



NATHALIA ZOCAL PEREIRA DOS SANTOS

**SURDEZ DE ORIGEM GENÉTICA:
DESENVOLVIMENTO DE PAINEL DIAGNÓSTICO PARA
RASTREAMENTO EM RECÉM-NASCIDOS**

Campinas

2014



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

Faculdade de Ciências Médicas

Nathalia Zocal Pereira dos Santos

**SURDEZ DE ORIGEM GENÉTICA:
DESENVOLVIMENTO DE PAINEL DIAGNÓSTICO PARA
RASTREAMENTO EM RECÉM-NASCIDOS**

Orientadora: Dra. Edi Lúcia Sartorato

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade de Campinas para obtenção de título de Mestra em Ciências Médicas, área de concentração em Ciências Biomédicas.

ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO FINAL DA DISSERTAÇÃO DEFENDIDA PELA ALUNA NATHALIA ZOCAL PEREIRA DOS SANTOS E ORIENTADA PELA PROF.DRA. EDI LÚCIA SARTORATO.

Assinatura da orientadora

Campinas, 2014

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca da Faculdade de Ciências Médicas
Maristella Soares dos Santos - CRB 8/8402

Sa59s Santos, Nathalia Zocal dos Santos, 1989-
Surdez de origem genética : desenvolvimento de painel diagnóstico para rastreamento em recém-nascidos / Nathalia Zocal Pereira dos Santos. – Campinas, SP : [s.n.], 2014.

Orientador: Edi Lúcia Sartorato.
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Ciências Médicas.

1. Perda auditiva. 2. Genética. 3. Triagem neonatal. 4. Mutação - Diagnóstico. I. Sartorato, Edi Lúcia. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Genetic deafness diagnosis : development of diagnostic screening panel in newborns

Palavras-chave em inglês:

Hearing loss

Genetic

Neonatal screening

Mutation, Diagnosis

Área de concentração: Ciências Biomédicas

Titulação: Mestra em Ciências Médicas

Banca examinadora:

Edi Lúcia Sartorato [Orientador]

Andrea Trevas Maciel Guerra

Lúcio Fábio Caldas Ferraz

Data de defesa: 29-08-2014

Programa de Pós-Graduação: Ciências Médicas

BANCA EXAMINADORA DA DEFESA DE MESTRADO

NATHALIA ZOCAL PEREIRA DOS SANTOS

Orientador (a) PROF(A). DR(A). EDI LÚCIA SARTORATO

MEMBROS:

1. PROF(A). DR(A). EDI LÚCIA SARTORATO



2. PROF(A). DR(A). LÚCIO FÁBIO CALDAS FERRAZ



3. PROF(A). DR(A). ANDREA TREVAS MACIEL GUERRA



Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas da Faculdade de Ciências Médicas
da Universidade Estadual de Campinas

Data: 29 de agosto de 2014

À minha querida família, Pai, Mãe e Be! Amor imensurável, juntos para sempre! Amo
vocês. E a minha avó Guiomar, meu anjo protetor.

AGRADECIMENTOS

À Deus, nosso pai. Que ilumina meus caminhos, me acalma e me dá força.

À Prof^a. Dr^a. Edi Lúcia Sartorato pela orientação, incentivo, apoio e principalmente confiança. Muito obrigada pela oportunidade, ensinamentos e por despertar o meu amor pela Genética Humana.

À diretora ATEAL Mariza Pomílio e fonoaudiólogas Gisele e Tânia pela coleta de material e autorização dos responsáveis.

À Dra. Kátia Costa, por ter sido tão atenciosa e ter ajudado na entrega do material e no aconselhamento genético.

Às professoras Dra. Camila Andréa de Oliveira, Dra. Maria Francisca Collela e Dra. Renata Lima pela contribuição no exame de qualificação.

Ao Dr. Lúcio Ferraz e Dra. Andéa Maciel que gentilmente aceitaram participar como membros da banca examinadora de defesa da tese e contribuído para a finalização deste trabalho.

A todos os colegas que estão ou que passaram pelo Laboratório de Genética Molecular Humana que de alguma forma contribuíram, ajudaram, incentivaram, ensinaram e me divertiram: Paulo (obrigada pela ajuda no computador), Erika, Pri Zonzini (obrigada pela grande amizade), Pri Jacob, Fabio, Rogério, Vanessa, Lilian (parceira para todos os momentos), Nadya, Jhonathan, Taci, Alessandra, Creyto, Ana Letícia, Renata, Mara, Zélo, Flávia Flor, Débora, Cris, Helena, Reginaldo, Fer, Luli, Ana Paula, Laura, Pamela, Bela, Marcela, Dri e Rose.

À Sueli minha amiga/mãe, que sempre me incentivou, acalmou e tanto me ensinou. Sempre disposta a me ajudar! Obrigada pela sabedoria, e principalmente pela paciência. Tenho um grande carinho por você.

À Carol, minha anjinha! Sem você eu não teria conseguido, obrigada pela enorme paciência, disponibilidade em me ajudar e pela amizade!

À Prof. Dra. Maricilda por sua sabedoria e conselhos.

Aos funcionários do Centro de Biologia Molecular e Engenharia Genética (CBMEG).

Aos pais dos recém-nascidos que autorizaram a participação no estudo, e a todos os colaboradores responsáveis pelos centros de coleta, que com certeza sem eles este trabalho não poderia ser realizado.

Às agências financiadoras CAPES, CNPq e FAPESP, pela bolsa e auxílios concedidos.

Aos meus pais, Luiz Alberto e Maria José, pelo carinho, confiança, incentivo, paciência, patrocínio, muito obrigada por acreditarem e me apoiarem em TODAS minhas decisões, vocês são meu tudo, meu porto seguro.

À minha irmã Beatriz, por sempre me animar, apoiar e nunca desistir de mim.

A minha família, avós, tios, tias, primos e primas, que sempre me apoiaram, acreditaram, torcem pelo meu sucesso e me colocam em suas orações.

Aos meus tios Renato e Terezinha, que me acolheram tão bem quando me mudei para Campinas –SP.

Letícia, Júlia e Jozi, minhas companheiras de apartamento, muito obrigada pela força.

Aos meus amigos, Dani, Dulce, Mari, Lívia, Isa, Man, Ba, Nat, Vi, Gabriel e Anderson, por nunca desistirem de mim e sempre me apoiarem e incentivarem.

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

O sucesso nasce do
querer, da determinação
e persistência em se
chegar a um objetivo.
Mesmo não atingindo o
alvo, quem busca e vence
obstáculos, no mínimo
fará coisas admiráveis.”
(José de Alencar)

RESUMO

RESUMO

Segundo estimativa da Organização Mundial de Saúde (OMS), cerca de 25 milhões de indivíduos ou 4,7% da população mundial apresentam deficiência auditiva. A identificação precoce de alterações auditivas permite que casos positivos sejam encaminhados para intervenção médica e/ou para programas de reabilitação. No Brasil ainda não há dados oficiais sobre a prevalência da deficiência auditiva, mas estima-se que dependendo da região, acomete de 2 a 7 crianças em 1000.

Devido à grande heterogeneidade clínica da surdez, existe uma grande dificuldade no diagnóstico genético da perda auditiva. Mais de 60 genes envolvidos no fenótipo da surdez neurossensorial não-sindrômica foram clonados e estão sendo estudados. Contudo, mutações no gene da conexina 26 - *GJB2* – são as principais causas da perda auditiva hereditária.

A mutação *c.35delG*, no gene *GJB2*, é a mutação mais frequente, causando surdez com padrão de herança autossômico recessivo. Estudos mostraram uma frequência média de heterozigotos *c.35delG* na Europa de 1 a cada 51 indivíduos. Os primeiros estudos no Brasil mostraram que a frequência de heterozigotos em uma amostra de recém-nascidos foi de 0,97%.

O objetivo deste trabalho foi avaliar e estabelecer um protocolo diagnóstico para a perda auditiva genética, onde a escolha do tipo de coleta foi sangue em papel FTA e o desenvolvimento de um chip de DNA para o rastreamento da mutação *c.35delG* no gene *GJB2*, junto com as principais mutações nos genes relacionados à perda auditiva. Amostras de 1.243 recém-nascidos provenientes do Hospital Universitário de Jundiaí foram coletadas na ocasião do teste do pezinho e em seguida analisadas.

Primeiramente realizou-se o rastreamento da mutação *c.35delG*, gene *GJB2*. Foram identificados 11 RNs portadores desta mutação em heterozigose. Em seguida realizou-se o sequenciamento completo do gene *GJB2* para os casos positivos da mutação *c.35delG*, confirmando a presença da mutação nesses 11 recém-nascidos, sendo que em um deles também apresentou a alteração *p.V27I*.

Na segunda etapa do trabalho a técnica de espectrometria de massa (Sequenom®) foi utilizada para genotipagem de 60 mutações envolvidas com a perda auditiva. Dos 1243

recém-nascidos, 77 foram testados e 14 apresentaram alterações, sendo a mutação *c.35delG* detectada em 11 casos, já previamente identificados. Ainda, foram encontradas as mutações *c.1552-1567del16* no gene *OTOF* em um RN e a mutação *c.10573delA* no gene *MYO15A* em dois RNs. Para confirmação dessas mutações realizou-se sequenciamento de Sanger. Contudo, a presença dessas mutações não foi confirmada. No caso do RN no qual havia sido detectada a mutação *c.10573delA* por Espectrometria de Massa identificou-se a mutação *c.10573A >G* no gene *MYO15A* na análise de sequenciamento direto. Por se tratar de uma mutação cujos efeitos no fenótipo ainda não foram descritos, realizou-se estudos *in Silico* que confirmaram tratar-se de uma mutação deletéria.

