50 x é composto de Tris Base a 0,089M, Ácido acético glacial 100% e EDTA a 50mM e em pH 8,0). O gel foi corado com brometo de etídio (na concentração 0,5µg/ml) e os fragmentos da digestão foram visualizados sob iluminação ultravioleta e fotografados.

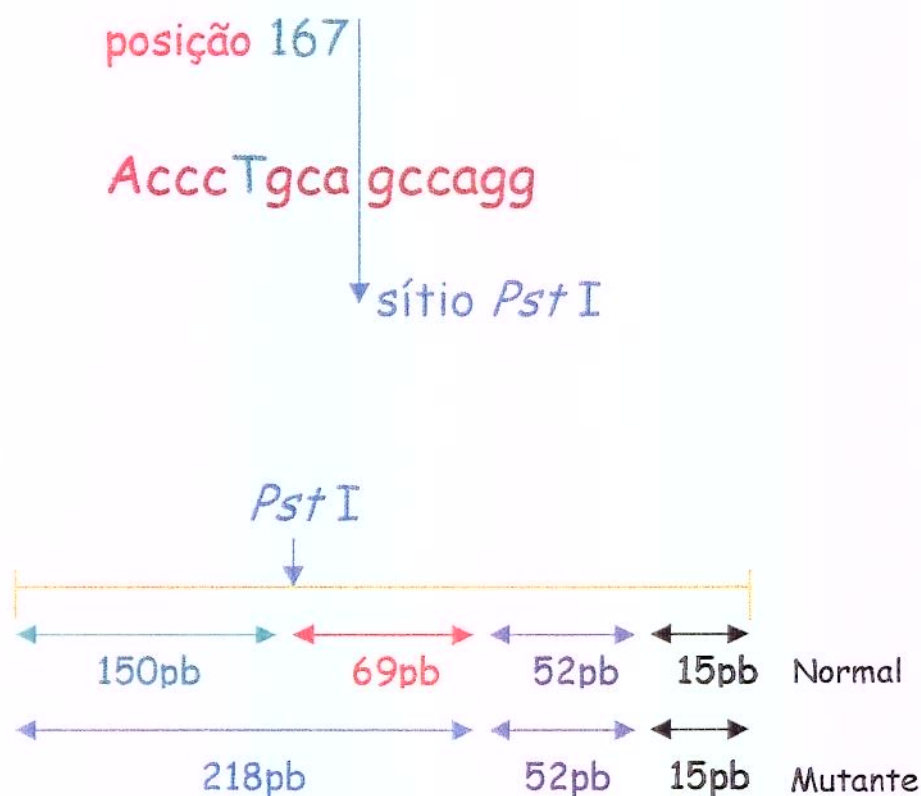


Figura 11 - Representação esquemática da análise de restrição da mutação 167delT no gene **GJB2**.

3.2.6 – Amplificação e rastreamento de mutações nos genes **PAX3** e **MITF**

As seqüências codificadoras dos exons do gene **MITF** (9 exons) (*GenBank*, número de acesso: NM000248) e **PAX3** (8 exons) (*GenBank*, número de acesso: NM000438) foram amplificados pela técnica de PCR utilizando os *primers* descritos por TASSABEHJI e

colaboradores, 1994a e 1994b, respectivamente. Em seguida, os fragmentos foram rastreados pela técnica de SSCP. A sequência e o tamanho do produto de amplificação de cada exon dos genes **MITF** e **PAX3** são mostrados na tabela XIII e XIV respectivamente.

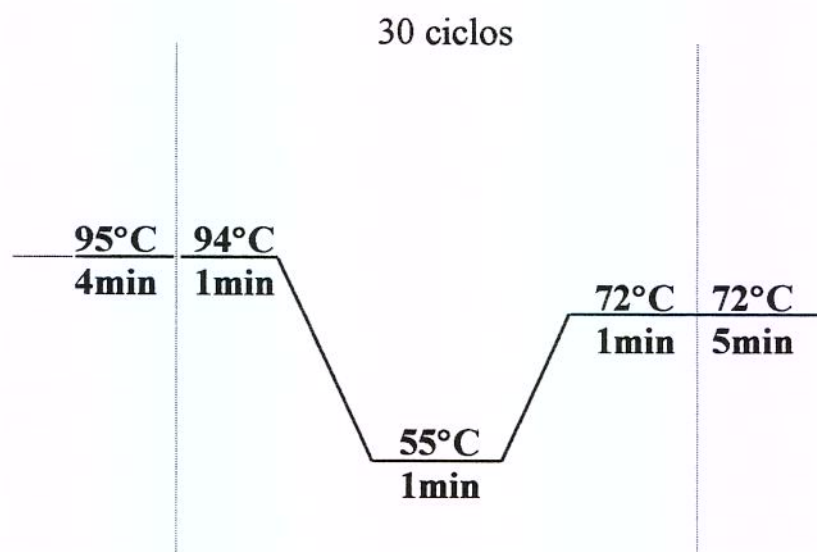
A amplificação dos 9 exons do gene **MITF** consistiu em 30 ciclos usando 200 a 500ng de DNA genômico, 200 μ M de cada desoxinucleotídeo trifosfato (dATP, dCTP, dGTP e dTTP), 20pmol de cada *primer* (direto e inverso), 2,5U de enzima *Taq* DNA polimerase em tampão de PCR 10X (Tris-HCl 10mM pH 8,8) e 1,5mM de MgCl₂, em um volume final de reação de 50 μ l. Os ciclos de amplificação do gene MITF estão mostrados na figura 12.

Tabela XIII — Sequência de *primers* utilizados para a amplificação do gene **MITF**.

Exon	Primers 5' → 3'	Tamanho (bp)
1	E1F - GGA TAC CTT GTT TAT AGT ACC TTC E1R - AAA AGA GCA GAT TTA TAC TTA TTG	270
2	E2F - TCT GAA ACT CAC AAA TAA CAG CGC E2R - TAT TCA ACA GAC AAG TTA TTT AGC	343
3	E3F - CCA TCA GCT TTG TGT GAA CAG GTC E3R - TTT CAG GAA GGT GTG ATC CAC CAC	245
4	E4F - AAC TAA AGA CCA TTA TTG CTT TGG E4R - AGA AAA GAA CCC TGG AAA CAC CTC	264
5	E5F - ATA AAT CCT AGA GTA GGA TAT AGG E5R - ACT TTG TCT TAT CAG GAA ATG GAC	270
6	E6F - TCA AGT CAA ATA AGC TTC TGT ATG E6R - GTA GGA ATA AAC TCT CCT CTA CAG	280
7	E7F - GTG CTA AAT GCA TAC ATG GCA CTG E7R - TTA GGA ATA GAA CCA AAG GGA GAG	264
8	E8F - TTC ATT GAG CCT CAA ATC CTA AAG E8R - CTG TTT CTA CTG TCT TGA AGT CGG	264
9	E9F - AGT CCT CTG TGC TCG TCC TAT TTC E9R - AAG CTA AAG TCT GTG GTG AAT TC	652

Tabela XIV – Sequência de *primers* utilizados para a amplificação do gene **PAX3**.

Exon	Primers 5' → 3'	Tamanho (bp)
2	P2F - GAA GAC TGC GAA ATT ACG TGC TGC P2R - GAC CAC AGT CTG GGA GCC AGG AGG	236
3	P3F - CAG AGG CGG TGG GGC CGC CGC CAC P3R - GTC GAC GTG CCG GGG TAA TAG CGA	130
4	P4F - AGC CCT GCT TGT CTC AAC CAT GTG P4R - TGC CCT CCA AGT CAC CCA GCA AGT	135
5A	P5AF - GAG AGA ACT TGG ATT CAA TCT CAG P5AR - CCT GTC TGG ACT GAA GTA GGA CAC	103
5B	P5BF - GGT ATA GGG ATC ACT GTA ATG GTG P5BR - CAA TAT GCA TCC CTA GTA AAG GGC	103
6	P6F - ACT ATT ATT TCA TCA GTG AAA TCC P6R - ATA AAA TAT CCA CCA GAG AAA TCG	165
7	P7F - TGC ACT GAA CTT TCT CTG CTG GCC P7R - CTG GTA TAC AGC AAA TCG TCT GTC	216
8	P8F - CTC TTT TTT TAG GTA ATG GGA C P8R - GAG TTT ATC TCC CTT CCA GG	264

**Figura 12** – Ciclos utilizados na amplificação dos exons do gene **MITF**.

Para a amplificação dos exons 6 e 8 do gene **PAX3** utilizou-se de 40 ciclos, como mostra a figura 13 usando 200 a 500ng de DNA genômico, 200µM de cada desoxinucleotídeo trifosfato (dATP, dCTP, dGTP e dTTP), 20pmol de cada *primer* (direto

e inverso), 2% de DMSO (dimetilsulfóxido), 2,5U de enzima *Taq* DNA polimerase em tampão de PCR 10X (Tris-HCl 10mM pH 8,8) e 1,5mM de $MgCl_2$, em um volume final de reação de 50 μ l.

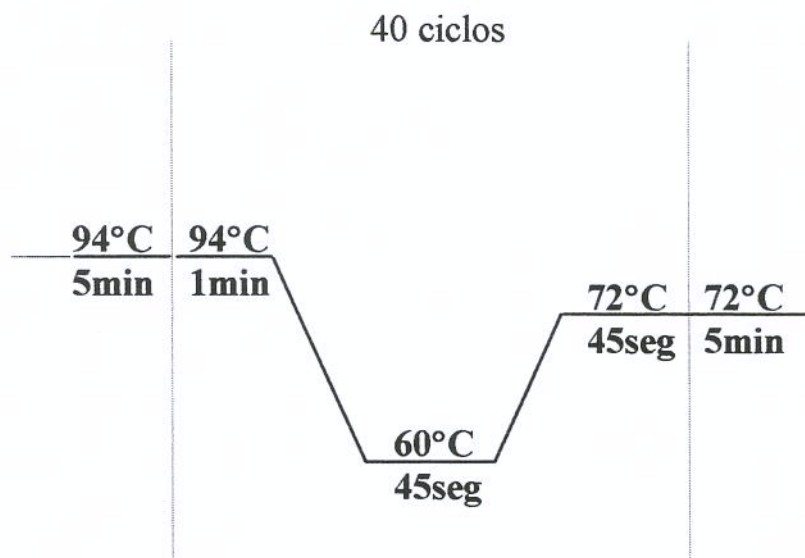


Figura 13 - Ciclos de amplificação dos exons 6 e 8 do gene **PAX3**.

Os exons 2, 3, 4, 5A, 5B e 7 do gene **PAX3** foram amplificados a partir de 200 a 500ng de DNA genômico, 200 μ M de cada desoxinucleotídeo trifosfato (dATP, dCTP, dGTP e dTTP), 10pmol de cada *primer* (direto e inverso), 3% de DMSO (dimetilsulfóxido), 2,5U de enzima *Taq* DNA polimerase em tampão de PCR 10X (Tris-HCl 10mM pH 8,8) e 1,5mM de $MgCl_2$, em um volume final de reação de 50 μ l. Para a amplificação desses exons foram utilizados PCR *touchndown*, ou seja, a cada número determinado de ciclo a temperatura de anelamento sofre um decréscimo como mostra a figura 14.

Para a detecção de possíveis mutações pontuais os exons amplificados dos genes **MITF** e **PAX3** foram rastreados por SSCP.

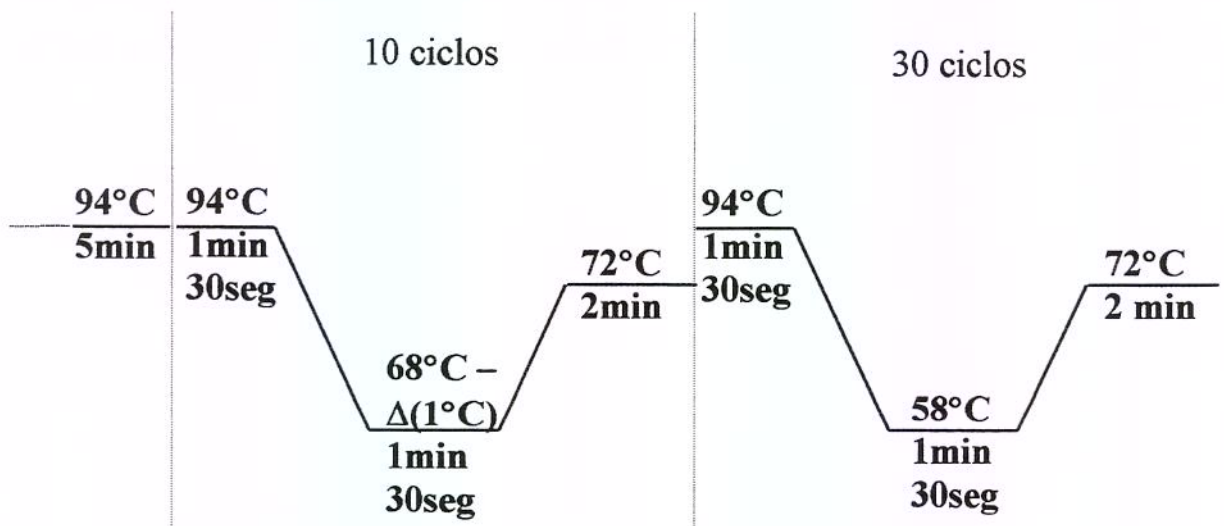


Figura 14 - Ciclos de amplificação dos exons 2, 3, 4, 5A, 5B e 7 do gene **PAX3**. Δ -auto diminuição de temperatura a cada ciclo.

4. RESULTADOS

A análise molecular dos casos-índice de ambos os grupos, seus pais e parentes pode ser observada na tabela XV.

4.1 - Gene GJB2

O gene **GJB2** foi amplificado pela técnica de PCR de acordo com o tamanho previsto na sua totalidade e em 2 fragmentos (figura 15).

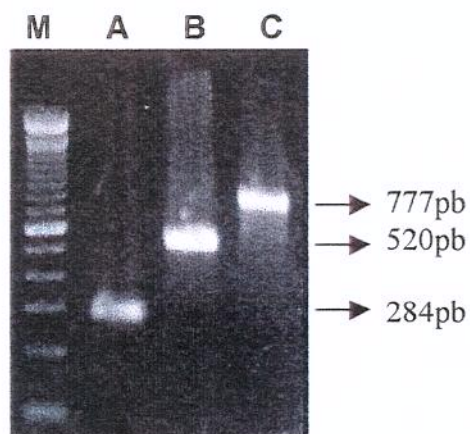


Figura 15 – Gene **GJB2** amplificado na reação de PCR. M- marcador de peso molecular (100pb – Gibco BRL[®]); A e B – fragmentos do gene denominados **Cx1** e **Cx2**, respectivamente; C – gene **GJB2** em sua totalidade.

Tabela XV - Genótipos encontrados no gene GJB2 das famílias estudadas.