Dessa forma, espera-se que os resultados obtidos contribuam para demonstrar a importância da inclusão do diagnóstico molecular em programas de triagem auditiva neonatal. A análise molecular associada ao teste da orelhinha pode melhorar a eficiência da detecção da surdez, proporcionar um diagnóstico etiológico precoce, permitindo assim, um prognóstico mais favorável em relação ao desenvolvimento da criança afetada.

ABSTRACT

ABSTRACT

According to the World Health Organization (WHO), about 25 million individuals or 4.7% of the world population has hearing impaired. Early identification of hearing impairment allows positive cases to be referred for medical intervention and / or rehabilitation programs. In Brazil there is no official data on the prevalence of hearing loss, but it is estimated that depending on the region, affects 2-7 children in 1000.

Due to the wide clinical heterogeneity of deafness, there is great difficulty in the genetic diagnosis of hearing loss. More than 60 genes involved in the phenotype of non-syndromic deafness have been cloned and are being studied. However, mutations in the connexin 26 gene - *GJB2* - are the main causes of hereditary hearing impairment.

The *c.35delG* mutation in the *GJB2* gene is the most common mutation causing deafness with autosomal recessive inheritance. Studies have shown an average frequency of heterozygotes for *c.35delG* in Europe of one in every 51 individuals. The first studies in Brazil showed that the frequency of heterozygotes in a sample of infants was 0.97%.

The aim of this study was to evaluate and establish a diagnostic protocol for genetic hearing loss, where the choice of collection was blood on FTA paper and the development of a DNA chip for screening the *c.35delG* mutation in the *GJB2* gene, along with key mutations in genes related to hearing loss. Samples of 1,243 newborns from the University Hospital of Jundiaí were collected at the time of the screening test and then analyzed.

First were tracking *c.35delG* mutation, gene *GJB2*, 11 newborns carriers of this mutation were identified as heterozygous. Then it was the complete sequencing of the *GJB2* gene for positive cases of *c.35delG* mutation, confirming the presence of the mutation in these 11 newborns, and in one of them also had to change *p.V27I*.

In the second stage of research the technique of mass spectrometry (Sequenom®) was used for genotyping of the 60 mutations involved in hearing loss. Of the 1243 newborns, 77 were tested and 14 had alterations, the *c.35delG* mutation were detected in 11 cases previously identified. And the mutations *c.1552-1567del16* *OTOF* gene in one newborn and *c.10573delA* *MYO15A* gene mutation in two newborns were found. For confirmation of these mutations Sanger sequencing was performed. However, the presence of these mutations was not confirmed. In the case of the *c.10573delA* mutation, the direct

sequencing analysis had been identified the *c.10573A > G* mutation in the gene *MYO15A*. For being a mutation that the effects on the phenotype have not yet been described, we performed *in silico* studies have confirmed that this is a deleterious mutation.

Thus, it is expected to contribute to the results demonstrate the importance of the inclusion of the molecular diagnosis of neonatal auditory screening programs. Molecular analysis associated with OAE testing can improve the efficiency of detection of deafness, providing an early etiologic diagnosis, thus allowing a more favorable prognosis in relation to the affected child.

LISTA DE ABREVIATURAS

LISTA DE ABREVIATURAS

ARMS	- Amplification Refractory Mutation Systems
ATEAL	- Associação Terapêutica de Estimulação Auditiva e Linguagem
CBPAI	- Comitê Brasileiro de Perdas Auditivas na Infância
Cx	- Conexina
dB	- Decibel
DFN	- Deafness
DNA	- Ácido desoxirribonucléico
DNAmt	- DNA mitocondrial
dNTP.	- Deoxynucleotide Triphosphates (Dioxinucleotídeos Trifosfato)
EDTA	- Ácido etilenodiamino tetra-acético
EOAs	- Emissões Otoacústicas
GATANU	- Grupo de Apoio a Triagem Auditiva Neonatal
HE	- Heterozigoto
HO	- Homozigoto
IBGE	- Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
JCIH	- Joint Committee on Infant Hearing
kB	- Kilobase
kHz	- KiloHertz
M	- Massa molar
MAE	- Meato Acústico Externo
MgCl ₂	- Cloreto de Magnésio
min	- Minuto
mL	- Mililitro

mM	- Milimolar
N	- Normal
NaOH	- Hidróxido de Sódio
ng	- Nanograma
NIH	- National Institute of Health
°C	- Graus centígrados
OMIM	- Online Mendelian Inheritance in Men
OMS	- Organização Mundial de Saúde
pb	- Par de base
PCR-AS	- PCR – Alelo Específico
PCR	- Polymerase Chain Reaction (reação em cadeia da polimerase)
PEATE	- Potenciais Evocados Auditivos de Tronco Encefálico
pH	- Potencial de Hidrogênio Iônico
Pmol	- Picomol
RNA	- Ácido Ribonucléico
Rnam	- RNA mensageiro
RNAr	- RNA ribossomal
RNAt	- RNA transportador
RNs	- Recém-nascidos
RPM	- Rotação por minuto
SAP	- Shrimp Alkaline Phosphatase
SNPs	- <i>Single nucleotide polymorphism</i> (polimorfismo de nucleotídeo único)
SNSAR	- Sensorineural não-sindrômica de padrão autossômico
SUS	- Sistema Único de Saúde
TAN	- Triagem Auditiva Neonatal

TANU	- Triagem auditiva neonatal universal
Taq	- <i>Thermus aquaticus</i> (enzima polimerase)
TBE	- Tris, base, ácido bórico, EDTA
TE	- Tris EDTA
Tm	- Temperatura de melting (fusão)
Tris	- HCL
U	- Unidade
μL	- Microlitro

LISTA DE TABELAS E QUADROS

LISTA DE TABELAS E QUADROS

Tabela 1: Sequências dos <i>primers</i> utilizados para a amplificação do gene <i>GJB2</i> e tamanho dos fragmentos.....	89
Tabela 2: Padrão de herança, as mutações selecionadas para o estudo, e seus respectivos genes e referências.....	94
Tabela 3: Sequências dos <i>primers</i> utilizados para a amplificação do exon 66 gene <i>MYO15A</i> e tamanho do fragmento.	102
Tabela 4: Sequências dos <i>primers</i> utilizados para a amplificação do exon 15 gene <i>OTOF</i> e tamanho dos fragmentos.....	103
Tabela 5: Análises dos diferentes tipos de coleta.....	109
Tabela 6: Resultado do rastreamento por AS-PCR da mutação <i>c.35delG</i> utilizando 3 diferentes tipos de amostra de DNA em 200 pacientes.	110
Tabela 7: Comparação resultados dos 11 indivíduos portadores da <i>c.35delG</i> em heterozigose entre as técnicas de AS-PCR e Sequenciamento.....	113
Tabela 8: Mutações utilizadas como controles positivos.	115
Tabela 9: Pacientes rastreados pelo Sequenom®.....	119
Tabela 10: Relação de mutações que falharam no experimento.	119
Quadro 1 - Fatores ambientais e genéticos envolvidos com a perda auditiva.....	60
Quadro 2 - Principais síndromes que apresentam a perda auditiva como sinal clínico (Baseado em Van Camp & Smith. Hereditary Hearing Loss Homepage.....	63
Quadro 3 - Genes associados à perda auditiva não-sindrômica Baseado em Van Camp & Smith. Hereditary Hearing Loss Homepage.....	65

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Ilustração esquemática do sistema auditivo, evidenciando as principais partes da orelha externa, média e interna (Modificado de: < http://audiovoxfonoaudiologia.blogspot.com/2010_05_01_archive.html >) (29).	56
Figura 2: Ilustração esquemática da cóclea vista de frente e em secção transversal. A secção transversal da cóclea mostra a escala média entre as escalas vestibular e timpânica. Em destaque esquema detalhado do órgão de Corti e micrografia dos estereocílios das células ciliadas (Adaptado de: “The inner ear”, capítulo “The Auditory System” do livro “Neuroscience”, editado por Purves e colaboradores (2001) e disponível no <i>NCBI Bookshelf</i> – http://www.ncbi.nlm.nih.gov/bookshelf/br.fcgi?book=neurosci&part=894) (30).	57
Figura 3: Representação esquemática da estrutura do gene <i>GJB2</i> (Baseado em: Benson, <i>et al.</i> GenBank. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/ >). (57).....	70
Figura 4: Fluxograma da distribuição da coleta de amostras.	86
Figura 5: Ciclos utilizados para a amplificação do gene <i>GJB2</i>	90
Figura 6: Ciclos de amplificação para posterior sequenciamento do gene <i>GJB2</i>	91
Figura 7: Equipamentos utilizados no Sistema MassArray.	93
Figura 8: Etapas da técnica de espectrometria de massa <i>iPLEX® Gold Genotyping</i>	97
Figura 9: Ciclos de amplificação do PCR captura do método <i>iPLEX Gold – Sequenom</i> . ..	98
Figura 10: Ciclos de amplificação do PCR extensão do método <i>iPLEX Gold - Sequenom</i>	100
Figura 11: Ciclos de amplificação para posterior sequenciamento do éxon 66 gene <i>MYO15A</i>	102
Figura 12: Ciclos de amplificação para sequenciamento do éxon 15 do gene <i>OTOF</i> . ..	103
Figura 13: Relação das classes indo da C65 mais deletéria até C0 menos deletéria... ..	106
Figura 14: Gel de agarose mostrando os fragmentos gerados pela técnica de PCR alelo-específico para a análise da mutação c.35delG. L= Marcador de peso molecular 1Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen); N= Controle homocigoto normal (N/N); HO= Controle homocigoto mutante (35delG/35delG); HE= Controle heterocigoto mutante (35delG/N).	111

Figura 15: Eletroferograma mostrando em destaque a presença da mutação c.35delG em heterozigose.....	112
Figura 16: Eletroferograma mostrando em destaque a alteração G>A na posição 79 em heterozigose.....	112
Figura 17: Gráficos mostrando a detecção de alelos pela espectrometria de massa. A Figura “A” representa um paciente controle heterozigoto para a mutação <i>p.P142L</i> , onde os alelos C e T estão representados por picos na região colorida pontilhada, indicados pela seta. As figuras ”B, C e D” são amostras de sangue, papel e saliva, respectivamente, e representam gráficos de pacientes normais para esta mutação, onde apenas o alelo C (normal) é detectado.	114
Figura 18: Fluxograma das amostras utilizadas na técnica de Espectrometria de Massa.	115
Figura 19: Gráfico mostrando a detecção de alelos pela espectrometria de massa da mutação <i>c.35delG</i> , os alelos estão representados por picos na região colorida pontilhada, indicados pela seta e mostram a base G e a deleção.....	116
Figura 20: Gráfico mostrando a detecção de alelos pela espectrometria de massa da mutação <i>c.10573delA</i> , os alelos estão representados por picos na região colorida pontilhada, indicados pela seta e mostram a base A e a deleção.....	117
Figura 21: Gráfico mostrando a detecção de alelos pela espectrometria de massa da mutação <i>c.1552-1567del16</i> , os alelos estão representados por picos na região colorida pontilhada, indicados pela seta e mostram a base A e a deleção.....	118
Figura 22: Eletroferograma mostrando em destaque à alteração A>G em heterozigose.	120
Figura 23: Eletroferograma do sequenciamento da alteração <i>c.1552-1567del16</i> , onde a seta indica a base correta.	120
Figura 24: Resultados da análise <i>in Silico</i> pela ferramenta Polyphen-2, onde a predição para a mutação <i>c.10573A >G</i> mostrou ter 0,99 de especificidade, em uma escala que vai de 0,00 a 1,00.	121
Figura 25: Resultados da análise <i>in Silico</i> pela ferramenta <i>SIFT</i> , que também identificou a mutação <i>c.10573A >G</i> como deletéria. Apresentando um score de 0 (zero), lembrando que na escala considerada pela ferramenta <i>SIFT</i> , mutações que apresentam um score com valor menor que 0,05 são prejudiciais ao organismo.	122

Figura 26: Resultados da análise *in Silico* pela ferramenta *Aling*, que também identificou a mutação *c.10573A >G* como deletéria. Os valores encontrados pela ferramenta foram GV= 0,00 e GD=55,27, o que demonstra que essa alteração está na classe C55. Os valores de referência utilizados pelo *Aling* vão da C65, sendo a mais prejudicial, até C0, menos prejudicial. 122

SUMÁRIO

SUMÁRIO

1. Introdução.....	45
2. Objetivos	51
2.1. Objetivo Geral.....	51
2.2. Objetivos Específicos	51
3. Revisão da Literatura	55
3.1. Sistema Auditivo.....	55
3.2. Perda Auditiva	58
3.3. Etiologia Genética da Surdez.....	61
3.3.1. Surdez sindrômica	62
3.3.2. Surdez não sindrômica.....	64
3.4. Principais Genes Estudados	69
3.4.1. Gene <i>GJB2</i>	69
3.4.2. <i>SLC26A4</i>	71
3.4.3. <i>OTOF</i>	72
3.4.4. <i>MYO15A</i>	73
3.4.5. Genes Mitocondriais.....	74
3.5. Teste de Triagem neonatal.....	74
3.6. Diagnóstico das perdas auditivas.....	80
4. Material e Métodos.....	85
4.1. Casuística	85
4.2. Métodos	85
4.2.1. Extração de DNA de Papel.....	86
4.2.2. Extração de DNA de Saliva.....	87
4.2.3. Extração de DNA de pequenos volumes	88
4.3. Triagem da mutação <i>c.35delG</i> no gene da conexina 26 (<i>GJB2</i>).....	89
4.4. Amplificação do gene <i>GJB2</i>	89
4.5. Rastreamento de mutações no gene <i>GJB2</i> por sequenciamento.....	90
4.6. Análise das sequências obtidas	91
4.7. Genotipagem utilizando a Técnica de Espectrometria de Massa.....	92
4.7.1. Definição dos ensaios	93

4.7.2.	Desenho dos ensaios.....	95
4.7.3.	Análise qualitativa das amostras.....	96
4.8.	Reações	96
4.8.1.	iPLEX® Gold Genotyping	97
4.8.2.	PCR Captura: Amplificação de fragmentos contendo os <i>SNPs</i> /Mutações.....	98
4.8.3.	Tratamento com SAP.	99
4.8.4.	PCR de extensão – iPLEX Gold.....	99
4.8.5.	Purificação dos produtos de PCR e Reação de espectrometria de massa.....	100
4.9.	Confirmação por Sequenciamento das mutações detectadas pelo Sequenom®.....	101
4.9.1.	Amplificação do éxon 66 do gene da <i>MYO15A</i>	101
4.9.2.	Amplificação do éxon 15 do gene <i>OTOF</i>	102
4.9.3.	Sequenciamento do éxon X da <i>MYO15A</i> e do éxon Y do gene <i>OTOF</i>	103
4.10.	Estudo <i>In Silico</i>	103
4.10.1.	Polyphen-2.....	103
4.10.2.	SIFT.....	104
4.10.3.	Aling GVDG	105
5.	Resultados	109
5.1.	Resultados comparativos dos diferentes tipos de coletas e amostras de DNA.....	109
5.1.1.	Amostra de Saliva.....	109
5.1.2.	Amostras em papel FTA.....	109
5.1.3.	Amostra de sangue em EDTA.....	109
5.2.	Resultado do rastreamento da mutação <i>c.35delG</i> utilizando 3 diferentes tipos de amostra de DNA	110
5.3.	Rastreamento da mutação <i>c.35delG</i> no gene <i>GJB2</i> por AS-PCR	110
5.4.	Sequenciamento do gene <i>GJB2</i>	111
5.5.	Espectrometria de Massa Sequenom®.....	113
5.5.1.	Análise das Amostras selecionadas para o Sequenom®	114
5.6.	Confirmação das alterações encontradas no Sequenom por Sequenciamento.....	120
5.7.	Estudo <i>In Silico</i> da mutação <i>c.10573A >G</i>	121
6.	Discussão.....	125
7.	Conclusões	133

8. Referências	137
9. Anexos.....	152

INTRODUÇÃO

1. Introdução

A linguagem desempenha um papel essencial na organização perceptual, na recepção e estruturação das informações, na aprendizagem e nas interações sociais do ser humano. A audição constitui-se em um pré-requisito para a aquisição e o desenvolvimento da linguagem do indivíduo em uma sociedade cuja comunicação oral é predominante (1).

O desenvolvimento do sistema auditivo segue etapas graduais de complexidade, o qual se inicia já na vida intrauterina. Assim, para que uma criança adquira a linguagem e desenvolva sua fala, deve ser capaz de detectar um som, prestar atenção, discriminá-lo, localizá-lo, memorizá-lo, reconhecê-lo e finalmente compreendê-lo (2, 3, 4).

Em países desenvolvidos 1 em cada 1000 crianças nasce com perda auditiva, sendo 60% dos casos de surdez congênita de origem genética, 30% adquiridos e 10% é idiopática, ou seja, de causa desconhecida (5, 6, 7). No Brasil, essa frequência é estimada em 4 a cada 1000 nascimentos, podendo a frequência variar de acordo com a região (8).

A perda auditiva é a deficiência congênita mais frequente dentre aquelas rotineiramente triadas em programas de saúde preventivos (9). Segundo a OMS, surdez refere-se à perda total da audição em uma ou em ambas as orelhas, já a perda de audição refere-se tanto a perda completa ou parcial da capacidade de ouvir (10). Nos dois casos pode ocorrer um desvio ou mudança das estruturas ou da função auditiva (11, 12, 13).

De acordo com Roslyng-Jensen, uma perda auditiva em uma criança é qualquer comprometimento da audição que reduza a inteligibilidade da mensagem falada a um grau de inadequação para interpretação apurada ou para aprendizagem (14).

Além disso, sabe-se que o Sistema Nervoso Auditivo Central apresenta grande plasticidade quando precocemente estimulado, principalmente até os seis meses de idade, levando ao aumento de conexões nervosas e conseqüentemente melhores reabilitação das vias auditivas (11).

Desta maneira, os seis primeiros meses de vida da criança são decisivos no desenvolvimento futuro da criança com perda auditiva. Por estas razões, se justifica a preocupação com o diagnóstico e a intervenção precoce da perda auditiva, pois muitos estudos já relataram que prejuízos causados pela perda auditiva muitas vezes são

irreversíveis, afetando não apenas a linguagem, mas também o desenvolvimento cognitivo, intelectual, cultural e social da criança (12).

A perda auditiva pode ser causada por fatores ambientais ou genéticos. Dentre os fatores ambientais inclui-se a exposição frequente a ruído de alta intensidade, o uso de drogas ototóxicas, infecções, entre outros. Quanto aos fatores genéticos, mutações em diferentes genes ou em elementos regulatórios que estão envolvidos no desenvolvimento adequado, na estrutura e na função da orelha podem levar a diferentes graus de perda auditiva (15).

O estudo genético da surdez, além de contribuir para determinar sua etiologia, também proporciona um melhor entendimento da fisiologia da audição, à medida que, por meio de mutações podem-se entender melhor as funções das proteínas envolvidas nesse complexo mecanismo (16).

Estima-se que de 300 a 500 genes estejam envolvidos no mecanismo da audição. A complexidade fisiológica da audição e o envolvimento de tantos genes levam a uma grande heterogeneidade genética da surdez (17).