PACIENTE	MUTACÃO ALELO1/ALELO2	PAIS		PARENTES AFETADOS	MUTACÃO ALELO1/ALELO2	OUTROS PARENTES (AUDIÇÃO NORMAL)	MUTACÃO ALELO1/ALELO2
		PAI	MÃE				
GRUPO A							
1	N/N	NA	NA	---	---	---	---
2	N/N	NA	NA	---	---	---	---
3*	N/N	N/N	N/N	Irmão	N/N	---	---
				Irmã	N/N		
				Prima	N/N		
4	N/N	NA	NA	---	---	---	---
5	N/N	NA	NA	---	---	---	---
6	N/N	NA	NA	---	---	---	---
7*	35delG/35delG	NA	35delG/N	---	---	Avó materna	35delG/N
						Primo	N/N
8	N/N	NA	NA	---	---	---	---
9	N/N	NA	NA	---	---	---	---
10	N/N	NA	NA	---	---	---	---
11*	35delG/35delG	NA	35delG/N	---	---	---	---
12	N/N	NA	NA	---	---	---	---
13	N/N	NA	NA	---	---	---	---
14	N/N	NA	NA	---	---	---	---
15*	V95M/V37I	V95M/N	V37I/N	Irmão	V95M/V37I	---	---
16*	N/N	NA	NA	---	---	---	---
17*	V27I/N	V27I/N	N/N	---	---	Irmã	V27I/N
18	N/N	NA	NA	---	---	---	---
19	N/N	NA	NA	---	---	---	---
20	N/N	NA	NA	---	---	---	---
21*	35delG/35delG	35delG/N	35delG/N	Irmã	35delG/35delG	Irmão	35delG/N

Continuação tabela XV - Genótipos encontrados no gene **GJB2** das famílias estudadas.

22*	N/N	NA	NA	NA	---	---	---	---
23	N/N	NA	NA	NA	---	---	---	---
24	N/N	NA	NA	NA	---	---	---	---
25*	N/N	NA	NA	NA	Irmã	N/N	---	---
26*	35delG/35delG	35delG/N	35delG/N	35delG/N	Tias paterna	NA	Irmã	N/N
27	N/N	NA	NA	NA	Tio materno	NA	---	---
28	N/N	NA	NA	NA	---	---	---	---
29*	N/N	NA	NA	NA	Irmão	N/N	---	---
30	N/N	NA	NA	NA	---	---	---	---
31*	35delG/N	35delG/35delG	V95M/N	Tia materna	V95M/N	Avó materna	V95M/N	N/N
				Tia paterna	35delG/N	Avô materno	N/N	
32*	35delG/N	35delG/N	N/N	---	---	---	---	---
33	V27I/N	NA	NA	---	---	---	---	---
34	N/N	NA	NA	---	---	---	---	---
35	N/N	NA	NA	---	---	---	---	---
36*	35delG/35delG	35delG/N	35delG/N	Irmã	35delG/35delG	---	---	---
				Irmã	35delG/35delG	---	---	---
				Irmã	35delG/35delG	---	---	---
GRUPO B								
37*	35delG/delE120	35delG/N	delE120/N	Tio paterno	N/N	Irmã	N/N	
38*	35delG/N	35delG/N	N/N	---	---	Irmão	35delG/N	
39*	35delG/35delG	35delG/N	35delG/N	Irmão	35delG/35delG	Avó materna	35delG/N	
						Avô materno	N/N	
						Avó paterna	35delG/N	
						Avô paterno	N/N	
						Tia paterna	35delG/N	

N - nenhuma alteração no gene GJB2; NA - não analisado.

(*) heredograma no anexo 1

4.1.1 - Identificação da mutação 35delG

A detecção da mutação **35delG** no gene **GJB2** foi realizada pela técnica de PCR-alelo específico (**AS-PCR**). Esta técnica auxiliou e agilizou o estudo desta mutação, pois o sequenciamento direto da região onde a mutação **35delG** está presente, muitas vezes apresenta compressões, tornando difícil a interpretação dos resultados, sendo às vezes necessário o sequenciamento passando pela etapa de clonagem.

Por essa técnica foram analisados os casos-índice de ambos os grupos, seus pais e parentes. O resultado da análise **AS-PCR** mostrou que 6 pacientes (nº 7, 11, 21, 26, 36 e 39) eram homozigotos para a mutação **35delG** e 3 heterozigotos (nº 31, 32 e 38) (figura 16). Dentre os homozigotos, os pacientes nº 21, 26, 36 e 39 apresentam antecedentes familiares de surdez, e dentre os heterozigotos o paciente nº 31. Em nenhum desses há relato de consanguinidade entre os genitores. Os pacientes que apresentaram a mutação **35delG** em heterozigose não possuem nenhuma alteração no outro alelo. O genótipo de todos os indivíduos detectados por esta técnica foram subsequenteemente confirmados por sequenciamento (tabela XV).

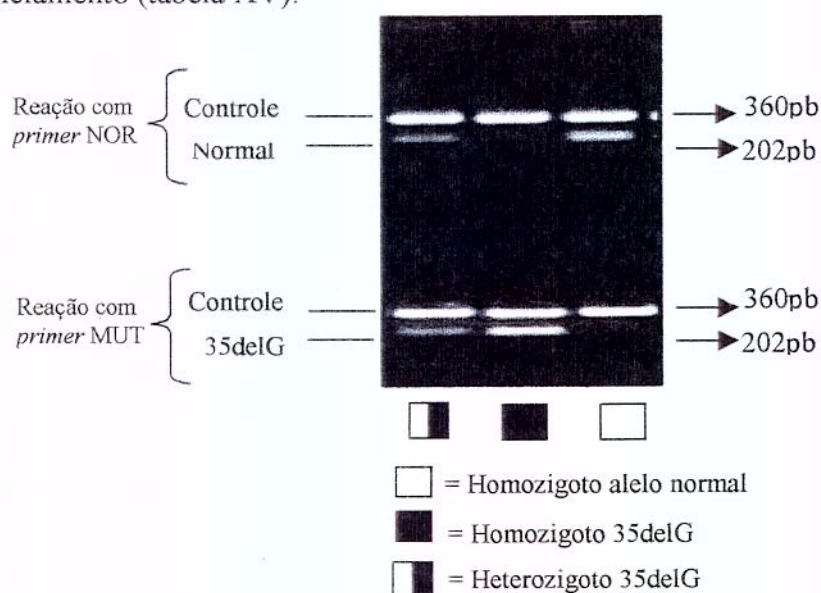


Figura 16 - AS-PCR para mutação 35delG. As bandas de 360pb indicam amplificação dos controles internos da reação utilizando os *primers* A e B; a banda de 202pb da reação utilizando o *primer* NOR, indica amplificação do alelo normal para a mutação 35delG; a banda de 202pb da reação utilizando o *primer* MUT, indica amplificação do alelo com a mutação 35delG.

A figura 17 ilustra a mutação **35delG** observada em gel de sequenciamento em um dos pacientes em homozigose e em heterozigose, e em um indivíduo apresentando a sequência normal.

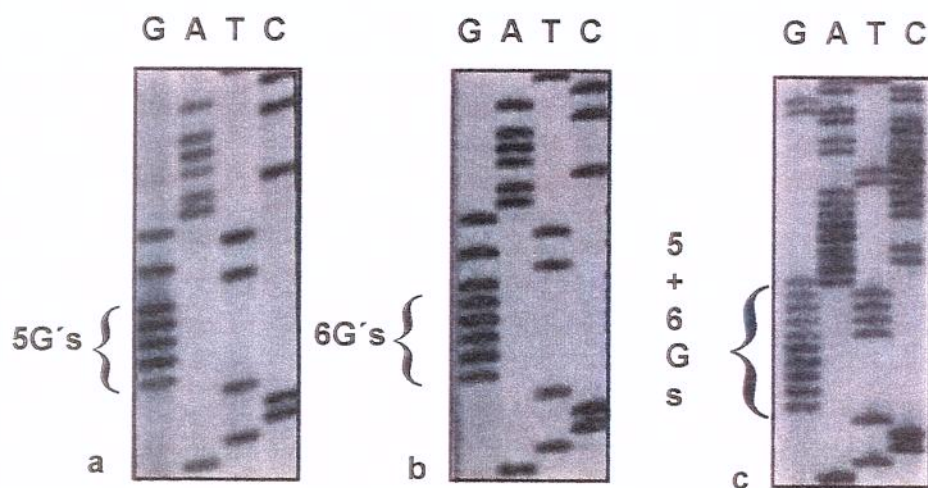


Figura 17 - (a) Deleção (em homozigose) da base G na posição 35 (**35delG**) no paciente nº 7; (b) Paciente nº 25 apresentando a sequência normal com os **6Gs** (6 Guaninas); (c) Mutação **35delG** em heterozigose no paciente nº 32.

4.1.2 - Identificação da mutação 167delT

A mutação **167delT** no gene **GJB2** foi analisada por digestão enzimática pela enzima de restrição *Pst* I. Fizeram parte dessa análise os pacientes do grupo A que não apresentaram a mutação **35delG**. Em nenhum paciente constatou-se a presença de alelos mutantes. Na figura 18 estão ilustrados os resultados da digestão do produto de PCR (fragmento *Cx1*) de alguns pacientes obtidos em gel de agarose.

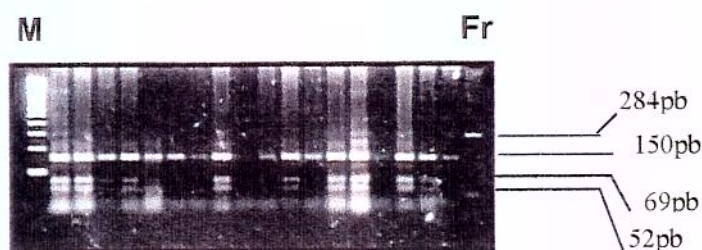


Figura 18 – Resultado da análise da mutação 167delT por digestão pela enzima de restrição *Pst* I em alguns indivíduos. M- marcador de peso molecular (100pb Gibco BRL®). Fr- fragmento Cx1 da PCR sem digerir (284pb). A mutação 167delT aboli o sítio de *Pst* I. Indivíduos com os alelos mutantes apresentam as bandas de 218pb, 52bp e 15pb; indivíduos com os alelos normais apresentam as bandas de 150pb, 69pb, 52pb e 15pb.

4.1.3 – Análise da sequência codificante do gene **GJB2**

O sequenciamento completo do gene **GJB2** direto do produto de PCR foi realizado nos indivíduos do grupo A e do grupo B que não foram detectadas as mutações **35delG** e/ou **167delT** em homozigose.

O paciente nº15 é um heterozigoto composto. O sequenciamento direto do PCR revelou uma transição 283 G→A em heterozigose no códon 95 que leva à substituição do aminoácido Valina para Metionina (**V95M**). Revelou também regiões borradas e pouco nítidas que correspondiam às sequências nucleotídicas do códon 37 sugerindo a existência de uma outra mutação. Para verificar esta suposição, realizou-se a clonagem molecular do gene **GJB2** deste paciente. O sequenciamento dos clones confirmou a mutação **V95M** e identificou a mutação **V37I** (transição 109 G→A). Esta mutação leva à substituição do aminoácido Valina para Isoleucina no códon 37. Ela ocorre no primeiro domínio transmembrânico da conexina 26. Ambas mutações foram descritas previamente por KELLEY *et al.* (1998). Também foi possível confirmar pela análise molecular de 9 clones a condição do paciente como heterozigoto composto: as mutações **V95M** e **V37I** estão localizadas em alelos diferentes (figura 19).

A análise por sequenciamento dos membros da família revelaram que os pais são heterozigotos para as mutações **V95M** e **V37I** (1 em cada alelo). A mutação **V95M** está

presente no pai e a **V37I** em sua mãe. O irmão que também apresenta deficiência auditiva é heterozigoto composto para as mutações **V95M/V37I** (tabela XV).

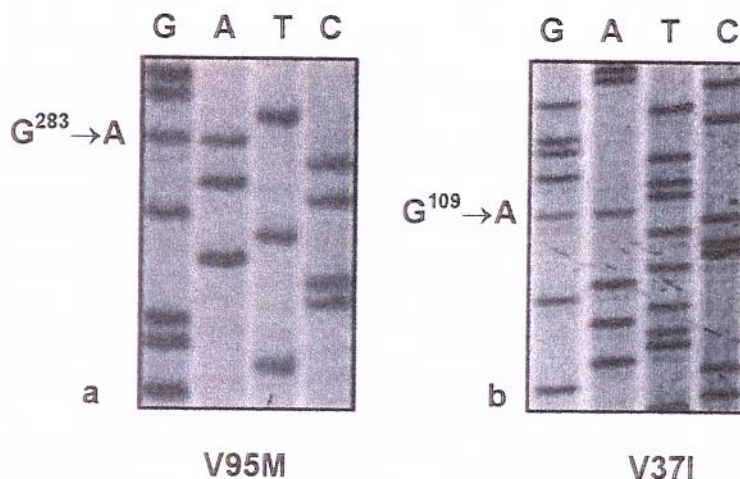


Figura 19 - Análise da sequência de DNA do gene **GJB2** do paciente n° 15. (a) heterozigoto composto para a mutação **V95M**; (b) heterozigoto composto para a mutação **V37I**.

No paciente n°37, a análise da sequência codificante do gene **GJB2** identificou a mutação **35delG** em um alelo, a qual é caracterizada pela deleção de 1 guanina na posição 35. No outro alelo foi observado a mutação **delE120**. Esta mutação é responsável pela deleção do aminoácido ácido glutâmico no códon 120 (GAG) (figura 20).

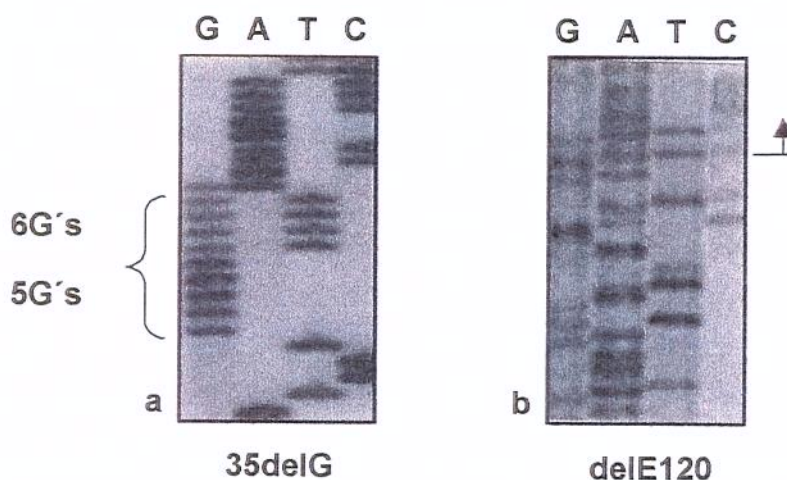


Figura 20 - Sequenciamento de DNA do gene **GJB2** no paciente n°37. (a) heterozigoto composto para a mutação **35delG**. (b) heterozigoto composto para a mutação **delE120**.

4.1.4 - Detecção de polimorfismos

A partir do fragmento amplificado do gene **GJB2** pela técnica de PCR, e posteriormente sequenciamento direto, foi possível observar a presença de um polimorfismo. O polimorfismo Valina/Isoleucina no códon 27 foi identificado nos pacientes nº 17 e 33 em heterozigose, ambos com surdez esporádica. A variação G/A na posição 79 do gene **GJB2** foi previamente descrita por KELLEY *et al.* (1998) (figura 21).