A pesquisa etiológica da surdez é de extrema importância para que o prognóstico seja estabelecido assim como as condutas apropriadas sejam adotadas. Os avanços no campo da genética molecular humana intensificada nos últimos anos pelo Projeto Genoma Humano conduziram a uma rápida identificação e caracterização dos genes e de alterações gênicas (mutações) responsáveis pelas doenças humanas (18).

Nos últimos 20 anos, o principal objetivo de pesquisas moleculares relacionadas à perda auditiva genética é a detecção de novos genes envolvidos neste tipo de perda. A técnica mais utilizada é o sequenciamento de regiões suscetíveis a conter genes candidatos de perda auditiva (19). Atualmente com o grande número de genes descobertos, é necessário que se use novas tecnologias que sejam capazes de rastrear um grande número de alterações de uma única vez. Com isso as novas tecnologias *high-throughput* (alto rendimento) vêm sendo utilizadas cada vez mais, permitindo um diagnóstico mais eficaz e rápido.

A triagem auditiva neonatal universal é a primeira etapa de um programa de saúde auditiva neonatal, devendo ser seguida de atendimento multidisciplinar para diagnóstico, envolvendo principalmente o fonoaudiólogo, o médico otorrinolaringologista e geneticista.

Sempre que possível e brevemente devem ser iniciados os processos de intervenção, com uso de amplificação sonora e reabilitação.

A triagem é o processo de se aplicar procedimentos rápidos e simples em um grande número de pessoas, sendo que o principal objetivo é identificar os indicadores de risco para a perda auditiva, se um recém-nascido apresenta algum indicador tem uma chance maior de apresentar perda auditiva. Essa triagem é importante para que se saiba qual conduta adotar após os resultados da triagem auditiva (20).

Os indicadores de risco foram preconizados por comitês nacionais e internacionais que estudaram a audição infantil (*Joint Committee of Infant Hearing- JCIH*) (21) e Comitê Multiprofissional de Saúde Auditiva- COMUSA (22).

Para o diagnóstico da perda auditiva, é recomendado que sejam realizados alguns testes com procedimentos comportamentais e eletrofisiológicos, como: observação do comportamento auditivo, medidas de emitância acústica, EOAe (Emissões Otoacústicas) e PEATE (Potenciais Evocados Auditivos de Tronco Encefálico), sendo esses exames fundamentais para determinação do tipo, grau e configuração da perda auditiva, possibilitando os processos de habilitação, com a indicação de prótese auditiva e/ou implante coclear e a reabilitação fonoaudiológica (23).

No Brasil esses procedimentos são conhecidos como o “teste da orelhinha” implementado no Brasil pela lei Lei Federal Nº 12.303 de 2/08/2010 (24). Em Jundiaí - SP, a ATEAL (Associação Terapêutica de Estimulação Auditiva e Linguagem) é responsável pela realização do EOAs em todos os RNs nascidos no HU (Hospital Universitário de Jundiaí – SP). Em casos de RN que falham, eles são encaminhados para reteste e realização do PEATE e acompanhados por fonoaudiólogos da ATEAL.

Em muitos casos a etiologia da perda auditiva não é concluída devido à falta de programas que incluam testes genéticos.

Tendo em vista o importante impacto sócio-econômico envolvido no diagnóstico e no tratamento da surdez, é de extrema relevância para as políticas públicas a determinação de um protocolo de diagnóstico genético padrão que, associado ao Teste da Orelhinha, possa aumentar a eficácia da triagem auditiva.

O acesso precoce ao diagnóstico e implante coclear logo no primeiro ano de vida, somados à participação efetiva da família, e intervenções fonoaudiológica e

psicopedagógica, podem propiciar o desenvolvimento tanto da linguagem quanto da comunicação oral permitindo que a criança surda tenha a oportunidade de se desenvolver de forma semelhante à das crianças ouvintes.

Espera-se que os resultados obtidos nesse estudo contribuam para enfatizar a importância da inclusão do diagnóstico molecular em programas de triagem auditiva neonatal, onde uma associação entre análise molecular e teste da orelhinha possa contribuir para um diagnóstico precoce, favorecendo o desenvolvimento da criança afetada.

OBJETIVOS

2. Objetivos

2.1. Objetivo Geral

Desenvolver um painel diagnóstico para detectar com mais rapidez as mutações mais frequentemente observadas em casos de surdez com etiologia genética, a fim de empregá-las no rastreamento de recém-nascidos.

2.2. Objetivos Específicos

- Comparar os resultados de rastreamento da *c.35delG* em diferentes tipos de amostras de DNA obtidas de saliva, sangue em EDTA e papel;
- Rastrear a mutação *c.35delG* do gene *GJB2* e determinar a sua frequência na amostra de recém-nascidos;
- Avaliar o rendimento e o potencial da plataforma Sequenom® para detecção das mutações mais frequentes relacionadas com a perda auditiva.

REVISÃO DA LITERATURA

3. Revisão da Literatura

3.1. Sistema Auditivo

Um dos mais complexos sistemas do nosso organismo é o auditivo, sendo ele responsável por captar as ondas sonoras e dar início ao processo de percepção e interpretação do som. Uma mistura de ondas sonoras é constantemente gerada no ambiente e alcança nossas orelhas. Esta coleção de sons contém um amplo espectro de tons altos e baixos em uma variedade de intensidades. A orelha é um órgão capaz de decifrar precisamente as diferentes frequências e intensidades, enquanto ao mesmo tempo transfere as informações coletadas para o cérebro e nos permite categorizar cada som e identificar sua distância relativa e direção (15).

A formação da orelha se inicia aproximadamente no 22º dia de gestação e anatomicamente começa a se diferenciar a partir do 6º mês (25). Estruturas sensoriais e conexões centrais constituem o sistema auditivo, sendo responsáveis pela audição. Esse sistema pode ser referido em duas partes distintas inter-relacionadas, a primeira parte o sistema auditivo periférico, formado pelas estruturas da orelha externa, média, interna e do sistema nervoso periférico, composto pelo nervo coclear. A segunda parte é formada pelo sistema auditivo central, constituído pelas vias auditivas localizadas no tronco encefálico e áreas corticais (26).

A orelha está abrigada no osso temporal e consiste em três partes, cada qual com características estruturais e funcionais distintas: orelha externa, média e interna (Figura 1). A orelha externa é formada pelo pavilhão da orelha que se projeta lateralmente à cabeça, sendo responsável pela captação do som, e pelo meato acústico externo, curto conduto, responsável por conduzir o som captado para a orelha média.

A orelha média é formada pela cavidade timpânica e por três ossículos: o martelo, a bigorna e o estribo. O som entra pelo canal auditivo externo, gerando uma vibração da membrana timpânica para dentro e para fora da orelha média (fases de compressão e de rarefação). Os ossículos que se encontram posicionados juntamente à membrana timpânica coletam as vibrações e as transmitem para a orelha interna, através da janela oval (27, 15, 28).

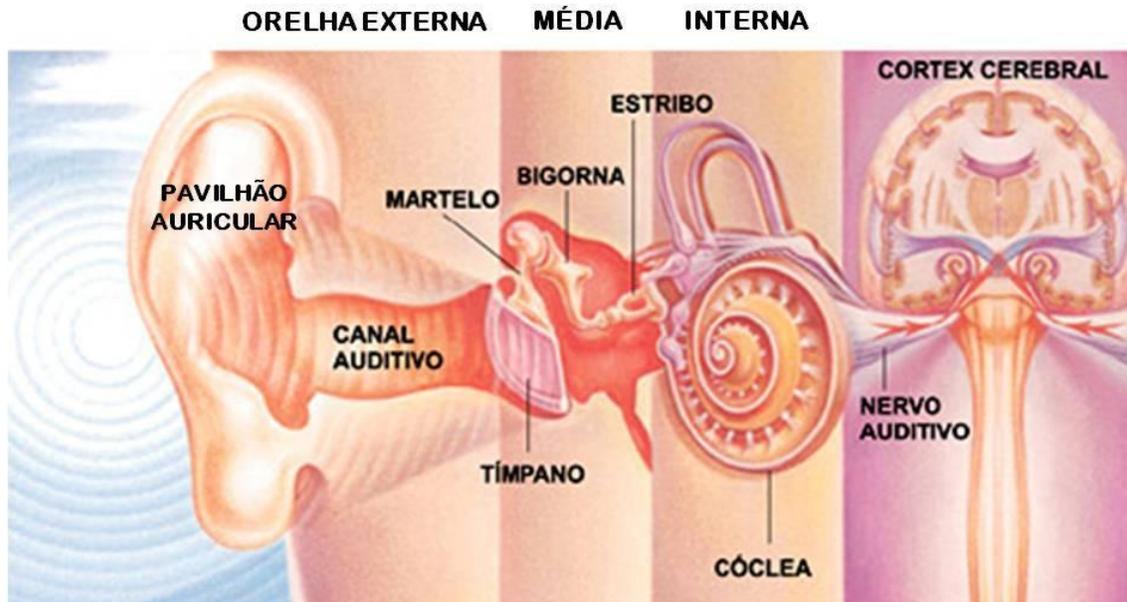


Figura 1: Ilustração esquemática do sistema auditivo, evidenciando as principais partes da orelha externa, média e interna (Modificado de: <http://audiovoxfonoaudiologia.blogspot.com/2010_05_01_archive.html>) (29).

A cóclea, presente na orelha interna, é o principal órgão responsável pela audição e é constituído por um canal ósseo-membranoso que apresenta a forma de caracol rodeado pelo osso temporal. Esse canal é dividido em três compartimentos preenchidos por fluidos: as escalas média, vestibular e timpânica (15).

A escala média é uma cavidade cheia de endolinfa, localizada entre a escala vestibular e timpânica, cavidades preenchidas por perilinfa. A escala média contém o órgão de Corti, (órgão Espiral), porção sensorial propriamente dita do sistema auditivo. Ele está situado na membrana basilar, e é constituído por células de suporte e células sensoriais, denominadas células ciliadas. A porção apical das células ciliadas contém projeções especializadas ricas em actina, denominadas estereocílios. Uma membrana acelular, chamada membrana tectória, cobre o epitélio de células ciliadas. As células ciliadas internas são capazes de transformar a energia mecânica em um sinal elétrico, que é o princípio básico da audição (15).

Quando o som é captado, fluidos se movem pela escala média e fazem vibrar a membrana basilar e a membrana tectória. As vibrações provocam a deflexão dos estereocílios, permitindo o influxo de íons potássio por meio da abertura de canais que

despolarizam a membrana das células ciliadas internas. Essa despolarização provoca a liberação de vesículas contendo neurotransmissores nas células ciliadas internas ou externas, que desencadeiam o impulso nervoso. Esses impulsos elétricos são transmitidos ao nervo auditivo, que leva a informação ao cérebro, onde são interpretados. A Figura 2 traz uma ilustração esquemática da cóclea e detalhes de suas porções, evidenciando a localização das células ciliadas do órgão de Corti e dos estereocílios (15).

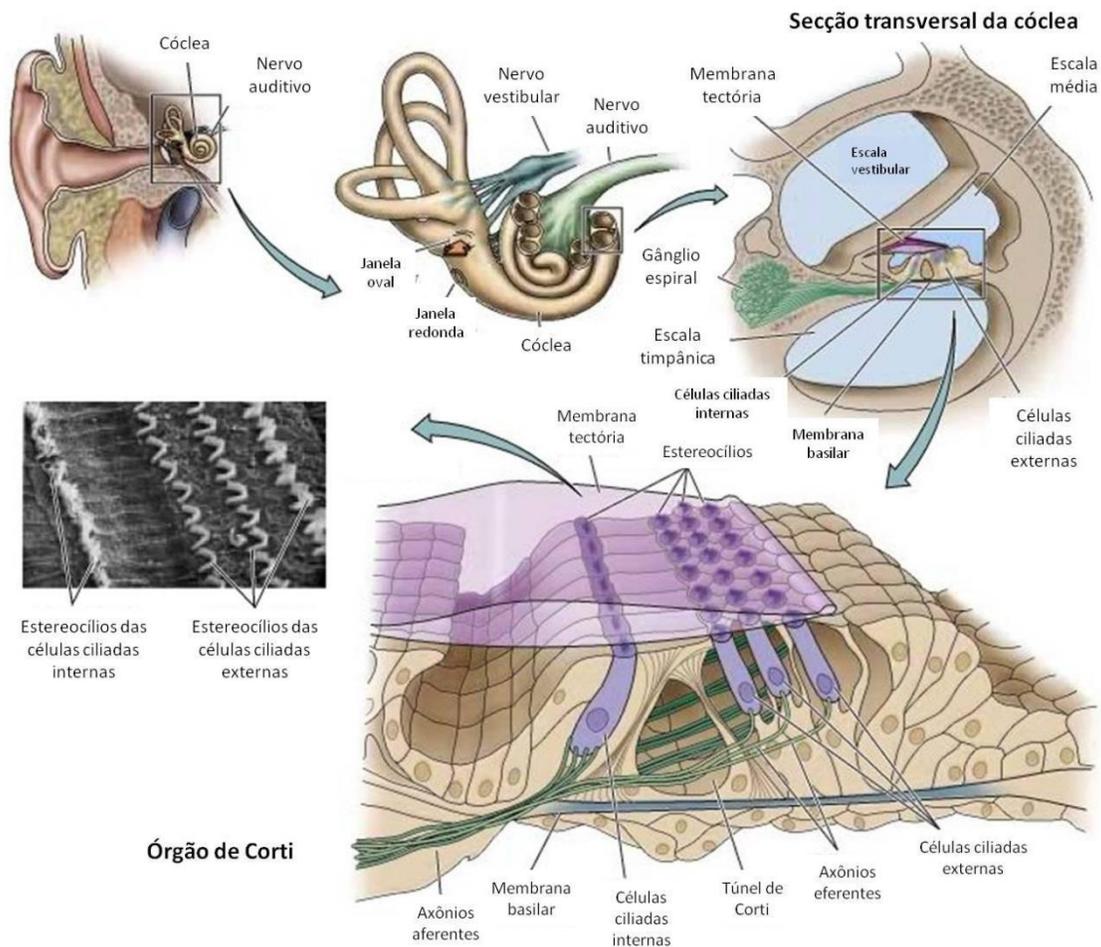


Figura 2: Ilustração esquemática da cóclea vista de frente e em secção transversal. A secção transversal da cóclea mostra a escala média entre as escalas vestibular e timpânica. Em destaque esquema detalhado do órgão de Corti e micrografia dos estereocílios das células ciliadas (Adaptado de: “The inner ear”, capítulo “The Auditory System” do livro “Neuroscience”, editado por Purves e colaboradores (2001) e disponível no *NCBI Bookshelf* – <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/bookshelf/br.fcgi?book=neurosci&part=894>) (30).

Ainda com relação ao sistema auditivo central, ele está envolvido no processamento auditivo, ou seja, numa série de processos relacionados à análise e interpretação de sons, que culmina no reconhecimento de sons complexos, como os da fala (26, 31).

3.2. Perda Auditiva

A perda auditiva é a deficiência congênita mais frequente dentre aquelas rotineiramente triadas em programas de saúde preventivos (9) (Disponível em URL: <http://www.gatanu.org>). Segundo a OMS, surdez refere-se à perda total da audição em uma ou em ambas as orelhas, já a perda de audição refere-se tanto a perda completa ou parcial da capacidade de ouvir (10). Nos dois casos pode ocorrer um desvio ou mudança das estruturas ou da função auditiva (32, 33, 34).

De acordo com Roslyng-Jensen, uma perda auditiva em uma criança é qualquer comprometimento da audição que reduza a inteligibilidade da mensagem falada a um grau de inadequação para interpretação apurada ou para aprendizagem (14).

A perda auditiva é classificada de acordo com o segmento anatômico em que a lesão está situada, podendo ser classificada em: (1) perda auditiva condutiva, onde as ondas sonoras não atingem a orelha interna da forma adequada devido a alterações na orelha externa e/ou média (membrana do tímpano, cadeia ossicular, janelas redonda ou oval, ou mesmo a tuba auditiva); (2) perda auditiva neurosensorial, cujas causas estão localizadas na cóclea e/ou no nervo coclear; (3) perda auditiva mista, onde o portador possui defeitos nos componentes condutivos e neurosensoriais na mesma orelha; e (4) perda auditiva central, quando os distúrbios auditivos ocorrem em consequências de lesões na via auditiva central (34, 35, 36).

As perdas auditivas podem ainda ser classificadas de acordo com o seu início como congênitas, quando ocorrem antes ou durante o nascimento e adquiridas, quando ocorrem após o nascimento. Se estiver presente ao nascimento ou antes, da aquisição da linguagem, a perda auditiva é pré-lingual e, quando se manifesta após a aquisição da linguagem, pós-lingual (37).

A surdez também pode ser definida de acordo com o seu grau. Segundo Finsterer e Fellingner (17), em indivíduos adultos a audição normal 0 a 25 dB; perda leve 26 a 40 dB;

perda moderada 41 a 71 dB; perda severa 71 a 90 dB; perda profunda acima de 91 dB. Para crianças a classificação quanto ao grau de acordo com Northern e Downs (20) é: audição normal 0 a 15 dB; perda discreta 16 a 25 dB; perda leve 26 a 40 dB; perda moderada 41 a 70 dB; perda severa 71 a 90 dB; perda profunda acima de 91 dB. A avaliação é feita através dos limiares tonais nas frequências que variam de 0,5 a 4 kHz, que são essenciais para o entendimento da fala (17).

Outro critério é quanto à lateralidade, sendo chamada de bilateral quando as duas orelhas são afetadas, e de unilateral quando a deficiência auditiva está presente em apenas um dos lados (17).

Quando os casos de surdez são acompanhados por outras manifestações clínicas, são caracterizados como sindrômicos, ao contrário da perda auditiva não-sindrômica, onde esta é o único fenótipo (15).

A surdez pode surgir com o avançar da idade devido ao processo degenerativo natural. Nesse caso, mais de 25% da população com 65 anos de idade e cerca de 50% com mais de 80 sofrem de diferentes graus de perda auditiva, também conhecida como presbiacusia (15).

A perda auditiva pode ser causada por fatores ambientais ou genéticos (Quadro 1). Dentre os fatores ambientais inclui-se a exposição frequente a ruído de alta intensidade, o uso de drogas ototóxicas, infecções, entre outros. Quanto aos fatores genéticos, mutações em diferentes genes ou em elementos regulatórios que estão envolvidos no desenvolvimento adequado, na estrutura e na função da orelha podem levar a diferentes graus de perda auditiva (15).

Quadro 1 - Fatores ambientais e genéticos envolvidos com a perda auditiva (38).