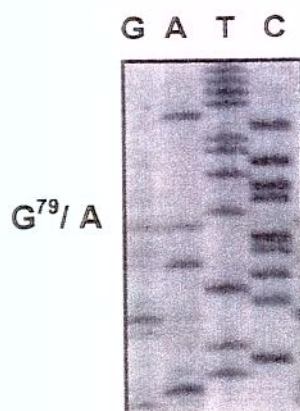


Figura 21 - Gel de sequenciamento mostrando o polimorfismo **V27I** no gene **GJB2** em heterozigose.

4.1.5 – Resumo das alterações encontradas no gene **GJB2**

Foram encontradas mutações no gene **GJB2** em 8 das 36 famílias estudadas (grupo A) (22%). No grupo A, metade dos 10 pacientes com recorrência familiar e 3 dos casos isolados (11,5%) têm mutações no gene **GJB2**. Em 3 pacientes, há apenas um alelo mutado. A mutação **35delG** acometeu 84,2% (16/19) dos alelos mutados no gene **GJB2**. Três outras mutações foram observadas: **V95M**, **V37I**, **dele120**. Seis pacientes são homozigotos para **35delG**, dois são heterozigotos compostos, e 3 são heterozigotos (tabela XVI). Nas amostras como um todo, a deficiência auditiva pré-lingual foi observada em 9 dos 11 pacientes com mutação no gene **GJB2** e, em 21 dos 28 pacientes com alelos normais (probabilidade exata de Fisher = 0,501). Do mesmo modo, a deficiência auditiva

profunda foi observada em 10 dos 11 pacientes com mutação na conexina 26 e, em 20 dos 28 pacientes com alelo normal (probabilidade exata de Fisher = 0,194).

Tabela XVI – Fenótipo e genótipo dos pacientes com mutações no gene *GJB2*.

PACIENTE	IDADE DE INÍCIO DA SURDEZ	GRAU DE PERDA	MUTAÇÃO (ALELO1/ALELO2)	RECORRÊNCIA FAMILIAL
GRUPO A				
7	Pré-lingual	Profunda	35delG/35delG	---
11	Pré-lingual	Profunda	35delG/35delG	---
15	Pós-lingual	Profunda	V95M/V37I	Irmão
21	Pré-lingual	Profunda	35delG/35delG	Irmã
26	Pré-lingual	Profunda	35delG/35delG	Tias paterna
31	Pré-lingual	Profunda	35delG/N	Pai, mãe, tia materna, tia paterna
32	Pré-lingual	Profunda	35delG/N	---
36	Pré-lingual	Profunda	35delG/35delG	Irmãs
GRUPO B				
37	Pós-lingual	Moderada	35delG/delE120	Tio paterno
38	Pré-lingual	Profunda	35delG/N	---
39	Pré-lingual	Profunda	35delG/35delG	Irmão

4.2 - Rastreamento dos genes *PAX3* e *MITF*

Foram rastreados pela técnica de SSCP todos os exons dos genes *PAX3* e *MITF* dos pacientes do grupo A. Foram observadas duas alterações de migração no gel de poliacrilamida (*shift*), no exon 6 do gene *MITF* do paciente nº12 e no exon 6 do gene *PAX3* do paciente nº 15. A figura 22 ilustra os *shifts* encontrados pela técnica de SSCP.



Figura 22 – Gel de poliacrilamida demonstrando o padrão anormal de migração de bandas (*shifts*). (a) Técnica de SSCP do exon 6 do gene **MITF**; (b) exon 6 do gene **PAX3**.

Após a identificação de padrões anormais de migração das bandas em eletroforese, ambos os fragmentos foram sequenciados. No exon 6 do gene **MITF** do paciente n° 12 não foi encontrada nenhuma mutação em regiões codificantes, podendo o *shift* ser um artefato de técnica.

No exon 6 do gene **PAX3** do paciente n° 15, foi encontrada uma mutação silenciosa ($G^{879} \rightarrow T$), como ilustra a figura 23. Uma vez que, nesse mesmo paciente foram encontradas mutações no gene **GJB2** (**V95M/ V37I**), a mutação observada em SSCP não é responsável pelo fenótipo do paciente.

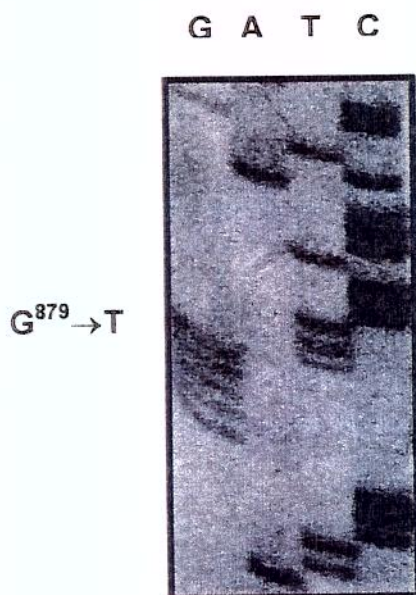


Figura 23 - Sequenciamento do gene **PAX3** (exon 6) mostrando a mutação silenciosa ($G^{879} \rightarrow T$).



discussão

5 - DISCUSSÃO

5.1 - Mutações no gene GJB2

Já foram descritas mais de 50 mutações diferentes no gene **GJB2** levando a interrupção da circulação de íons nas *gap junctions* e, conseqüentemente, surdez. As alterações moleculares variam desde mutações pontuais (transições, transversões) até pequenas deleções de nucleotídeos. Algumas mutações ocorrem em diversos grupos étnicos e regiões geográficas distintas, podendo se tratar de *hot spots* nesse gene. Em outras situações, a alta frequência de uma determinada mutação num mesmo grupo étnico é considerada como oriunda de um mesmo ancestral comum por meio de um efeito do fundador.

As mutações detectadas neste trabalho são mutações do tipo *missense*, já descritas na literatura, que conduzem à substituição de aminoácidos em regiões conservadas na proteína conexina 26, sugerindo que esses resíduos são importantes para a atividade da proteína. Também foram detectadas deleções já descritas no gene **GJB2**. Seis pacientes são homozigotos para as mutações detectadas e 5 são heterozigotos (grupos A e B), sendo que em dois destes foram detectadas mutações em configuração *trans* (heterozigotos compostos).

Mutações no gene **GJB2** foram encontradas em 22% das famílias do grupo A, valor semelhante ao obtido por WILCOX *et al.* (2000) (26%), indicando que a análise molecular desse gene em pacientes com deficiência auditiva não síndrômica deve ser o primeiro passo na determinação das causas de perda auditiva em nosso país. Isto é particularmente verdadeiro para os casos familiares, onde mutações neste gene foram encontradas em 50% dos casos, mas também para os casos esporádicos, cujas mutações estão presentes em 11,55% (aproximadamente 1:9). Entre as famílias com surdez não síndrômica estudadas no Mediterrâneo, 49% dos casos com padrão de herança autossômico recessivo e 37% dos casos esporádicos apresentam mutações no gene **GJB2** (ESTIVILL *et al.*, 1998).

O encontro de uma frequência menor de mutações entre os casos esporádicos no presente trabalho pode ser devido à inclusão, na amostra estudada, de pacientes com surdez de causa ambiental que não tenham sido diagnosticadas durante a avaliação clínica. De fato, em vários casos faltam informações precisas por parte da família acerca de intercorrências durante a gestação, o parto e o período peri-natal.

Quanto à frequência observada entre casos familiares (50%), os resultados obtidos não podem ser comparados com os de outros estudos, uma vez que foi levada em consideração, neste trabalho, a recorrência de surdez em parentes de primeiro e segundo graus independente de haver ou não um típico padrão de herança autossômico recessivo. Uma vez que as mutações no gene **GJB2** não são raras, casos de pseudodominância podem ser encontrados na população com maior frequência. Um exemplo disso é o paciente 26, cujos pais têm audição normal e que tem duas tias paternas com surdez, o que sugeriu, inicialmente, que se estivesse diante de um caso de herança autossômica dominante com penetrância incompleta. É importante, assim, que nos casos com recorrência familiar sem uma distribuição típica de herança autossômica recessiva não se exclua a possibilidade de que a surdez seja decorrente de mutações da conexina 26.

O fato de nenhum dos pacientes com mutações no gene **GJB2** ter sido gerado por um casal consanguíneo reforça a hipótese de que essas mutações não são raras na população brasileira. Isso já havia sido sugerido pelo encontro, em uma amostra de recém-nascidos da região de Bragança Paulista, SP, de uma taxa de portadores da mutação **35delG** de 0,97% (SARTORATO *et al.*, 2000). A figura 24 resume as mutações encontradas neste trabalho; a seguir, são discutidos os achados relativos a cada paciente comparando-os aos casos descritos na literatura pertinente.

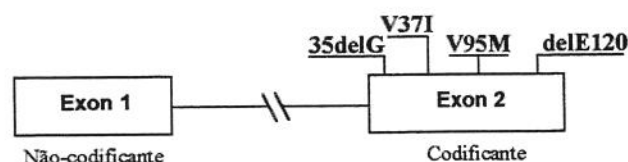


Figura 24 - Mutações descritas neste trabalho.

Mutações V95M e V37I

O paciente nº 15 (grupo A) é heterozigoto composto para as mutações (**V95M/V37I**). Este paciente, de 9 anos de idade, sexo feminino, apresenta deficiência auditiva pós-lingual profunda. Seu irmão mais novo é igualmente afetado e tem as mesmas mutações. Já a análise dos membros da família da paciente nº 31 revelou dois outros indivíduos com deficiência auditiva heterozigotos para a mutação **V95M**. Considerando o pequeno número de indivíduos estudados, a detecção da mutação **V95M** em duas famílias não relacionadas (casos 15 e 31) indica que esta pode ser uma mutação freqüente.

A mutação *missense* **V95M** converte o aminoácido valina em metionina, e ocorre na interfase entre o domínio de ligação citoplasmático (CL) e o segundo domínio transmembrânico (M2) da proteína Cx26. O efeito desta mutação na proteína ainda não foi determinado, visto que o aminoácido metionina já foi encontrado nesta posição em α conexinas; entretanto, somente o aminoácido valina é encontrado em β conexinas, como é o caso da **Cx26**. Desse modo, o aminoácido metionina substitui uma valina invariante em β conexinas.

A alteração **V95M** foi previamente descrita em um paciente heterozigoto composto com a mutação **M34T**, a qual se supôs inicialmente que fosse uma mutação dominante (candidata ao *locus* DFNA3) identificada em uma família com ceratodermia palmoplantar (**PPK**) e diferentes formas de surdez (KELSELL et al., 1997). Análises subsequentes dos membros 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). A associação da mutação **M34T** em *trans* com os alelos **V95M**, **R184W**, e **35delG** em indivíduos com deficiência auditiva neurosensorial sugere um modo de herança autossômico recessivo (KELLEY et al., 1998; WILCOX et al., 2000). Estudos posteriores confirmaram esses relatos. HOUSEMAN et al. (2001) encontrou a mutação **M34T** em homozigose em um indivíduo com deficiência auditiva pré-lingual leve a moderada.

A segunda mutação encontrada no paciente nº 15 (mutação **V37I**) envolve a conversão do códon 37 de valina para isoleucina no primeiro domínio transmembrânico (M1) da **Cx26**. Embora essa mutação tenha sido originalmente considerada como um polimorfismo sem efeito patogênico, uma vez que havia sido encontrada em heterozigose em um indivíduo controle não portador de deficiência auditiva, a conservação de valina nesta posição entre diferentes conexinas e a identificação de um indivíduo surdo homozigoto para a mutação **V37I** sugere que esta substituição seja crítica (RABIONET *et al.*, 2000).

Mutação 35delG

Embora a mutação **35delG** seja, de um modo geral, a principal mutação no gene **GJB2** responsável por surdez congênita, está claro que há um grande número de diferentes mutações neste gene em diferentes países, e que a frequência dessas mutações varia de uma população para outra. Neste trabalho, a mutação **35delG** acometeu 84,2% dos alelos mutados. A relação da alta frequência observada dessa mutação com a composição étnica da população brasileira é difícil de ser estabelecida devido à alta heterogeneidade da população brasileira, que inclui indivíduos de origem caucasóide, africana e ameríndia.

A mutação **35delG**, observada em diferentes populações mundiais, foi identificada em homozigose neste trabalho em 6 pacientes (5 pertencentes ao grupo A e 1 ao grupo B). Apesar da mutação **35delG** poder causar perda auditiva de grau variável entre os indivíduos homozigotos e mesmo entre indivíduos pertencentes a uma mesma irmandade (DENOYELLE *et al.*, 1997), todos os casos índices que apresentaram o genótipo **35delG/35delG** neste trabalho apresentavam deficiência auditiva pré-lingual profunda. Em 4 desses 6 pacientes há história de recorrência familiar de surdez.

Embora o encontro de mutações no gene **GJB2** tenha sido mais frequente nos pacientes com surdez pré-lingual profunda, esta associação não foi significativa, o que pode ser devido ao tamanho amostral. Segundo KELLEY *et al.*, (1998), não haveria correlação entre mutações específicas na conexina 26 e o grau da perda auditiva. De acordo com

SOBE *et al.* (2000) haveria uma correlação genótipo/fenótipo com relação à idade de início da surdez.

A análise de mutações no gene **GJB2** dos membros da família do paciente nº36, na qual há quatro irmãs com surdez, duas delas com deficiência auditiva pré-lingual profunda e duas com desenvolvimento normal da fala e deficiência auditiva neurossensorial moderada, revelou que todas as meninas são homozigotas para a mutação **35delG**, mostrando mais uma vez que a gravidade da surdez pode variar entre indivíduos da mesma família. Embora este possa ser um encontro raro, deve-se considerar a possibilidade de que a surdez associada a mutações no gene da conexina 26 possa não ser diagnosticada até a idade adulta.

A mutação **35delG** foi também encontrada em heterozigose em 3 pacientes (2 do grupo A, 1 grupo B) com deficiência auditiva pré-lingual profunda. O paciente nº 31, do sexo feminino, foi avaliada com 1 ano de idade. A análise molecular dos seus familiares revelaram que sua mãe e tia materna, ambas com surdez profunda, apresentam a mutação **V95M** em um alelo, enquanto no outro alelo não foi detectada nenhuma mutação. Este alelo supostamente sem mutação no gene **GJB2** foi herdado pela propósita junto com a mutação **35delG** de origem paterna. O pai apresenta deficiência auditiva e a mutação **35delG** em homozigose. A mutação **V95M** na mãe originou-se da avó materna, a qual apresenta audição normal. Na propósita, o alelo supostamente normal originou-se do avô materno, que possui os dois alelos normais e não apresenta deficiência auditiva, conforme ilustra o heredograma do anexo 1.