CAUSAS DE PERDA AUDITIVA		
Ambiental	Pré-natal	Infecção materna (rubéola, citomegalovírus).
		Uso de medicamentos durante a gestação.
		Irradiação (raios-X) durante a gravidez.
	Peri-natal	Icterícia grave
		Trauma de parto
		Anóxia
	Pós-natal	Otites (Medicação ototóxica)
		Meningite (Exposição a ruídos intensos)
		Sarampo (Envelhecimento)
		Caxumba
Traumatismo		
Genética	Sindrômico	Autossômico dominante
		Autossômico recessivo
		Ligado ao X
		Mitocondrial
	Não-Sindrômico	Autossômico dominante
		Autossômico recessivo
		Ligado ao X
		Mitocondrial

Nos países em desenvolvimento, ainda existe prevalência dos fatores ambientais como causa das perdas auditivas. As infecções pré-natais como rubéola, meningite, toxoplasmose, citomegalovírus, sífilis, herpes simples, entre outras, constituem a primeira causa de perda auditiva infantil identificável. Os fatores perinatais como ventilação mecânica, hipóxia, hiperbilirrubinemia, também contribuem para a etiologia das perdas auditivas, sendo que com o aumento da sobrevivência de neonatos de risco e prematuros, a frequência aumentou nos últimos anos. Doenças infecciosas pós-natais, como meningite, sarampo, caxumba e infecções crônicas na orelha, também desempenham um papel importante na etiologia das perdas auditivas. Outras causas comuns incluem: exposição frequente a ruídos intensos, lesões na cabeça e orelha, envelhecimento e uso de drogas ototóxicas (39, 40, 10).

A surdez é uma doença extremamente heterogênea, tanto no aspecto clínico como no genético e tem sido considerado o distúrbio sensorial mais prevalente em humanos (37).

Segundo dados da OMS, 360 milhões de pessoas cerca de 5% da população mundial apresenta algum tipo de problema auditivo, sendo 328 milhões de adultos e 32 milhões de

crianças. A maioria desses casos é de pessoas que vivem em países em desenvolvimento (10).

Em países desenvolvidos 1 em cada 1000 crianças nasce com perda auditiva, sendo 60% dos casos de surdez congênita de origem genética, 30% adquiridos e 10% idiopáticas, ou seja, de causa desconhecida (5, 6, 7).

No Brasil, essa frequência é estimada em 4 a cada 1000 nascimentos (8). No entanto, essa frequência pode variar de acordo com a região estudada, podendo a surdez estar presente em 2 a 7 para cada 1000 recém-nascidos (5, 38).

Segundo dados coletados no censo de 2010 o IBGE calculou que no Brasil 9,7 milhões de pessoas apresentam algum tipo de perda auditiva e estudos mostram que de 32 a 40% dos casos a etiologia não é esclarecida (41,42).

3.3. Etiologia Genética da Surdez

O estudo genético da surdez, além de contribuir para determinar sua etiologia, também proporciona um melhor entendimento da fisiologia da audição, à medida que, por meio de mutações pode-se entender melhor as funções das proteínas envolvidas nesse complexo mecanismo (16).

Sabe-se que em países desenvolvidos mais de 50% dos casos de surdez têm origem genética e o estudo de suas causas avançou significativamente nos últimos anos, sendo identificados vários genes relacionados a esta alteração. A surdez genética pode ser classificada como forma não-sindrômica, quando mutações em alguns desses genes causam perda auditiva de forma isolada, ou ainda formas sindrômicas, onde a perda auditiva é um dos sinais clínicos de diversas síndromes. Desses genes, muitos já estão perfeitamente isolados e identificados (16).

Avanços na pesquisa sobre as bases moleculares do sistema auditivo permitiram a identificação e caracterização dos genes e proteínas relacionados à audição. Esse conhecimento contribui não só para uma melhor compreensão dos mecanismos da audição, mas também das bases moleculares da perda auditiva. Esta pesquisa básica é pré-requisito para o desenvolvimento do diagnóstico molecular e de novas terapias para a surdez (43).

As funções dos genes envolvidos na audição são diversas, e inclui genes que codificam componentes de matriz extracelular, proteínas de *gap junctions* e adesão, canais

de íons e transportadores, proteínas de superfície das células e receptores, assim como proteínas de citoesqueleto, fatores de transcrição, RNAt, RNAr e outras proteínas (17,44).

Estima-se que de 300 a 500 genes estejam envolvidos no mecanismo da audição. A complexidade fisiológica da audição e o envolvimento de tantos genes levam a uma grande heterogeneidade genética da surdez (17).

Além do grande número de genes descritos, outro fator que aumenta a complexidade genética da perda auditiva é que um mesmo gene pode apresentar mutações que resultam em diferentes padrões de herança, recessivo ou dominante, ou ainda estar envolvido tanto com surdez não-sindrômica como sindrômica (44).

3.3.1. Surdez sindrômica

Na forma sindrômica a surdez hereditária pode estar associada a malformações craniofaciais ou cervicais, displasias esqueléticas, anomalias cutâneas ou oculares, doenças neurológicas e disfunções renais ou metabólicas, entre outras. (45).

Existem mais de 400 síndromes descritas, que incluem a surdez como uma de suas manifestações clínicas. Estima-se que 30% dos casos de surdez pré-lingual sejam sindrômicos (19,45). Até o momento já foram identificados pelo menos 35 genes associados a esse padrão. A seguir estão destacadas as principais síndromes que incluem a surdez como sinal clínico (Quadro 2).

Quadro 2 - Principais síndromes que apresentam a perda auditiva como sinal clínico (Baseado em Van Camp & Smith. Hereditary Hearing Loss Homepage. Disponível em <<http://hereditaryhearingloss.org>>) (46).

Síndrome	Gene	Locus	Localização Cromossômica
Usher			
Tipo I	-	USH1A	14q32
	<i>MYO7A</i>	USH1B	11q13.5
	<i>USH1C</i>	USH1C	11p15.1
	<i>CDH23</i>	USH1D	10q22.1
	Desconhecido	USH1E	21q21
	<i>PCDH15</i>	USH1F	10q21-22
	<i>SANS</i>	USH1G	17q24-25
Tipo I	Desconhecido	USH1H	15q22-23
Tipo II	<i>USH2A</i>	USH2A	1q41
	Desconhecido	USH2B	3p23-24.2
	<i>VLGR1</i>	USH2C	5q14.3-q21.3
	<i>WHRN</i>	USH2D	9q32
Tipo III	<i>USH3A</i>	USH3	3q21-q25
	<i>PDZD7</i>	-	10q24.31
Waarderburg			
Tipo I	<i>PAX3</i>	WS1	2q35
Tipo IIA	<i>MITF</i>	WS2A	3p14.1 3p12.3
Tipo IIB	Desconhecido	WS2B	1p21-p13.3
Tipo IIC	Desconhecido	WS2C	8p23
Tipo IID	<i>SNAI2</i>	WS2D	8q11
Tipo III	<i>PAX3</i>	WS3	2q35
Tipo V	<i>EDNRB</i>	WS4	13q22
	<i>EDN3</i>	WS4	20q13.2-q13.3
	<i>SOX10</i>	WS4	22q13

Alport	<i>COL4A5</i>	-	Xq22
	<i>COL4A3/ COL4A4</i>	-	2q36-q37
Branquio-oto-renal	<i>EYA1</i>	BOR1	8q13.3
	<i>SIX5</i>	BOR2	19q13.3
	Desconhecido	-	1q31
	<i>SLX1</i>	BOS3	14q21.3-q24.3
Jervell e Lange-Nielsen	<i>KCNQ1</i>	JLNS1	11p15.5
	<i>KCNE1</i>	JLNS2	21q221.1-q22.2
Pendred	<i>SLC26AA</i>	PDS	7q21-34
	<i>FOXII</i>	PDS	5q35.1
Stickler	<i>COL2A1</i>	STL1	12q13.11-q13.2
	<i>COL11A1</i>	STL2	1p21
	<i>COL11A2</i>	STL3	6p21.3
	<i>COL9A1</i>	-	6q13
Treacher Collins	<i>TCOF1</i>	TCOF1	5q23-q33.1
Doença de Norrie	<i>NDP</i>	NDP	Xp11.3
CHARGE	<i>SEMA3E</i>	-	7q21.11
	<i>CHD7</i>	-	19q13.3

3.3.2. Surdez não síndrômica

A surdez não-sindrômica corresponde a 70% dos casos de perda auditiva e é quase exclusivamente monogênica e altamente heterogênea (47, 46, 45).

Os casos de surdez não-sindrômica podem ser classificados quanto ao seu mecanismo de herança. Aproximadamente 75 a 80% dos casos são de herança autossômica recessiva, 20 a 25% autossômica dominante e cerca de 1 a 2% ligada ao cromossomo X. Além disso, a frequência da herança mitocondrial é estimada em 1% (48, 19).

Uma nomenclatura padronizada e classificação comum têm sido usadas para *loci* e genes envolvidos com perda auditiva (49). Os *loci* da surdez não-sindrômica são designados como *DFN* (do inglês *deafness*), acrescida das letras A ou B, significando

forma de transmissão autossômica dominante (DFNA) e recessiva (DFNB), respectivamente. Quando se denomina DFNX trata-se de surdez de transmissão ligada ao cromossomo X. Os números que acompanham essas nomenclaturas são dados sequencialmente de acordo com a ordem cronológica de descoberta da doença.

A heterogeneidade genética da perda auditiva não-sindrômica é extremamente elevada. Até o momento, foram mapeados quase 150 *loci* e mais de 60 genes já foram identificados, que podem ser observados no Quadro 3 (46, 50).

Quadro 3 - Genes associados à perda auditiva não-sindrômica Baseado em Van Camp & Smith. Hereditary Hearing Loss Homepage. Disponível em <<http://hereditaryhearingloss.org>> (46).

Herança autossômica recessiva ou dominante		
Gene	Locus	Função do produto na audição
<i>GJB2</i>	DFNB1/DFNA3A	Homeostase iônica
<i>TMC1</i>	DFNB7/11/DFNA36	Desconhecida
<i>TECTA</i>	DFNB21/DFNA8/12	Proteína da matriz extracelular
<i>MYO7A</i>	DFNB2/DFNA11	Proteína motora dos estereocílios
<i>GJB6</i>	DFNB1/DFNA3B	Homeostase iônica
<i>MYO6</i>	DFNB37/DFNA22	Proteína motora dos estereocílios
<i>GJB3</i>	-/DFNA2B	Homeostase iônica
<i>COL11A2</i>	DFNB53/DFNA13	Proteína da matriz extracelular
Herança autossômica recessiva		
Gene	Locus	Função do produto na audição
<i>SLC26A4</i>	DFNB4	Homeostase iônica

<i>MYO15A</i>	DFNB3	Proteína motora dos estereocílios
<i>OTOF</i>	DFNB9	Exocitose nas vesículas sinápticas das células ciliadas internas
<i>CDH23</i>	DFNB12	Proteína de adesão dos estereocílios
<i>TMPRSS3</i>	DFNB8/10	Desconhecida
<i>TRIOBP</i>	DFNB28	Formação do citoesqueleto dos estereocílios
<i>TMIE</i>	DFNB6	Desconhecida
<i>PJVK</i>	DFNB59	Sinalização de células ciliadas e neurônios
<i>ESPN</i>	DFNB36	Formação do citoesqueleto dos estereocílios
<i>PCDH15</i>	DFNB23	Proteína de adesão dos estereocílios
<i>ESRRB</i>	DFNB35	Fator de transcrição
<i>MARVELD2</i>	DFNB49	Homeostase iônica
<i>LHFPL5</i>	DFNB66/67	Proteína de adesão dos estereocílios
<i>STRC</i>	DFNB16	Proteína da matriz extracelular
<i>CLDN14</i>	DFNB29	Homeostase iônica
<i>RDX</i>	DFNB24	Formação do citoesqueleto dos estereocílios
<i>MYO3A</i>	DFNB30	Proteína motora dos estereocílios
<i>SLC26A5</i>	DFNB61	Motor molecular de células ciliadas externas

<i>WHRN</i>	DFNB31	Proteína do arcabouço proteico dos estereocílios
<i>USH1C</i>	DFNB18	Proteína do arcabouço proteico dos estereocílios
<i>OTOA</i>	DFNB22	Proteína da matriz extracelular
<i>GRXCR1</i>	DFNB25	Desconhecida
<i>LOXHD1</i>	DFNB77	Feixe de estereocílios
<i>TPRN</i>	DFNB79	Feixe de estereocílios
<i>GPSM2</i>	DFNB82	Proteína transmembrânica
<i>PTPRQ</i>	DFNB84	Sinalização celular
<i>HGF</i>	DFNB39	Sinalização celular
<i>LRTOMT</i>	DFNB63	Desconhecida
<i>MSRB3</i>	DFNB74	Óxido-redução mitocondrial
<i>SERPINB6</i>	DFNB91	Inibidor de protease intracelular
<i>ILDRI</i>	DFNB42	Desconhecida
<i>GIPC3</i>	DFNB15/72/95	Feixe de estereocílios
Herança autossômica dominante		
Gene	Locus	Função do produto na audição
<i>WFS1</i>	DFNA6/14/38	Homeostase iônica
<i>KCNQ4</i>	DFNA2A	Homeostase iônica
<i>COCH</i>	DFNA9	Proteína da matriz extracelular
<i>MYO1A</i>	DFNA48	Desconhecida
<i>ACTG1</i>	DFNA20/26	Formação do citoesqueleto dos estereocílios
<i>EYA4</i>	DFNA10	Fator de transcrição
<i>MYH14</i>	DFNA4	Desconhecida

<i>DFNA5</i>	DFNA5	Desconhecida
<i>POU4F3</i>	DFNA15	Fator de transcrição
<i>CRYM</i>	-	Homeostase iônica
<i>TFCP2L3</i>	DFNA28	Fator de transcrição
<i>MYH9</i>	DFNA17	Proteína motora dos estereocílios
<i>CCDC50</i>	DFNA44	Formação do citoesqueleto dos estereocílios
<i>DIAPH1</i>	DFNA1	Formação do citoesqueleto dos estereocílios
<i>MIRN96</i>	DFNA50	Regulação da expressão gênica
<i>TJP2</i>	DFNA51	Manutenção de diferença de potencial elétrico
<i>SMAC/DIABLO</i>	DFNA64	Indução de apoptose
Herança ligada ao X		
Gene	Locus	Função do produto na audição
<i>POU3F4</i>	DFNX2	Fator de transcrição
<i>PRPS1</i>	DFNX1	Metabolismo de purina e biossíntese de nucleotídeos
<i>SMPX</i>	DFNX3	Desconhecida
Herança mitocondrial		
Gene	Locus	Função do produto na audição
<i>MT-RNR1</i>	12S RNAr	RNA ribossômico mitocondrial
<i>MT-TS1</i>	RNA _t Ser(UCN)	RNA transportador mitocondrial

Os genes causadores da perda auditiva podem ser classificados em 6 grupos:

- 1- Genes que codificam proteínas componentes de canais iônicos e junções intercelulares (*GJB2* e outras conexinas, *KCNQ4*, claudina 14);
- 2- Genes que codificam proteínas de citoesqueleto ou de membrana e estão envolvidas com formação e estabilização estrutural do estereocílio (miosina, caderina, fana-acti, harmonina, prestina);
- 3- Genes que estão envolvidos com funcionamento de sinapse (*OTO*Ferlina, miosina);
- 4- Genes que codificam proteínas de matriz extracelular, como da membrana tectórica (tecta, *co111A2*, Coch, otoancorina);
- 5- Genes que codificam fatores de transcrição (*POU3FA*, *PU4F3*, *EYA4*, *TFCP2L3*);
- 6- Genes de função desconhecida (*DFNA5*) (51).

3.4. Principais Genes Estudados

3.4.1. Gene *GJB2*

O gene *GJB2* foi clonado e isolado em 1997, sendo o primeiro gene nuclear associado à perda auditiva sensorineural não-sindrômica de padrão autossômico recessivo (SNSAR), contribuindo imensamente para o avanço do diagnóstico molecular da surdez. O gene *GJB2* codifica a proteína conexina 26 (Cx26) e mutações nesse gene são responsáveis por 50% dos casos de perda auditiva SNSAR, o que afirma a importância de testes moleculares para investigar mutações nesse gene (52, 53, 54).

A proteína Cx26 possui 226 aminoácidos, se expressa na cóclea, e está associada a comunicação celular (*gap junctions*), é responsável por formar canais que medeiam à passagem de pequenas moléculas e íons entre membranas celulares, permitindo, por exemplo, a reciclagem de íons de potássio nos fluidos cocleares. Mutações nesse gene podem alterar a função da Cx26, levando a uma deficiência no fluxo de íons potássio, podendo levar à morte celular e conseqüentemente à surdez, já que níveis elevados de potássio podem afetar a função e a sobrevivência das células de suporte necessárias à audição (55, 17).

O gene *GJB2* está localizado no cromossomo 13q11-q12, apresenta 5513 pb e possui dois éxons, porém somente o segundo éxon contém a região codificante, sendo o primeiro

não-codificante (56). A Figura 3 traz uma representação esquemática da estrutura do gene da Cx26.

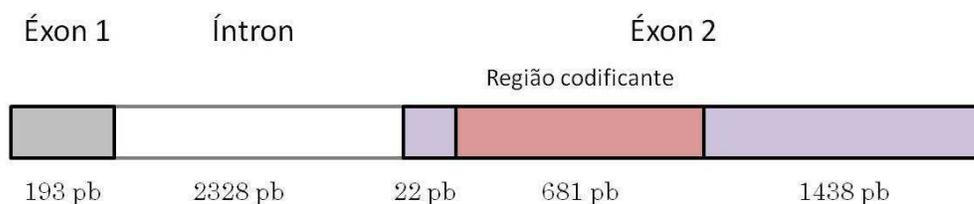


Figura 3: Representação esquemática da estrutura do gene *GJB2* (Baseado em: Benson, *et al.* GenBank. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>>). (57).

Mutações no gene da conexina 26 também podem determinar a perda auditiva com padrão dominante de herança (58). Acredita-se que mutações presentes no gene da conexina 26 podem ser responsáveis por cerca de 20% de todas as perdas auditivas sensorineurais (59).

Cerca de 310 mutações já foram descritas no gene *GJB2*, das quais algumas são bastante frequentes e outras são raras (60). O espectro de mutações difere substancialmente entre as populações, devido a diferenças étnicas específicas, como o caso da mutação *235delC* frequente entre japoneses, *167delT* em judeus e *V37I* em taiwaneses (61).

A mutação mais frequente é a *c.35delG* que está relacionada a um padrão de herança autossômico recessivo. Devido sua alta frequência em várias populações tem grande relevância no rastreamento das causas de deficiência auditiva. Esta mutação trata-se da deleção de uma guanina em uma sequência de seis guaninas que se estendem da posição 30 a 35 dos nucleotídeos, no éxon codificante do gene *GJB2*, o que resulta na interrupção do quadro de leitura (*frameshift*). Dessa forma, a glicina é convertida para valina no códon 12, e um códon de terminação (*stop* códon) prematuro é formado no códon 13. A mutação ocasiona, portanto, a síntese de um polipeptídeo incompleto, com 12 aminoácidos, ao invés do polipeptídeo normal, com 226 aminoácidos (62, 63, 58, 64, 65, 47).