De acordo com WILCOX *et al.* (2000), existem quatro possíveis explicações para tais observações: (1) As mutações não observadas no gene **GJB2** podem estar em regiões não codificantes, mas afetando a expressão gênica. Entretanto, nenhuma mutação intrônica foi descrita nesses casos até o momento para confirmar essa hipótese. (2) Outros genes (incluindo outros genes de conexinas) podem afetar a capacidade do alelo normal funcionar adequadamente, exercendo um efeito dominante negativo sobre o alelo normal, pois a supressão da proteína produzida pelo alelo normal dependeria do background genético do

indivíduo. (3) Outra hipótese é a de que a mutação no gene **GJB2** em heterozigose possa estar presente ao acaso e não estar relacionada com a surdez. O caso da paciente nº 31, porém, exemplifica claramente a não casualidade da surdez observada em heterozigotos, uma vez que o alelo aparentemente normal segrega com a surdez. Finalmente (4), poder-se-ia pensar na possibilidade de que mutações no gene **GJB2** em heterozigose associadas a fatores ambientais resultem em um efeito dominante.

Recentemente, demonstrou-se que aproximadamente 42% das crianças com surdez que apresentam mutações na conexina 26 apresentam um alelo aparentemente normal, o que tem implicações importantes para a pesquisa genética de mutações na **Cx26** (WILCOX *et al.*, 2000), já que nesses casos fica bastante dificultado o aconselhamento genético das famílias. Esses achados devem, ainda, ser levados em consideração pelos responsáveis por programas que visem o *screening* populacional de mutações no gene **GJB2**.

Mutação delE120

A mutação **delE120** foi detectada no paciente nº 37 (grupo B). Este paciente possui um tio paterno com deficiência auditiva profunda sem qualquer alteração na **Cx26**; neste caso, a surdez pode ser decorrente de fatores ambientais ou mutações em outro gene que não o **GJB2**. A mutação **delE120** está localizada em uma sequência repetida (GAG / GAG), e leva à perda do ácido glutâmico na posição 120 do gene **GJB2**; nesse paciente, foi encontrada em heterozigose composta com a mutação **35delG**. O encontro dessas duas mutações em um mesmo paciente também foi descrita por RABIONET *et al.*(2000). Essas mutações estão situadas no domínio intracelular da proteína **Cx26**; nessa região, a maioria das alterações encontradas são deleções. Os efeitos fisiopatológicos da mutação **delE120** na proteína devem ainda ser estudados para que se possa compreender quais os defeitos causados nos mecanismos de *gap junctions* envolvidos.

5.2 - Polimorfismos

No gene **GJB2** foram encontrados até o momento 8 polimorfismos que conduzem a variantes alélicas consideradas normais na população. O polimorfismo **V27I** (79G/A) foi encontrado nos pacientes nº 17 e 33 em heterozigose (grupo A); em ambos os casos a deficiência auditiva é esporádica. Já descrito em muitos trabalhos, esse polimorfismo está localizado no primeiro domínio transmembrânico da proteína **Cx26** e envolve a conversão do aminoácido Valina para Isoleucina no códon 27. O paciente nº 17 tem uma irmã com audição normal que apresenta genótipo idêntico ao seu. Estudos populacionais indicam que não há correlação entre a alteração **V27I** e a perda auditiva, uma vez que esta é observada na população normal. Em japoneses observa-se uma frequência extremamente alta desse polimorfismo (ABE *et al.*, 2000).

5.3 - Pacientes com etiologia não definida

Dos 36 pacientes (grupo A) com quadro clínico de deficiência auditiva neurosensorial não sindrômica analisados neste trabalho, 28 não apresentaram qualquer alteração molecular no gene **GJB2**. Não se pode descartar a hipótese de que a surdez em alguns desses indivíduos pudesse ser decorrente de mutações em regiões de intron que, dependendo da amplitude da PCR, não são amplificadas e escapam a qualquer análise por sequenciamento (WILCOX *et al.*, 2000). Apesar destas mutações estarem localizadas em regiões não traduzidas do gene, que não fazem parte da proteína madura, podem comprometer a expressão correta do gene ou o processamento do pré - RNA mensageiro. Outra explicação para esses resultados seria a existência de mutações em outros genes que determinam surdez neurosensorial não sindrômica ou ainda ser devida a causas ambientais não identificadas durante a avaliação clínica.

5.4 - Relevância do diagnóstico molecular

Nossos resultados demonstram que a análise molecular de indivíduos com deficiência auditiva é extremamente relevante em nossa população. A natureza genética dos

casos esporádicos de surdez muitas vezes não é suspeitada, e as famílias que possuem um único indivíduo com perda auditiva neurosensorial não sindrômica certamente se beneficiarão dessas análises.

Com o avanço das pesquisas nessa área, pode-se observar a importância dos estudos de mutações no gene **GJB2**. O grande número de casos com mutações identificadas neste gene faz com que aumentem as expectativas com relação ao aconselhamento genético. Nesse momento, devido à facilidade de detecção de mutações na conexina 26, este é o primeiro gene indicado para análise molecular em famílias que apresentam deficiência auditiva neurosensorial (SOBE *et al.*, 2000).

A viabilidade e os benefícios de *screening* de mutações na **Cx26** estão se refletindo na saúde pública. O uso de testes moleculares na **Cx26** em conjunto com os audiológicos ajudarão na detecção precoce da surdez, o que é de extrema importância no manejo desses 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.

5.5 - Genes **PAX3** e **MITF**

No rastreamento de mutações dos genes **PAX3** e **MITF**, responsáveis pela síndrome de Waardenburg, foram observadas algumas variações de mobilidade em gel pela técnica de SSCP; no entanto, somente uma mutação silenciosa, já descrita anteriormente, foi encontrada no gene **PAX3**. Desse modo, as outras alterações observadas devem ser decorrentes de artefatos da técnica, uma vez que os fragmentos dos genes com variação na mobilidade durante a corrida em gel de poliacrilamida foram subsequentemente sequenciados e nenhuma mutação foi encontrada. Pode-se supor, portanto, que mutações nesses genes não estão associadas com frequência a surdez não sindrômica em nosso meio.

 conclusões

6 - CONCLUSÕES

A análise molecular do gene **GJB2** em 36 pacientes com surdez neurossensorial não síndrômica previamente avaliados do ponto de vista clínico permitiu a identificação de mutações em 22% dos casos. Por outro lado, não foram detectadas mutações nos genes **PAX3** e **MITF** em nossa casuística, o que sugere que não estejam frequentemente envolvidas em formas não síndrômicas de surdez em nosso meio.

Pode-se estimar, com este estudo, que em nosso meio 50% dos casos de surdez com recorrência em parentes de primeiro ou segundo grau e 11,5% dos casos esporádicos, de etiologia não esclarecida, são decorrentes de mutações na **Cx26**.

O teste para determinação da mutação **35delG** pode servir como apoio aos testes audiológicos em recém-nascidos; considerando que homozigotos para a mutação **35delG** podem apresentar perda auditiva de leve a profunda ou mesmo progressiva, o diagnóstico molecular precoce pode ser essencial para que as crianças sejam estimuladas na fase de desenvolvimento da linguagem.

Este estudo permitiu o diagnóstico e aconselhamento genético de aproximadamente 1/4 das famílias estudadas. Os dados obtidos confirmaram a alta prevalência, em nosso meio, da deficiência auditiva neurossensorial de forma autossômica recessiva devida a mutações no gene **GJB2**, além de confirmar a alta prevalência da mutação **35delG** (84,2% dos alelos mutados).

Não houve associação significativa entre as características clínicas de surdez (época de manifestação e o grau de perda auditiva) e a presença de mutações no gene **GJB2**.



ummary

7 – SUMMARY

WHO data show that 10% of world population carry some hearing loss and this prevalence tends to increase with age. In Brazil, there is no official studies about deafness prevalence. Hearing impairment is a frequent disorder that affects one in 1000 children. In developed countries, about 60% of the cases of isolated deafness have a genetic origin. Although the majority of cases of hearing loss in Brazil are due to environmental factors, the proportion of genetic causes tend to increase as a result of improvement in health care. Recent progress in research on deafness genes led to localization of at least 20 genes that cause nonsyndromic autosomal recessive deafness (NSRD). The GJB2 gene, which encodes the connexin 26 molecule, was the first to be associated with NSRD and is considered the main cause of genetic deafness in man. The connexin 26 is a protein component of the gap junctions, which connect adjacent cells allowing small molecules to pass from one to the next. They are found on the epithelial supporting cells surrounding the sensory hair cells of the cochlea and on the fibrocytes lining the cochlear duct. Mutations in the GJB2 gene have been identified in many populations; one of them, 35delG, is particularly common among Caucasoids from southern Europe. In a city near Campinas, the carrier rate of 35delG was estimated in neonates as 0.97%. In order to determine the frequency and type of connexin 26 mutations among patients with nonsyndromic hearing loss, the analysis of mutations in the GJB2 gene were performed in 39 Brazilian families with either familial or sporadic deafness. A previous clinical evaluation was carried out on 36 index cases (group A) in order to rule out as much as possible the influence of environmental factors on the etiology of deafness in these patients. Clinical and molecular data from three other deaf patients with connexin 26 mutation (group B) were also taken in account. Mutations in the GJB2 gene were found in 8 of the 36 families from group A (22%), including half of the 10 patients with familial deafness and 3 of the 26 isolated cases (11.5%). The 35delG mutation accounted for 84,2% (16/19) of the GJB2 mutated alleles. Three other mutations were observed: V95M, V37I and delE120. Six patients were homozygous for 35delG mutation, two were compound heterozygous, and three were apparently heterozygous for 35delG. The polymorphism V27I was found in two sporadic cases. These results indicate that also in Brazil connexin 26 mutations are a major source of genetic deafness. As a consequence, a systematic search for these mutations is necessary in individuals presenting nonsyndromic deafness, either hereditary or sporadic of unknown origin in order to allow genetic counseling and also early diagnosis of other affected children in these families.



eferências Bibliográficas

8 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABE, S.; USANI, S.; SHINKAWA H.; KELLEY, P.M.; KIMBERLING, W.J. - Prevalent connexin 26 gene (GJB2) mutations in Japanese. **J. Med. Genet.**, **37**:41-3, 2000.
- ALBERTS, B.; BRAY, D.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WATSON, J.D. - Molecular biology of the cell. Barcelona, Ediciones Omega S.A., 1989.
- ANTONIADI, T.; RABIONET, R.; KROUPIS, C.; APERIS, G.A.; ECONOMIDES, J.; PETMEZAKIS, J.; ECONOMOU-PETERSEN, E.; ESTIVILL, X.; PETERSEN, M.B. - High prevalence in the Greek population of the 35delG mutation in the connexin 26 gene causing prelingual deafness. **Clin. Genet.**, **55**(5):381-382, 1999. [Letter]
- AVRAHAN, KB. - Motors, channels and sounds of silence. **Nat. Med.**, **3**(6):608-609, 1997.
- BROBBY, G.W.; MULLER-MYHSOK, B.; HORSTMANN, R.D. - Connexin 26 R143W mutation associated with recessive non-syndromic sensorineural deafness in Africa. **N. Engl. J. Med.**, **338**(8):548-50, 1998. [Letter]
- 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.
- CARRASQUILLO, M.M.; ZLOTOGORA, J.; BARGES, S.; CHAKRAVARTI, A. - Two different connexin 26 mutations in an inbred kindred segregating non-syndromic recessive deafness: implications for genetic studies in isolated populations. **Hum. Mol. Genet.** **6**(12):2163-72, 1997.
- CHEN, Z-Y; HASSON, T.; KELLEY, P.M.; SCHWENDER, B.J.; SCHWARTZ, M.F.; RAMAKRISHNAN, M.; KIMBERLING, W.J.; MOOSEKER, M.S.; COREY, D.P. - Molecular cloning and domain structure of human Myosin-VIIa, the gene product defective in Usher syndrome 1B. **Genomics**, **36**: 440-448, 1996.

- COHN, E.S.; KELLEY, P.M.; FOWLER, T.W.; GORGA, M.P.; LEFKOWITZ, D.M.; KUEHN, H.J.; SCHAEFER, G.B.; GOBAR, L.S.; HAHN, F.J.; HARRIS, D.J.; KIMBERLING, W.J. - Clinical studies of families with hearing loss attributable to mutations in the connexin 26 gene (GJB2/DFNB1). **Pediatrics**, **103**(3):546-50, 1999.
- DE KOK, Y.J.; VAN DER MAAREL, S.M.; BITNER-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 POU3F4 domain gene. **Science**, **267**:685-88, 1995.
- DENOYELLE, F.; MARLIN, S.; WEIL, D.; MOATTI, L.; CHAUVIN, P.; ÉRÉA-NOËL, G.; PETIT, C. - Clinical features of the prevalent form of childhood deafness, DFNB1, due to a connexin-26 gene defect: implications for genetic counseling. **Lancet**, **353** (17):1298-1303, 1999.
- DENOYELLE, F.; LINA-GRANADE, G.; PLAUCHU, H.; BRUZZONE, R.; CHAIB, H.; LEVI-ACOBAS, F.; WEIL, D.; PETIT, C. - Connexin 26 gene linked to a dominant deafness. **Nature**, **393**:319-320, 1998.
- 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.
- ESTIVILL, X.; FORTINA, P.; SURREY, S.; RABIONET, R.; MELCHIONDA, S.; D'AGRUMA, L.; MANSFIELD, E.; RAPPAPORT, E.; GOVEA, N.; MILÀ, M.; ZELANTE, L.; GASPARINI, P. - Connexin-26 mutations in sporadic and inherited sensorineural deafness. **Lancet**, **351**: 394-98, 1998.

- FISCHEL-GHODSIAN, N. - Genetic factors in aminoglycoside toxicity. **Ann. N.Y. Acad. Sci.**, **884(28)**:99-109, 1999.
- 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.
- FORGE, A.; BECKER, D.; CASALOTTI, S.; EDWARDS, J.; EVANS, W.H.; LENCH, N.; SOUTER, M. - Gap junctions and connexin expression in the inner ear. **Novartis. Found. Symp. Rev.**, **219**:134-50, 1999.
- FUSE, Y.; DOI, K.; HASEGAWA, T.; SUGII, A.; HIBINO, H.; KUDO, T. - Three novel connexin 26 gene mutations in autosomal recessive non-syndromic deafness. **Neuroreport**, **10(9)**:1853-7, 1999.
- GABRIEL, H.D.; JUNG, D.; BUTZLER, C.; TEMME, A.; TRAUB, O.; WINTERHAGER, E.; WILLECKE, K. - Transplacental uptake of glucose is decreased in embryonic lethal connexin26-deficient mice. **J. Cell. Biol.**, **140**:1453-1460, 1998.
- GASPARINI, P.; RABIONET, R.; BARBUJANI, G.; MELCHIONDA, S.; PETERSEN, M.; BRONDUM-NIELSEN, K.; METSPALU, A.; OITMAA, E.; PISANO, M.; FORTINA, P.; ZELANTE, L.; ESTIVILL, X. - High carrier frequency of the 35delG deafness mutation in European populations. **Eur. J. Hum. Genet.**, **8**:19-23, 2000.
- GIBSON, F.; WALSH, J.; MBURU, P.; VARELA, A.; BROW, K.A.; ANTONIO, M.; BEISEL, K.W.; STEEL, K.P.; BROWN, S.D.M. - A type VII myosin encoded by the mouse deafness gene *shaker-1*. **Nature**, **374**:62-64, 1995.
- GORLIN, R.J. - Genetic hearing loss with no associated abnormalities. In: Gorlin, R.J. ; Toriello, H.V.; Cohen, M.M. (ed), **Hereditary hearing loss and its syndromes**. New York, Oxford University Press, 1995. p. 43-61.

- GREEN, G.E.; SCOTT, D.A.; MCDONALD, J.M.; WOODWORTH, G.G.; SHEFFIELD, V.C.; SMITH, R.J.H. - Carrier raters in the Midwestern United States for GJB2 mutations causing inherited deafness. **JAMA.**, **281(23)**:2211-6, 1999.
- GRIFA, A.; WAGNER, C.A.; D'AMBROSIO, L.; MELCHIONDA, S.; BERNARDI, F.; LOPEZ-BIGAS, N.; RABIONET, R.; ARBONES, M.; MONICA, M.D.; 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. [Letter]
- GUILFORD, P.; AYADI, H.; BLANCHARD, S.; CHAIB, H.; LE PASLIER, D.; WEISSENBAACH, J.; DRIDA, M.; PETIT, C. - A human gene responsible for neurosensory, non-syndromic recessive deafness is a candidate homologue of the mouse *sh-1* gene. **Hum. Mol. Genet.**, **3(6)**:989-93, 1994.
- GUYTON, A.C. & HALL, J.E. - Tratado de Fisiologia Médica. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan S.A., 1996.
- HANAHAN, D. - Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. **J. Mol. Biol.**, **166**:557-80, 1983.
- HEATHCOTE, K.; SYRRIS, P.; CARTER, N.D.; PATTON, M.A. - A connexin 26 mutation causes a syndrome of sensorineural hearing loss and palmoplantar hyperkeratosis. **J. Med. Genet.**, **37(1)**:50-1, 2000.
- HOLME, R.H. & STEEL, K.P. - Genes involved in deafness. **Current Opinion in Genetics & Development**, **9**:309-314, 1999.
- HOUSEMAN, M.J.; ELLIS, L.A.; PAGNAMENTA, A.; DI, W-L.; RICHARD, S.; OSBORN, *H.; DAHL, H-H.M.; TAYLOR, G.R.; BITNER-GLINDZICZ, M.; REARDON, W.; MUELLER, 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.
- JUNEJA, S.C.; BARR, K.J.; EDERS, G.C.; KIDDER, G.M. - Defects in the germ line and gonads of mice lacking connexin 43. **Biol. Reprod.**, **60**:1263-70, 1999.
- KALATZIS, V. & PETIT, C. The fundamental and medical impacts of recent progress in research on hereditary hearing loss. **Hum. Mol. Genet. Rev.**, **7**(10):1589-97, 1998.
- KELLEY, P.M.; HARRIS, D.J.; COMER, B.C.; ASKEW, J.W.; FOWLER, T.; SMITH, S.D.; KIMBERLING, W.J. - Novel mutations in the connexin 26 gene (GJB2) that cause autosomal recessive (DFNB1) hearing loss. **Am. J. Hum. Genet.**, **62**(4):792-99, 1998.
- 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-syndromic sensorineural deafness. **Nature**, **387**:80-83, 1997. [Letter]
- 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**:141-4, 2000.
- KIKUCHI, T.; KIMURA, R.S.; PAUL, D.L.; ADAMS, J.C. - Gap junctions in the rat cochlea: immunohistochemical and ultrastructural analysis. **Anat. Embryol. (Berl.)**, **191**(2):101-18, 1995.
- KRUTOVSKIKH, V. & YAMASAKI, H. - Connexin gene mutations in human diseases. **Mutation Research**, **462**:197-207, 2000.
- KUBISCH, C.; SCHROEDER, B.C.; 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**:437-446, 1999.

- KUDO, T.; IKEDA, K.; KURE, S.; MATSUBARA, Y.; OSHIMA, T.; WATANABE, K.; KAWASE, T.; NARISAWA, K.; TAKASAKA, T. - Novel mutations in the Connexin 26 gene (GJB2) responsible for childhood deafness in the Japanese population. **Am. J. Med. Genet.**, **90(2)**:141-145, 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. [Letter]
- LIU, X.Z.; WALSH, J.; MBURU, P.; KENDRICK-JONES, J.; COPE, M.J.T.V.; STEEL, K.; BROWN, S.D.M. - Mutation in the VIIA gene cause non-syndromic recessive deafness. **Nat. Genet.**, **16**: 188-190, 1997a. [Letter]
- LIU, X.Z.; WALSH, J.; TAMAGAWA, Y.; KITAMURA, K.; NISHIZAWA, M.; STEEL, K.P.; BROWN, S.D.M. - Autosomal dominant non-syndromic deafness caused by a mutation in the myosin VIIA gene. **Nat. Genet.**, **17(3)**:268-269, 1997b. [Letter]
- LIU, X.Z.; XIA, X.J.; XU, L.R.; PANDYA, A.; LIANG, C.Y.; BLANTON, S.H.; BROWN, S.D.M.; STEEL, K.P.; NANCE, W.E. - Mutations in connexin 31 underlie recessive as well as dominant non-syndromic hearing loss. **Hum. Mol. Genet.**, **9(1)**:63-67, 2000.
- LYNCH, E. D.; LEE, M.K.; MORROW, J.E.; WELCSH, P.L.; LEON, P.E.; KING, M.C. - Nonsyndromic deafness DFNA1 associated with mutation of the human homology of the Drosophila gene diaphanous. **Science**, **278**:1315-18, 1997.
- MARTIN, P.E.M.; COLEMAN, S.L.; CASALOTTI, S.O.; FORGE, A.; EVANS, W.H. - Properties of connexin 26 gap junctional proteins derived from mutations associated with non-syndromal hereditary deafness. **Hum. Mol. Genet.**, **8(13)**:2369-76, 1999.

- MCGUIRT, W.T.; PRASAD, S.D.; GRIFFITH, A.J.; KUNST, H.P.; GREEN, G.E.; SHPARGEL, K.B.; RUNGE, C.; HUYBRECHTS, C.; MUELLER, R.F.; LYNCH, E.; KING, M.C.; BRUNNER, H.G.; CREMERS, C.W.; TAKANOSU, M.; LI, S.W.; ARITA, M.; MAYNE, R.; PROCKOP, D.J.; VAN CAMP, G.; SMITH, R.J. - Mutations in COL11A2 cause non-syndromic hearing loss (DFNA13). **Nat. Genet.**, **23(4)**:413-9, 1999.
- MINOWA, O.; IKEDA, K.; SUGITANI, Y.; OSHIMA, T.; NAKAI, S.; KATORI, Y.; SUZUKI, M.; FURUKAWA, M.; KAWASE, T.; ZHENG, Y.; OGURA, M.; ASADA, Y.; WATANABE, K.; YAMANAKA, H.; GOTOH, S.; NISHI-TAKESHIMA, M.; SUGIMOTO, T.; KIKUCHI, T.; TAKASAKA, T.; NODA, T. - Altered cochlear fibrocytes in a mouse model of DFN3 nonsyndromic deafness. **Science**, **285**:1408-1411, 1999.
- MOLÉ, L.; BOZON, M.; ALLOISIO, N.; LATOUR, P.; VANDENBERGHE, A.; PLAUCHU, H.; COLLET, L.; EDERY, P.; GODET, J.; LINA-GRANADE, G. - A novel C202F mutation in the connexin 26 gene (GJB2) associated with autosomal dominant isolated hearing loss. **J. Med. Genet.**, **37**: 368-370, 2000.
- MORELL, R. J.; KIM, H.J.; HOOD, L.J.; GOFORTH, L.; FRIDERICI, K.; FISHER, R.; VAN CAMP, G.; BERLIN, C.I.; ODDOUX, C.; OSTRER, H.; KEATS, B.; FRIEDMAN, T.B. - Mutations in the connexin 26 gene (GJB2) among Askenazi Jews with nonsyndromic recessive deafness. **N. Engl. J. Med.**, **339(21)**:1500-5, 1998.
- 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)**:409-12, 1999.

- 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.
- PARKER, M.J.; FORTNUM, H.; YOUNG, I.D.; DAVIS, A.C. - Variations in genetic assessment and recurrence risks quoted for childhood deafness: a survey of clinical geneticists. **J. Med. Genet.**, **36**:125-130, 1999.
- 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.
- PREZANT, T.R.; AGAPIAN, J.V.; BOHLMAN, M.C.; BU, X.; OZTAS, S.; QIU, W.Q.; ARNOS, K.S.; CORTOPASSI, G.A.; JABER, L.; ROTTER, J.I. - Mitochondrial ribosomal RNA mutation associated with both antibiotic - induced and non-syndromic deafness. **Nat. Genet.**, **4**(3):289-294, 1993.
- RABIONET, R.; GASPARINI, P.; ESTIVILL, X. - Connexins and deafness Homepage. World wide web URL: <http://www.iro.es/cx26deaf.html>
- 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, 2000a.
- RABIONET, R.; ZELANTE, L.; LÓPEZ-BIGAS, N.; D'AGRUMA, L.; MELCHIONDA, S.; RESTAGNO, G.; ARBONÉS, M.L.; GASPARINI, P.; ESTIVILL, X. - Molecular basis of childhood deafness resulting from mutations in the GJB2 (connexin 26) gene. **Hum. Genet.**, **106**(1):40-44, 2000b.
- RICHARD, G.; WHITE, T.W.; SMITH, L.E.; BAILEY, R.A.; COMPTON, J.G.; PAUL, D.L.; BALE, S.J. - Functional defects of Cx26 resulting from a heterozygous missense mutation in a family with dominant deaf-mutism and palmoplantar keratoderma. **Hum. Genet.**, **103**(4):393-9, 1998.

- ROBERTSON, N.G.; LU, L.; HELLER, S.; MERCHANT, S.N.; EAVEY, R.D.; MCKENNA, M.; NADOL, J.B. JR.; MIYAMOTO, R.T.; LINTHICUM, F.H. JR.; LUBIANCA NETO, J.F.; HUDSPETH, A.J.; SEIDMAN, C.E.; MORTON, C.C.; SEIDMAN, J.G. - Mutations in a novel cochlear gene cause DFNA9, a human nonsyndromic deafness with vestibular dysfunction. **Nat. Genet.**, **20(3)**:299-303, 1998.
- SARTORATO, E.L.; GOTTARDI, E.; OLIVEIRA, C.A.; MAGNA, L.A.; ANNICHINO-BIZZACCHI, J.M.; SEIXAS, C.A.; MACIEL-GUERRA, A.T. - Determination of the frequency of 35delG allele in Brazilian neonates. **Clin. Genet.**, **58(1)**:339-340, 2000.
- SCOTT, D.A.; KRAFT, M.L.; CARMI, R.; RAMESH, A.; ELBEDOUR, K.; YAIRI, Y.; SRIKUMARI, S.; ROSENGREN, S.S.; MARKHAN, A.F.; MUELLER, R.F.; LENCH, N.J.; VAN CAMP, G.; SMITH, R.J.H.; SHEFFIELD, V.C. - Identification of mutations in the connexin 26 gene that cause autosomal recessive nonsyndromic hearing loss. **Hum. Mutat.**, **11**:387-394, 1998.
- 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. **Nat. Genet.**, **20**:319-320, 1998.
- STEEL, K.P. - The benefits of recycling. **Science**, **25**:1363-1364, 1999a.
- STEEL, K.P. - Genetic deafness: stop closer. **Pediatrics**, **103**(3):674, 1999b.
- STEEL, K.P. - A take on the tectorial membrane. **Nat. Genet.**, **24**:104, 2000a.
- STEEL, K.P. - New interventions in hearing impairment. **BMJ**, **320**:622-5, 2000b.
- TASSABEHJI, M.; NEWTON, V.E.; READ, A.P. - Waardenburg syndrome type 2 caused by mutations in the human microphthalmia (MITF) gene. **Nat. Genet.**, **8**:251-255, 1994a.
- TASSABEHJI, M.; NEWTON, V.E.; LEVERTON, K.; TURNBULL, K.; SEEMANOVA, E.; KUNZE, J.; SPERLING, K.; STRACHAN, T.; READ, A.P. - PAX3 gene structure and mutations: close analogies between Waardenburg Syndrome and Splotch mouse. **Hum. Mol. Genet.**, **7**:1069-1074, 1994b.
- VAHAVA, O.; MORELL, R.; LYNCH, E.D.; WEISS, S.; KAGAN, M.E.; AHITUV, N.; MORROW, J.E.; LEE, M.K.; SKVORAK, A.B.; MORTON, C.C.; BLUMENFELD, A.; FRYDMAN, M.; FRIEDMAN, T.B.; KING, M.C.; AVRAHAM, K.B. - Mutation in transcription factor POU4F3 associated with inherited progressive hearing loss in humans. **Science**, **279**:1950-54, 1998.
- VAN CAMP G. & SMITH R.J.H. - Hereditary Hearing loss Homepage. World wide web URL: <http://dnalab-www.uia.ac.be/dnalab/hhh/>

- VAN LAER, L.; HUIZING, E.H.; VERSTREKEN, M.; VAN ZUIJLEN, D.; WAUTERS, J.G.; BOSSUYT, P.J.; VAN DE HEYNING, P.; MCGUIRT, W.T.; SMITH, R.J.; WILLEMS, P.J.; LEGAN, P.K.; RICHARDSON, G.P.; VAN CAMP, G. - Nonsyndromic hearing impairment is associated with a mutation in DFNA5. **Nat. Genet.**, **20**:194-197, 1998.
- VERHOEVEN, K.; VAN LAER, L.; KIRSCHHOFFER, K.; LEGAN, P.K.; HUGHES, D.C.; SCHATTEMAN, I.; VERSTREKEN, M.; VAN HAUWE, P.; COUCKE, P.; CHEN, A.; SMITH, R.J.H.; SOMERS, T.; OFFECIERS, F.E.; VAN DE HEYNING, P.; RICHARDSON, G.P.; WACHTLER, F.; KIMBERLING, W.J.; WILLEMS, P.J.; GOVAERTS, P.J.; VAN CAMP, G. - Mutations in the human α -tectorin gene cause autosomal dominant non-syndromic hearing impairment. **Nat. Genet.**, **19**:60-62, 1998. [Letter]
- XIA, J.H.; LIU, C.Y.; TANG, B.S.; PAN, Q.; HUANG, L.; DAI, H.P.; ZHANG, B.R.; XIE, W.; HU, D.X.; ZHENG, D.; SHI, X.L.; WANG, D.A.; 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. **Nat. Genet.**, **20**(4): 370-3, 1998.
- WANG, A.; LIANG, Y.; FRIDELL, R.A.; PROBST, F.J.; WILCOX, E.R.; TOUCHMAN, J.W.; MORTON, C.C.; MORELL, R.J.; NOBEN-TRAUTH, K.; CAMPER, S.A.; FRIEDMAN, T.B. - Association of unconventional myosin MYO15 mutations with human nonsyndromic deafness DFNB3. **Science**, **280**:1447-51, 1998.
- WATANABE, A.; TAKEDA, K.; PLOPLIS, B.; TACHIBANA, M. - Epistatic relationship between Waardenburg Syndrome genes MITF and PAX3. **Nat. Genet.** **18**(3):283-86, 1998.

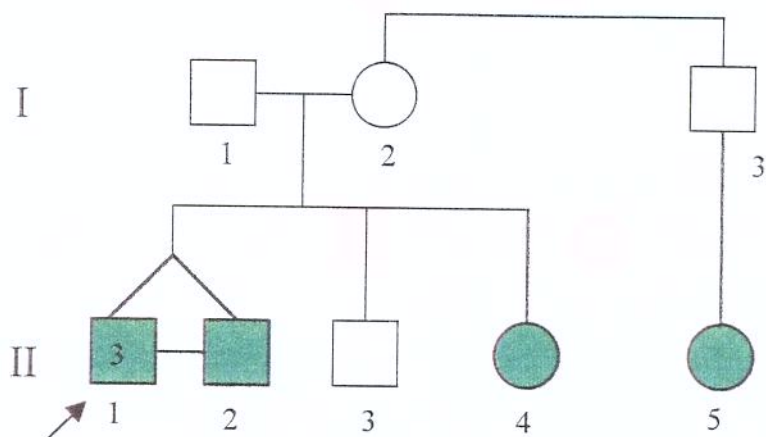
- WEIL, D.; BLANCHARD, S.; KAPLAN, J.; GUILFORD, P.; GIBSON, F.; WALSH, J.; MBURU, P.; VARELA, A.; LEVILLIERS, J.; WESTON, M.D.; KELLEY, P.M.; KIMBERLING, W.J.; WAGENAAR, M.; LEVI-ACOBAS, F.; LARGET-PLET, D.; MUNNICH, A.; STEEL, K.P.; BROWN, S.D.M.; PETIT, C. - Defective myosin VIIA gene responsible for Usher syndrome type 1B. **Nature**, **374**:60-61, 1995.
- WESTON, M.D.; KELLEY, P.M.; OVERBECK, L.D.; WAGENAAR, M.; ORTEN, D.J.; HASSON, T.; CHEN, Z.Y.; COREY, D.; MOOSEKER, M.; SUMEGI, J.; CREMERS, C.; MÖLLER, C.; JACOBSON, S.G.; GORIN, M.B.; KIMBERLING, W.J. - Myosin VIIA mutation screening in 189 Usher syndrome type 1 patients. **Am. J. Hum. Genet.**, **59**:1074-1083, 1996.
- 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.
- YASUNAGA, S.; GRATI, M.; COHEN-SALMON, M.; EL-AMRAOUI, A.; MUSTAPHA, M.; SALEM, N.; EL-ZIR, E.; LOISELET, J.; PETIT, C. - A mutation in OTOF, encoding otoferlin, a FER-1 like protein, causes DFNB9, a nonsyndromic form of deafness. **Nat. Genet.**, **21(4)**:363-369, 1999.
- ZELANTE, L.; GASPARINI, P.; ESTIVILL, X.; MELCHIONDA, S.; D'AGRUMA, L.; GOVEA, N.; MILÁ, M.; DELLA MONICA, M.; LUTFI, J.; SHOHAT, M.; MANSFIELD, E.; DELGROSSO, K.; RAPPAPORT, E.; SURREY, S.; FORTINA, P. - Connexin 26 mutations associated with the most common form of non syndromic neurosensory autosomal recessive deafness (DFNB1) in Mediterranean. **Hum. Mol. Genet.**, **6(9)**:1605-9, 1997.



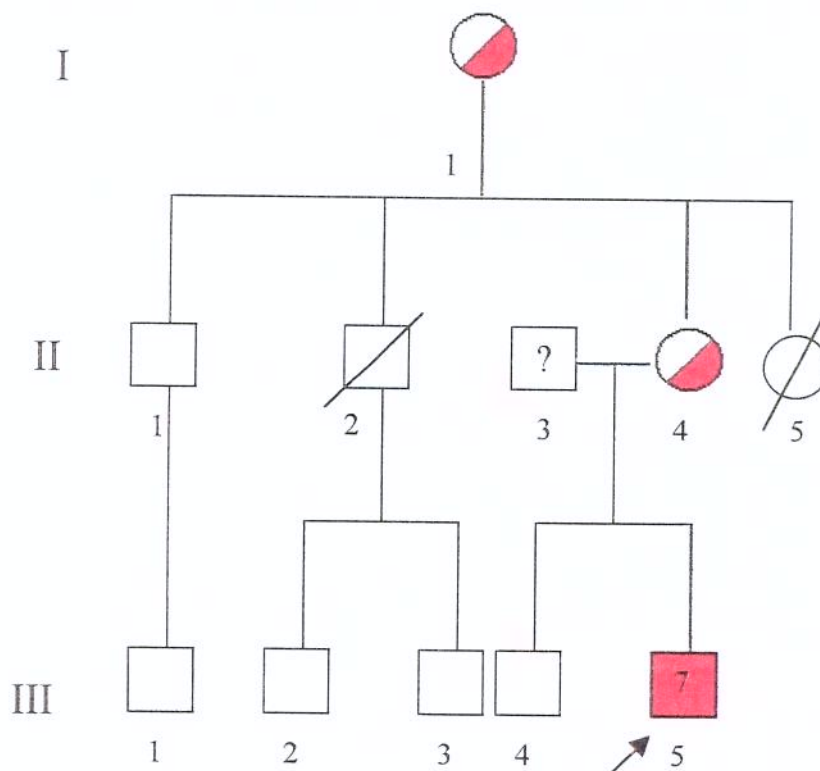
nexus

Anexo 1 - HEREDOGRAMAS

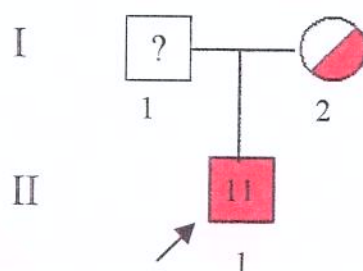
Paciente 3:



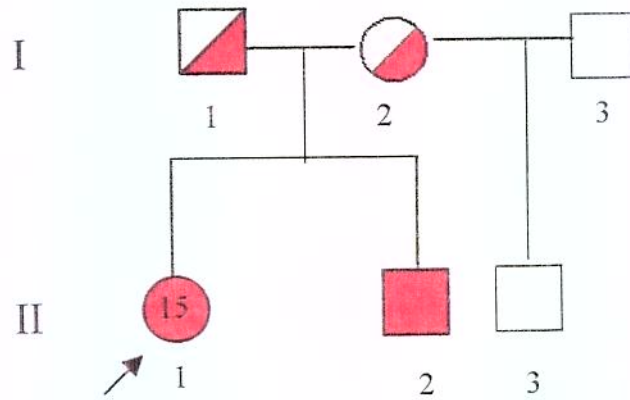
Paciente 7:



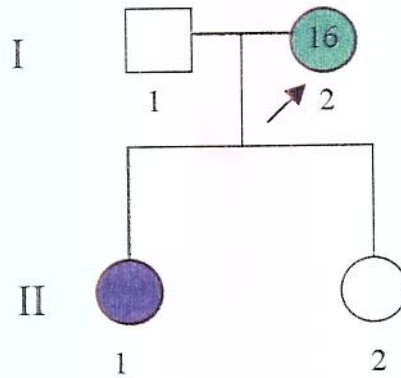
Paciente 11:



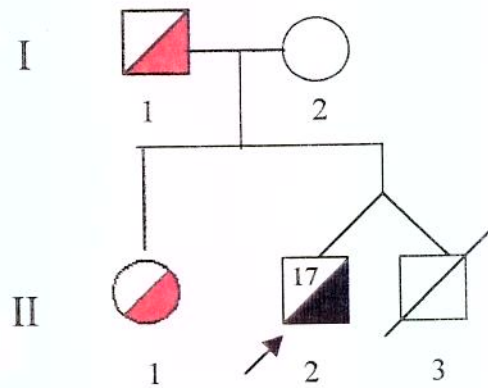
Paciente 15:



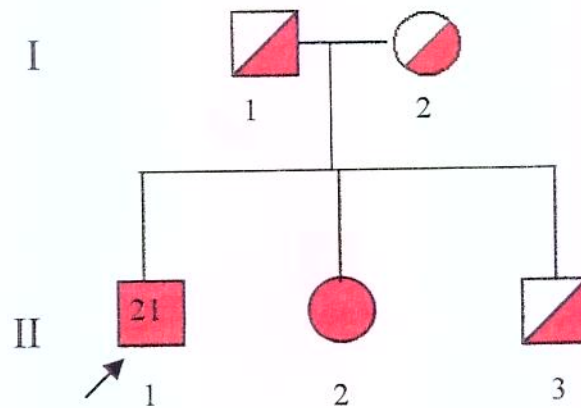
Paciente 16:



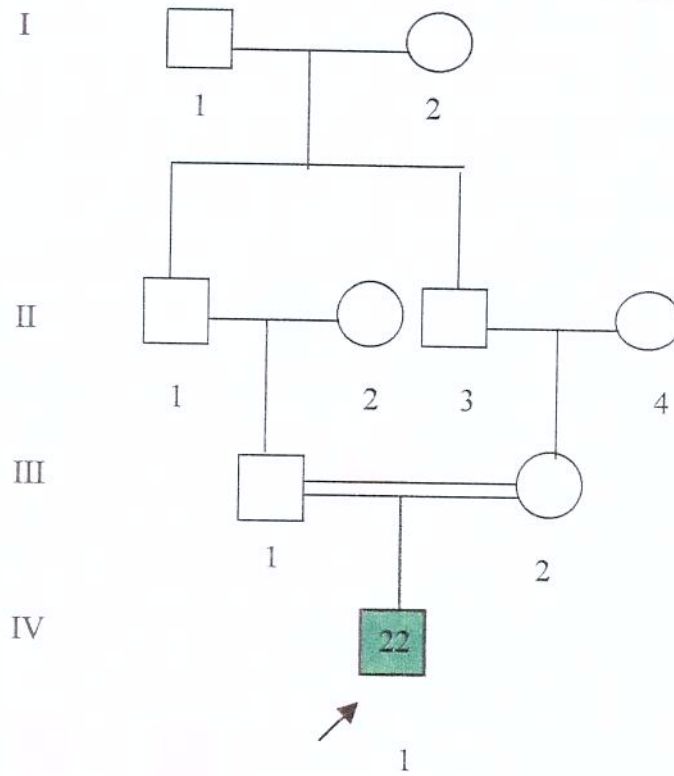
Paciente 17:



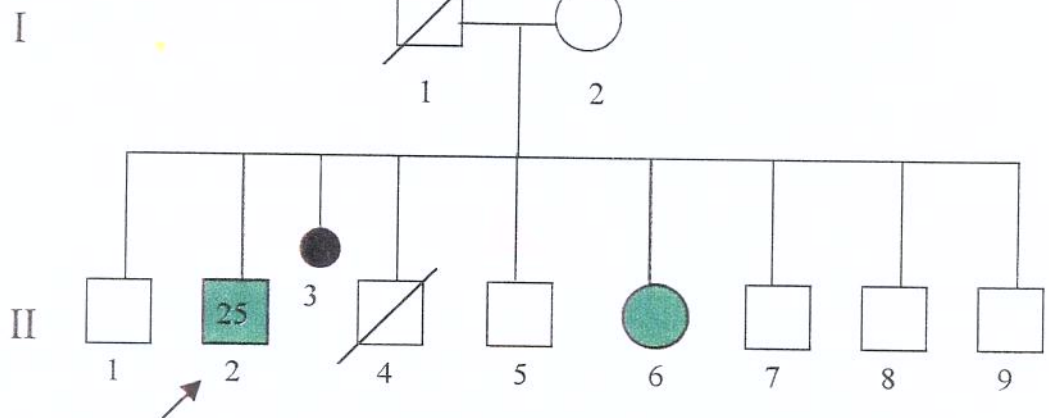
Paciente 21:



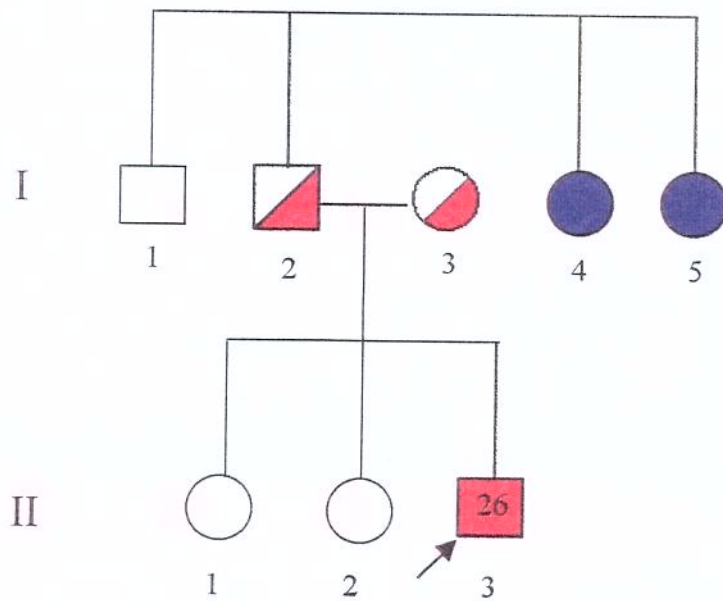
Paciente 22:



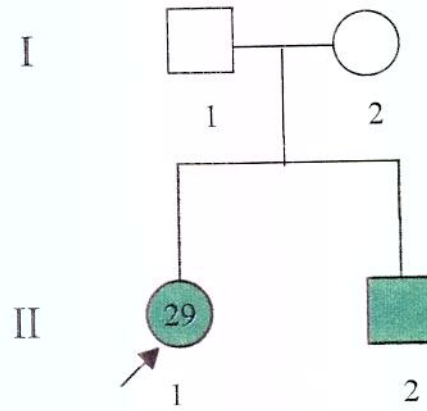
Paciente 25:



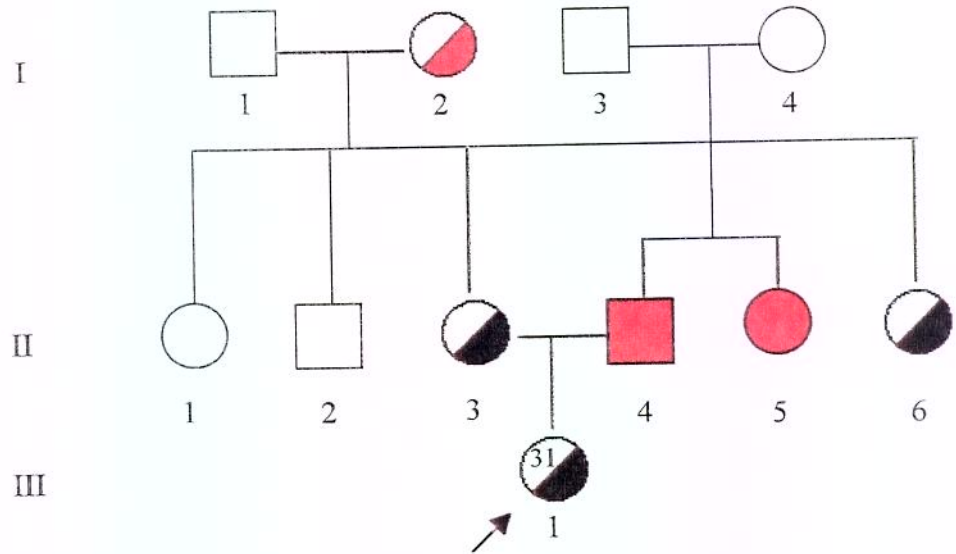
Paciente 26:



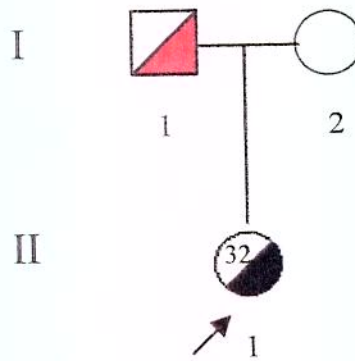
Paciente 29:



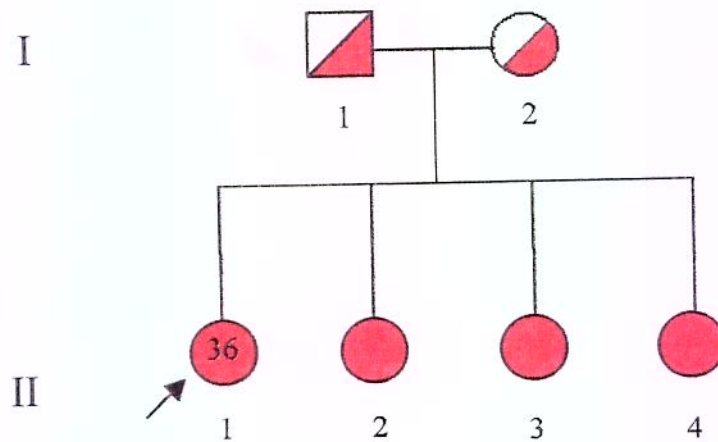
Paciente 31:



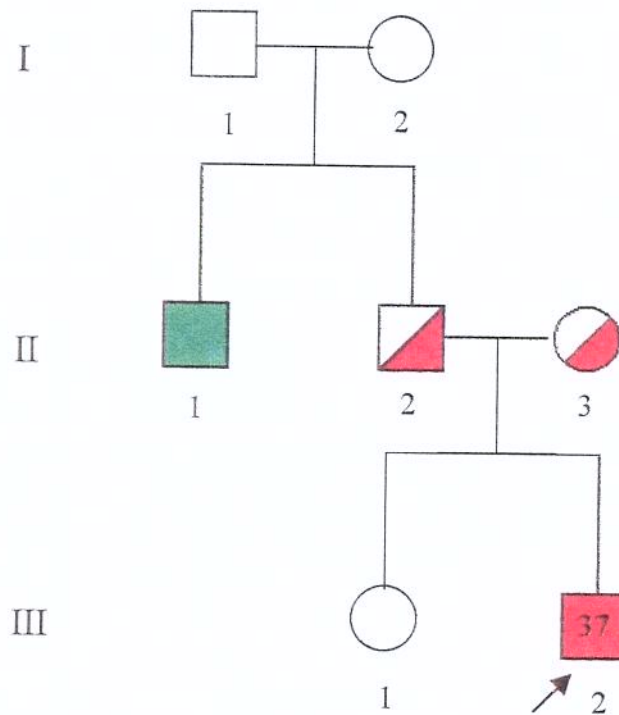
Paciente 32:



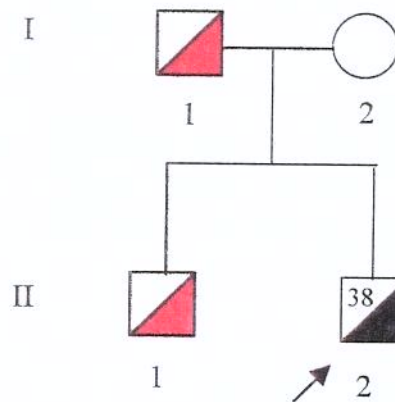
Paciente 36:



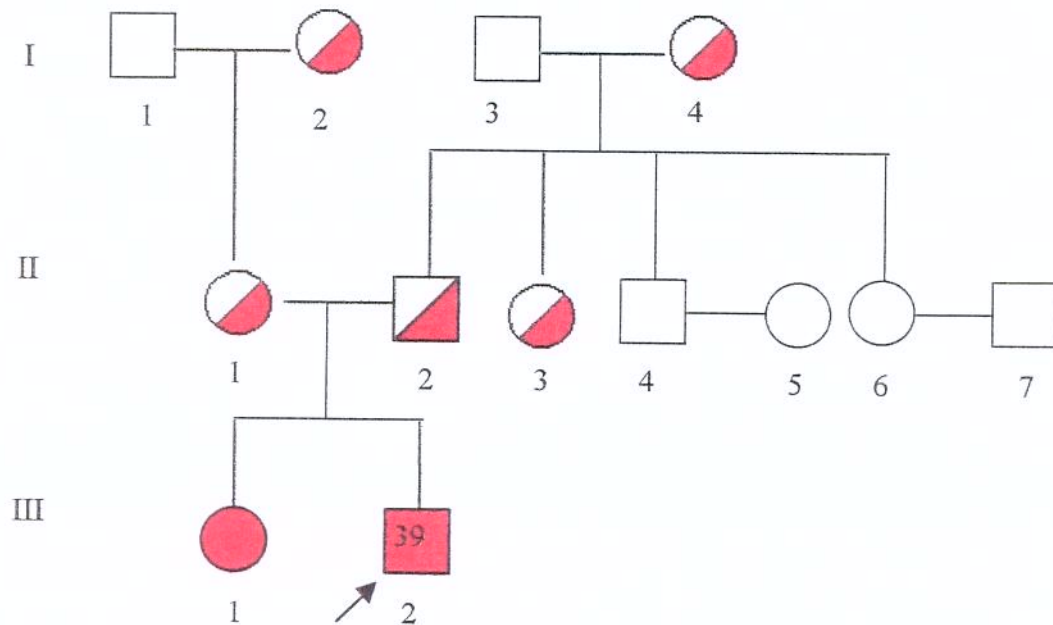
Paciente 37:



Paciente 38:



Paciente 39:



Legenda:

Indivíduo do sexo masculino com deficiência auditiva sem mutação no gene GJB2.



Indivíduo do sexo feminino com deficiência auditiva sem mutação no gene GJB2.



Indivíduo do sexo feminino com deficiência auditiva sem diagnóstico para mutações no gene GJB2. Obs.: Na família 26, os indivíduos I- 4, 5 não demonstraram interesse na análise do gene GJB2.



Indivíduo do sexo masculino com deficiência auditiva e com mutação no gene GJB2 nos dois alelos.



Indivíduo do sexo feminino com deficiência auditiva e com mutação no gene GJB2 nos dois alelos.



Indivíduo do sexo masculino com deficiência auditiva e com mutação no gene GJB2 em apenas um alelo.



Indivíduo do sexo feminino com deficiência auditiva e com mutação no gene GJB2 em apenas um alelo.



Indivíduo do sexo masculino sem deficiência auditiva e com mutação no gene GJB2 em apenas um alelo.



Indivíduo do sexo feminino sem deficiência auditiva e com mutação no gene GJB2 em apenas um alelo.



Indivíduo do sexo masculino sem deficiência auditiva e sem mutação no gene GJB2.



Indivíduo do sexo feminino sem deficiência auditiva e sem mutação no gene GJB2.



Indivíduo do sexo masculino sem deficiência auditiva e não submetido a exame molecular



Indivíduo do sexo feminino sem deficiência auditiva e não submetido a exame molecular



**FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA**

✉ Caixa Postal 6111
13083-970 Campinas-S.P.
☎ (019) 289.3749 ou 7232
(019) 289.3114 fax
✉ cep@head.fcm.unicamp.br

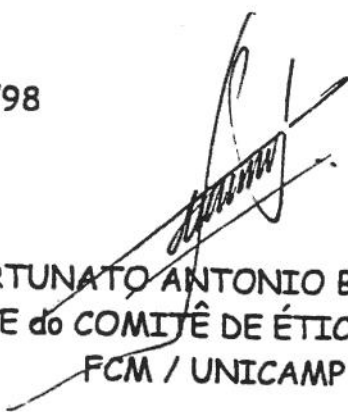
PARECER: Nº 111/98

**PESQUISA: APLICAÇÃO DAS TÉCNICAS DE BIOLOGIA MOLECULAR NO
DIAGNÓSTICO ETIOLÓGICO DA DEFICIÊNCIA AUDITIVA**

PESQUISADOR: Profa. Dra. Edi Lúcia Sartorato

O Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP, após acatar os pareceres dos membros-relatores, aprova a pesquisa supracitada bem como o Consentimento Pós-Informação por estarem contempladas as Resoluções 196/96 e 251/97.

CEP/FCM, 02/09/98



Prof. Dr. FORTUNATO ANTONIO BADAN PALHARES
PRESIDENTE do COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA
FCM / UNICAMP

Anexo 3 - CONSENTIMENTO PÓS-INFORMAÇÃO

Projeto: *Estudo de mutações no gene da conexina 26 como causa da deficiência auditiva neurossensorial não síndrômica*

Responsáveis: *Profa. Dra. Edi Lúcia Sartorato*

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

Profa. Dra. Andréa Trevas Maciel-Guerra

(Departamento de Genética Médica - FCM - UNICAMP)

Nome do paciente: _____
Registro hospitalar (HC): _____
Endereço: _____
Cidade: _____ Estado _____ CEP: _____ Fone: (____) _____
Responsável: _____ Idade: _____
RG: _____ Grau de parentesco: _____

Justificativa e objetivos do estudo:

A deficiência auditiva (DA) pode ter diversas causas, tanto genéticas quanto não genéticas (decorrente de fatores do ambiente), e pode se apresentar como anomalia isolada (não-sindrômica) ou associada a quadros síndrômicos. Além disso, em muitos casos não é possível definir sua origem.

Embora sejam muitos os genes envolvidos na DA de herança autossômica recessiva, comprovou-se recentemente que mutações no gene GJB2 (conexina 26) estão envolvidas na maior parte desses casos. A mutação 35delG, no gene da conexina 26, é a mais frequentemente observada nos casos em que há o envolvimento deste gene. Constatou-se, recentemente, que esta mutação é freqüente em diversas populações; na Europa, a freqüência de heterozigotos é 1 para 51 nascimentos. O indivíduo heterozigoto é aquele de audição normal, portador da mutação em dose única, mas que pode vir a gerar filhos com DA se vier a se unir a outro portador da mutação e ambos a transmitirem simultaneamente à criança.

Este trabalho tem como objetivo geral do estudo é o de detectar mutações no gene Conexina 26, que em estudos realizados no exterior parece estar envolvido em 80% dos casos de deficiência auditiva hereditária.

Procedimentos a que serão submetidos os pacientes

Os pacientes já foram avaliados no ambulatório de genética do Centro de Estudos e pesquisa em Reabilitação (CEPRE) da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP serão submetidos à coleta de sangue, do qual será extraído, em laboratório, o material genético (DNA) necessário ao estudo molecular.

Risco e Desconforto

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

Benefícios esperados

Em primeiro lugar, a pesquisa de alterações no genes envolvidos na deficiência auditiva poderá ser fundamental no diagnóstico da origem dessa deficiência nos casos em que esta não está esclarecida, permitindo, assim, que o casal seja adequadamente orientado quanto ao risco de repetição entre os próximos filhos.

Além disso, tanto nesses casos quanto daqueles em já havia comprovação ou fortes indícios de origem genética, a definição sobre qual o gene envolvido poderá ser fundamental para a orientação do restante da família. Isso porque, se houver interesse por parte da família, será possível definir, entre os parentes consanguíneos (como irmãos, tios e primos, por exemplo), quais são portadores da mesma alteração genética. Com isso, será possível realizar o mesmo exame molecular, neste momento ou no futuro, em seus cônjugues. Assim, muitos poderão ser totalmente tranquilizados, e aqueles que tiverem um risco real de gerarem crianças com deficiência auditiva poderão tomar uma decisão consciente quanto à reprodução.

Finalmente, no que se refere ao próprio paciente, seu exame molecular, bem como o de seus cônjugues, agora ou no futuro (no caso das crianças), também pode vir a permitir que se defina se há risco de repetição de deficiência auditiva entre seus filhos.

Recusa ou descontinuação da participação

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

Caso seja necessário contactar-nos:

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

Local e data: _____

Ambulatório: _____

Paciente ou responsável: _____

Médico responsável: _____

Anexo 4 – ARTIGOS PUBLICADOS

Report of two siblings with progressive sensorineural hearing loss bearing V37I/ V95M mutations in the connexin 26 gene (GJB2).

Relato de dois irmãos com deficiência auditiva progressiva neurossensorial com as mutações V37I/V95M no gene da conexina 26 (GJB2)

Camila A. Oliveira¹

Sandra C. P. Castro¹

Andréa T. M. Guerra²

.....Edi L. Sartorato¹

SUMMARY

Loss of hearing is the most common form of sensory impairment, with an estimated prevalence in developed countries of 1 per 1000 births with approximately 50% being genetic. Approximately 80% of genetic hearing loss is non-syndromic and inherited in an autosomal recessive manner. Mutations in the connexin 26 gene (GJB2) are responsible for 50% of non-syndromic recessive hearing loss, making it the most common form of autosomal recessive non-syndromic hearing loss with a carrier rate estimated to be as high as 2.8%. One mutation, 35delG, accounts for approximately 75% to 80% of mutations at this gene. It is, therefore, one of the most frequent disease mutations identified to date. It has been shown that hearing loss can vary even within the group of families homozygous for the 35delG mutation. Furthermore, the hearing loss was observed to be progressive in a number of cases. We describe a sibship with progressive sensorineural hearing loss bearing V37I/V95M mutations in the connexin 26 gene. The mutation V37I has been described earlier as a polymorphism. The results reported in the present study suggest that other factors may significantly modify the effects of mutations in the connexin 26 gene.

KEY WORDS: Hearing loss, Deafness, Connexin 26.

¹Laboratório de Genética Humana/CBMEG - Universidade Estadual de Campinas-SP, Brasil;
²Departamento de Genética Médica/FCM - Universidade Estadual de Campinas-SP, Brasil.

ADDRESS REPRINT REQUESTS:
Prof^a. Dr^a. Edi Lúcia Sartorato
UNICAMP - CBMEG
Lab. Genética Humana
Cidade Universitária Zeferino Vaz
Barão Geraldo - Campinas / SP - Bra
CEP13081-970
Tel.: 55-19-788-1147
Fax: 55-19-788-1089
e-mail: sartor@turing.unicamp.br

INTRODUCTION

Severe deafness or hearing impairment is the most prevalent inherited sensory disorder, affecting about 1 in 1,000 children (Morton, 1991). Inherited forms are responsible for half of all cases of congenital deafness. Non-syndromic recessive deafness (NSRD) is the most common form of prelingual hereditary hearing loss. Approximately 50% of childhood non-syndromic recessive hearing loss is caused by mutations in the connexin 26 (GJB2) gene (GJB2/DFNB1) (Van Camp et al., 1997; Kelsell et al., 1997). In addition, one specific mutation, 35delG, accounts for the majority (~70%) of the GJB2 mutant alleles. (Denoyelle et al., 1997; Zelante et al., 1997). Progressive hearing loss is much more frequent than pre-lingual deafness and most cases are caused by interactions of non-genetic and predisposing genetic factors. It has been shown that hearing loss can vary even within the group of families homozygous for the 35delG mutations (Cohn et al., 1999). Here we describe two siblings with progressive sensorineural hearing loss bearing V37I/V95M mutations in the connexin 26 gene.

MATERIALS AND METHODS

Clinical Data

Our proposita, an 8-year-old Caucasian girl, was born at 38 weeks of gestation to a 24-year-old mother and 22-year-old-father, after a pregnancy complicated by premature labor in the 5th month. Delivery was by cesarean section, birth weight was 2,750g, and Apgar scores were 8 and 9 at one and 5 minutes, respectively. She had normal neuromotor and speech development. When she was about 3 year old, her parents became aware of signs of hearing loss. Profound sensorineural deafness (100dB) was diagnosed by auditory brain responses (ABR) at 3 years 8 months. On this

occasion, a CT scan of the ears failed to reveal any abnormalities, and the ocular fundi were also normal. When first examined by us, at age 5 years 9 months, her growth parameters were all within normal limits, and there was also no dysmorphic features.

The patient had an older maternal half-sister and a younger brother. Her parents denied consanguinity, although both families belonged to the same small town in a region where inbreeding is high. The family history was remarkable for the presence of deaf mutism in 2 paternal relatives (a second cousin and a first cousin once removed).

Eight months later, her mother brought the results of ABR from the younger brother which revealed that he also had hearing loss.

Her brother, then 4 years old, was born at 38 weeks of gestation by cesarean section after a pregnancy complicated by frequent uterine contractions. Birth weight was 3,480g and length 51cm. He had a normal neuromotor and speech development. However, based on past experience with the girl, the family searched for an audiological evaluation. When he was 2 years 8 months old, ABR revealed bilateral moderate hearing loss (80dB). Seven months later, hearing loss became severe on the left (85dB).

Molecular analysis

Genomic DNA was extracted from peripheral lymphocytes by standard procedures. The connexin 26 gene was amplified using primers described elsewhere (Kelsell et al. 1997). The PCR products were sequenced using the dideoxy chain terminator method.

RESULTS AND DISCUSSION

Sequence analysis of GJB2 gene revealed that both affected sibs were compound

heterozygous, with a V95M substitution in one allele, inherited from their father, and a V37I substitution in the other, inherited from their mother (Figure 1). The parents have normal hearing and both mutations have been described elsewhere (Kelley et al., 1998).

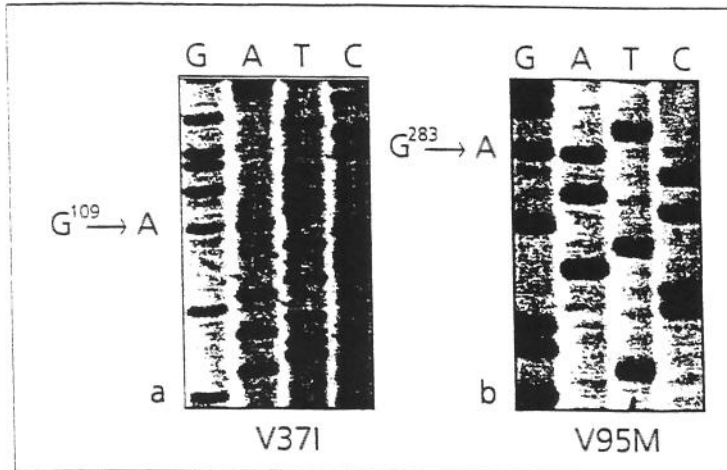


Figure 1. DNA sequence analysis of GJB2 gene from the patient. (a) compound heterozygous for V37I mutation, (b) compound heterozygous for V95M mutation.

The missense mutation 283G → A, V95M, converts the codon valine at the codon 95 to methionine. The amino acid valine is conserved in all beta-group connexins but not in alpha-group connexins. This mutation was first found in a patient whose second mutation was M34T, which was also described as a dominant allele (DFNA²) (Kelsell et al., 1997; Kelley et al., 1998). V95M occurs at the interface between the cytoplasmic linking and the second transmembrane domain, and its significance is not well known.

The other change found in the GJB2 gene, V37I, was first described as a polymorphism, once it was found only in one unaffected control (Kelley et al. 1998). The 109G → A involves the conversion of a valine at the codon 37 to isoleucine. The mutation occurs in the first transmembrane domain of the connexin 26. The

amino acid valine is invariant in beta connexins. In alpha connexins, glycine, serine, and alanine, but not valine, codons are found at that position.

Studies support the hypothesis that other factors modify the phenotype effects of mutations in GJB2 gene. The structure and function of GJB2 gene have been extensively studied, as well as the possibility of its interactions with a second gene or at the same or another locus (Bruzzone et al. 1996). Therefore, considering that our patients have progressive hearing loss, we cannot discard the possibility of V37I being a polymorphism with negative effect resulting less severe in the gene activity.

The mutation V95M, derived from the father, described earlier as a real mutation in the NSRD patient, might be responsible for the history of deaf mutism in paternal relatives (Kelley et al., 1998).

There are many instances in which different mutations in the same gene can result in similar phenotypes. On the other hand, the same mutation can lead to different phenotypic expressions. The genetic background certainly has some role to play in determining the onset and severity of hearing loss.

The early diagnosis based on genetic screening, mainly in cases with progressive hearing loss as described here, may allow affected infants to increase oral communications skills during the period critical for language acquisition. This can include more attention in the indication of listening devices as early education in special programs.

RESUMO

A deficiência auditiva neurossensorial está presente em cerca de 1 em cada 1000 nascimentos. Dados mundiais indicam que 50% dos casos de surdez têm etiologia genética, sendo que 80% desses, apresentam padrão autossômico recessivo. Mutações no gene da conexina 26 (GJB2) são responsáveis por 50% dos casos não sindrômicos com herança autossômica recessiva, com índice de indivíduos portadores para mutações nesse gene estimado em 2,8%. Uma mutação em particular, a 30delG, acomete cerca de 75 a 80% das mutações em que esse gene está envolvido, apontando esta mutação, como a mais freqüente até então identificada. Tem sido observado que mutações no gene da conexina 26 podem resultar, ainda dentro de uma mesma família, variáveis graus de deficiência auditiva. No presente trabalho apresentamos dois irmãos com deficiência auditiva neurossensorial progressiva, heterozigotos composto para as mutações V37I/V95M no gene da conexina 26. A mutação V37I foi anteriormente descrita como polimorfismo. Os resultados apresentados nesse estudo sugerem que outros fatores podem modificar significativamente os efeitos das mutações no gene da conexina 26.

REFERENCES

- Bruzzone R, White TW, Paul DL (1996): Connections with connexins: the molecular basis of direct intercellular signaling. *Eur J Biochem* 238: 1-27.
- Cohn ES, Kelley PM, Fowler TW, Gorga MP, Lefkowitz DM, Kuehn HJ, Schaefer GB, Gobar LS, Hahn FJ, Harris DJ, Kimberling WJ (1999): Clinical studies of families with hearing loss attributable to mutations in the connexin 26 gene (GJB2/DFNB1). *Pediatrics* 103: 546-550.
- Denoyelle F, Weil D, Maw MA, Wilcox AS, Lench NJ, Allen-Powell DR, Osborn AH, Dahl HHM, Middleton A, Houseman MJ, Dodé C, Marlin S, Boulila-Elgaied A, Grati M, Ayadi H, BenArab S, bitoun P, Lina-Granade G, Godet J, Mustapha M, Loiselet J, El-Zir E, Aubois A, Joannard A, Leveilliers J, Garabedian EN, Mueller RF, Gardner RJM, Petit C (1997): Prelingual deafness: high prevalence of a 30delG mutation in connexin 26 gene. *Hum Mol Genet* 6: 2173-2177.
- Kelley PM, Harris DJ, Comer BC, Askew JW, Fowler T, Smith SD, Kimberling WJ (1998): Novel mutations in the connexin 26 gene (GJB2) that cause autosomal recessive (DFNB1) hearing loss. *Am J Hum Genet* 62: 792-799.
- Kelsell DP, Dunlop J, Stevens HP, Lench NJ, Liang Jn, Parry G, Mueller RF, Leigh IM (1997): Connexin 26 mutations in hereditary non-syndromic sensorial deafness. *Nature* 387: 80-83.
- Morton NE (1991): Genetic epidemiology of hearing impairment. *Ann NY Acad Sci* 630: 16-31.
- Van Camp G, Willems PJ, Smith RJH (1997): Nonsyndromic hearing impairment: unparalleled heterogeneity. *Am J Hum Genet* 60: 758-764.
- Zelante L, Gasparini P, Estivill X, Melchionda S, D'Agruma L, Govea N, Mil M, Monica MD, Lutf J, Shohat M, Mansfield E, Delgrosso K, Rappaport E, Surrey S and Fortina P (1997): Connexin 26 mutations associated with the most common form of non-syndromic neurosensory autosomal recessive deafness (DFNB1) in Mediterraneans. *Hum Mol Genet* 1605-1609.

Letter to the Editor

Determination of the frequency of the 35delG allele in Brazilian neonates

To the Editor:

Congenital deafness occurs in approximately 1 in 1000 live births (1). In developed countries, about 60% of the cases of isolated deafness have a genetic origin (2). In Brazil, the majority of cases of hearing loss are due to environmental factors, such as congenital infections (mainly rubella), perinatal anoxia, *kernicterus* and meningitis (3). However, the proportion of genetic causes tend to increase as a result of improvement in health care, and thus modify daily medical practice in the etiologic investigation of deafness. A number of different genes involved in nonsyndromic recessive deafness (NSRD) has been described. The report of mutations in the GJB2 gene, which encodes for the connexin 26 (Cx26) protein, became a watershed for research in this area. In fact, one specific mutation, 35delG, accounts for more than 50% of the Cx26-related cases of NSRD identified to date, and is thought to represent a mutational hot spot. It is one of the most frequent disease mutations identified so far (4–6). In the general population, symptom-free carriers of GJB2 mutations have been detected, and the carrier frequency of the 35delG mutation has been estimated in some countries. This frequency was shown to be very high in Italy, Spain and Greece (about 1 in 30) (7, 8). A high carrier frequency of 35delG has been found in most European countries (about 1 in 51). In fact, the 35delG in the GJB2 gene may be the most common mutation in Caucasoid populations (9). As a consequence, and also because of the feasibility and benefit of screening for GJB2 mutation, this test is quickly going to become an important public health issue.

The importance of early detection of hearing impairment is well established. When infant audiologic testing detects hearing loss, the use of GJB2 testing will help to define a group in which approximately 40% may not respond to early hearing aid use and will require total language intervention. Many of those children will be candidates for cochlear implantation, which works best when performed by 24 months of age (10).

In order to determine the carrier rate of 35delG mutation in the GJB2 gene, DNA from 620 randomly selected neonates was extracted from cord blood after informed consent. All DNA samples were screened for the 35delG mutation using an allele-specific polymerase chain reaction, (AS-PCR) described elsewhere (11). This method was designed to identify the 35delG mutation, and discriminates easily between the normal and mutant alleles. By running two reactions, with normal or mutant primers on each sample it is possible to distinguish between homozygous non-35delG individuals, homozygous 35delG individuals and 35delG carriers.

Six 35delG heterozygotes were identified among the 620 neonates, giving a 35delG carrier rate of 0.97% (approximately 1 in 103). We determined the 35delG chromosomal rate to be 6 out of 1240. Thus, gene frequency, q , may be estimated as 0.0048 and the standard deviation as 0.0020 (95% confidence interval 0.0009–0.0087). The observed frequencies of normal homozygotes and heterozygotes for the 35delG mutation (614 and 6, respectively) match the expected frequencies based on the Hardy–Weinberg law (614.06, 5.92 and 0.01, respectively) ($p > 0.99$).

Our data support the future use of a genetic test for the 35delG mutation, not only in the investigation of patients with prelingual nonsyndromic hearing loss but also as a complement to audiometric screens in neonates. In fact, newborns with confirmed hearing loss should have GJB2 gene testing. The finding of GJB2 mutations may define a group in which approximately 60% will have profound or severe-profound hearing loss and require aggressive language intervention. In addition, in view of the 25% recurrence risk, genetic counseling must be offered to their families.

Edi Lúcia Sartorato

Elena Gottardi

Camila Andréa de Oliveira

Luis Alberto Magna

Joyce Maria Annichino-Bizzacchi

Carlos Augusto Seixas

Andrea Trevas Maciel-Guerra

Acknowledgements

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

References

1. Morton NE. Genetic epidemiology of hearing impairment. *Ann NY Acad Sci* 1991; 630: 16-31.
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. Simões AM, Maciel-Guerra AT. A surdez evitável: predominância de fatores ambientais na etiologia da surdez neurossensorial Iprofunda. *J Pediatría* 1992; 68: 254-257.
4. Keisell DP, Dunlop J, Stevens HP et al. Connexin 26 mutations in hereditary non-syndromic sensorial deafness. *Nature* 1997; 389: 80-83.
5. Denoyelle F, Weil D, Maw MA et al. Prelingual deafness: high prevalence of 30delG mutation in the connexin 26 gene. *Hum Mol Genet* 1997; 6: 2173-2177.
6. Carrasquillo MM, Zlotogora J, Barges S, Chakravarti A. Two different connexin 26 mutations in an inbred kindred segregating non-syndromic recessive deafness: implications for genetic studies in isolated populations. *Hum Mol Genet* 1997; 6 (12): 2163-2172.
7. Antoniadis T, Rabionet R, Kroupis C et al. High prevalence in the Greek population of the 35delG mutation in the connexin 26 gene causing prelingual deafness. *Clin Genet* 1999; 88: 381-382.
8. Rabionet R, Estivill X. Allele specific oligonucleotide analysis of the common deafness mutation 35delG in the connexin 26 (GJB2) gene. *J Med Genet* 1999; 36 (3): 260-261.
9. Gasparini P, Rabionet R, Barbujani G et al. High frequency of the 35delG deafness mutation in European populations. *Eur J Hum Genet* 2000; 8 (1): 19-23.
10. Cohn ES, Kelley PM, Fowler TW et al. Clinical studies of families with hearing loss attributable to mutations in the connexin 26 gene. *Pediatrics* 1999; 103 (3): 546-550.
11. Scott DA, Kraft ML, Carmi R et al. Identification of mutations in the connexin 26 gene that cause autosomal recessive nonsyndromic hearing loss. *Hum Mutat* 1998; 11 (5): 387-394.

Correspondence:

Dr Edi Lúcia Sartorato,
UNICAMP/CBMEG, Cidade Universitária Zeferino Vaz,
Barão Geraldo,
Campinas-São Paulo,
CEP 13081-970,
Brasil.
Tel: + 55 19 7881147;
Fax: + 55 19 7881091;
E-mail: sartor@obelix.unicamp.br