A mutação *c.35delG* provavelmente surgiu na população europeia, há cerca de 10.000 anos. Essa mutação existiu na população caucasóide por algum tempo e depois se propagou por todas as outras populações, alcançando um alto número de portadores (66). Portanto, a mutação *c.35delG* não é rara, sua presença em heterozigose pode ser encontrada em até 4%

dos indivíduos em algumas populações (65, 67). Inicialmente foi levantada a hipótese de que essa região seria um sítio genômico com maior probabilidade de ocorrerem mutações, ou seja, um ponto quente para mutações, denominado “hot spot” (68). Porém, estudos posteriores sugeriram que essa mutação ocorreu uma única vez em um cromossomo que carregava essa alteração, por meio de um único evento mutacional em um cromossomo fundador. Neste caso, a alta frequência de indivíduos com essa mutação sugere efeito fundador e não “hot spot” (66, 69).

O perfil clínico dos casos com deficiência auditiva caracterizada por mutações no gene *GJB2* é frequentemente pré-lingual, bilateral, simétrico e de grau severo a profundo, mas pode variar de acordo com a alteração genética e/ou particularidades individuais (70).

A pesquisa dessa mutação em 620 recém-nascidos de uma cidade do interior do Estado de São Paulo revelou a presença de 6 heterozigotos, o que permitiu estimar uma frequência de aproximadamente 1:100 (71). Outro estudo mostrou que a mutação *c.35delG* é a mais frequente entre os portadores de perda auditiva brasileiros, no qual em uma amostra de 36 pacientes com perda auditiva não esclarecida, 22% eram portadores dessa mutação. Em estudos posteriores foi possível determinar a frequência da mutação *c.35delG* em uma amostra brasileira de 227 recém-nascidos bem caracterizada, sendo encontrada em 1:100 em afro-brasileiros, 1:50 em caucasianos e ausente em brasileiros com descendência asiática (72).

Esta mutação é mais frequente que algumas mutações investigadas no Teste do Pezinho como a mutação predominante da fibrose cística, $\Delta F508$ (cerca de 2,3%), e ainda apresenta uma frequência semelhante à da mutação mais comum do gene da β -globina (IVS1 – 110G \rightarrow A), que causa talassemia β (73).

3.4.2. *SLC26A4*

O gene *SLC26A4* tem sido apontado como o segundo gene mais envolvido na surdez sensorineural não-sindrômica, apresenta padrão de herança autossômico recessivo (74). Está localizado no cromossomo 7q31.1, possui 21 éxons, sendo 20 codificantes. Este gene codifica uma proteína denominada pendrina composta de 780 aminoácidos. A proteína

pendrina é transportadora de ânions como iodeto, formiato, nitrato e bicarbonato, sendo abundantemente expressa na tireóide, orelha interna e rim (75, 76).

Extensivos estudos revelaram que a perda da secreção de bicarbonato na endolinfa, mediada pela pendrina, leva a acidificação do fluido e inibe a atividade de canais sensíveis a pH, resultando no aumento da concentração do íon cálcio no meio. A baixa concentração de Ca^{2+} na endolinfa na orelha interna é necessária para a audição normal e equilíbrio (77).

Mutações presentes no gene *SLC26A4*, podem estar envolvidas nos casos de surdez não-sindrômica associada com o aqueduto vestibular alargado (DFNB4), ou nos casos de Síndrome de Pendred, a forma mais comum de surdez sindrômica, podendo estar associada à malformação da orelha interna. A malformação da orelha interna nos indivíduos que apresentam síndrome de Pendred pode variar do alargamento do aqueduto vestibular à displasia de Mondini (74, 78, 79).

Mais de 200 alterações foram reportadas no gene *SLC26A4*. Devido a isso, vem sendo apontado como o segundo maior gene envolvido nos casos de perda auditiva de origem genética, responsável por 4% a 10% dos casos, seja ele na forma sindrômica (SP) ou na forma não-sindrômica (DFNB4). O padrão da perda auditiva neurossensorial é bilateral, pré-lingual ou durante a aquisição da linguagem falada, com grau severo/profundo (74, 80).

3.4.3. *OTOF*

O gene *OTOF* codifica a proteína otoferlina, pertencente à família das Ferlinas. É expressa no cérebro, no sistema vestibular e nas células ciliadas internas e externas. Sabe-se que esta proteína está envolvida no processo auditivo, sendo essencial para o funcionamento normal da audição. Estima-se que esta proteína apresenta papel importante nas sinapses entre as células ciliadas internas e o nervo auditivo (81, 82).

Estudos foram realizados para detectar a interferência na audição, associando alterações no gene ao padrão autossômico recessivo. Pesquisadores acreditam que a otoferlina desempenha um papel na liberação de sinais químicos (neurotransmissores), de acordo com a concentração de cálcio, a partir de células nervosas envolvidas no mecanismo da audição (83, 84).

O gene se encontra na região cromossômica 2p22-p23, apresenta 101.496 pb arranjados em 48 éxons, sendo os primeiros 19 éxons comuns a todas isoformas, que podem variar devido aos *splicing* alternativos que ocorrem, mas a sua maior estrutura apresenta um RNAm com 7171 pb e uma proteína de 1997 aminoácidos. O lócus ocupado inicialmente era DFNB6, porém o gene *OTOF* recebe atualmente a classificação no lócus DFNB9 (85).

Mutações no gene *OTOF* são responsáveis pelo espectro da neuropatia auditiva, que é uma forma única de perda que envolve ausência de audição ou anormalidade grave de tronco encefálico, onde existe a presença de emissões otoacústicas (EOAs). No entanto, com a idade, as EOAs podem desaparecer, tornando difícil distinguir esta condição como perda auditiva não-sindrômica, o que pode levar a uma frequência subestimada da neuropatia auditiva (86).

Até o início de 2014, 72 mutações foram reportadas neste gene de acordo com o *Human Gene Mutation Database*. Em um estudo realizado com indivíduos espanhóis, a mutação *p.Q829X* apresentou maior frequência. Neste mesmo estudo, verificou-se a frequência de 4,4% nos casos recessivos esporádicos ou familiar da população espanhola, sendo considerada a terceira mais frequente mutação relacionada com a perda auditiva nesta população, responsável por, aproximadamente, 3% de todos os casos de perda auditiva pré-lingual com padrão autossômico recessivo. Com tais parâmetros, é sugerido incluir tal alteração na triagem laboratorial da perda auditiva prélingual (87).

3.4.4. *MYO15A*

O gene *MYO15A* codifica a proteína miosina XVa, é composta por 3.530 pb, arranjados em 66 éxons, sendo essencial para a formação de estereocílios nas células ciliadas da cóclea. No órgão da Corti a miosina XVa está localizada exclusivamente nas pontas dos estereocílios, essa proteína utiliza ATP para se mover ao longo dos filamentos de actina (88, 89, 90, 91).

De acordo com OMIM, 13 mutações já foram descritas nesse gene. Estudos feitos no Brasil identificaram duas novas mutações com padrão de herança recessiva no gene

MYO15A em uma grande família brasileira com surdez pré-lingual, *c.10573delA* e *c.9957_9960delTGAC* (92, 93).

3.4.5. Genes Mitocondriais

Além de mutações em genes nucleares, estima-se que em cerca de 1% dos casos de surdez não-sindrômica ocorra herança materna, portanto relacionada ao DNA mitocondrial (mtDNA). Os principais genes mitocondriais relacionados à perda auditiva não-sindrômica são o *MT-RNR1* com 953pb, que codifica a subunidade 12S do RNA ribossômico (RNAr) e o *MT-TS1* com 68 pb, que codifica RNAs transportadores de serina [RNAtSer(UCN)]. Os dados audiológicos mostram que nesses casos a surdez é sempre sensorineural, normalmente progressiva e bilateral em altas frequências, com evidente variabilidade na gravidade dentro da mesma família. A mutação mitocondrial mais frequente na população brasileira é a *A1555G*, localizada no gene *MTRNR1* (94).

A mutação *A1555G* tem sido detectada no gene mitocondrial *MTRNR1* em pacientes com deficiência auditiva familiar e também em casos isolados com deficiência induzida pelo uso de antibióticos aminoglicosídeos. Essa mutação torna os indivíduos suscetíveis à deficiência auditiva após tratamento com aminoglicosídeos em concentrações que normalmente não afetariam a audição (94).

3.5. Teste de Triagem neonatal

A perda auditiva em crianças é uma alteração de grande impacto no desenvolvimento infantil, pois se não for detectada e tratada precocemente, pode levar a atraso no desenvolvimento da linguagem e da fala, e conseqüentemente a problemas sociais e emocionais e ao fracasso escolar. Tais problemas podem impactar a qualidade de vida de indivíduos e suas famílias (95).

A triagem é o processo de se aplicar procedimentos rápidos e simples em um grande número de pessoas, onde o principal objetivo é identificar indivíduos com maior probabilidade de apresentar um distúrbio (96). Desde a década de 1960, propostas de

triagem auditiva têm sido elaboradas, utilizando-se medidas comportamentais. Em 1969, a audiologista americana Marion Downs sugeriu a formação de um comitê para delinear recomendações de triagem auditiva em recém-nascidos e lactentes. Formou-se então o *Joint Committee of Infant Hearing- JCIH*, constituído por representantes da Academia de Pediatria, Academia de Oftalmologia e Otorrinolaringologia e da Associação Americana de Fala e Audição. Recomendou-se, nesta primeira reunião, o uso de testes de observação comportamental para a triagem auditiva e o registro de alto risco para surdez para identificar os recém-nascidos de risco para perda auditiva severa a profunda. Os cinco critérios adotados foram: História familiar, infecção intraútero, anomalias crânio faciais, baixo peso ao nascer e bilirrubinemia. E em 1982, incluiu-se anóxia neonatal e meningite, sendo recomendada a observação comportamental ou medida eletrofisiológica em RNs que apresentassem indicadores de risco (21).

No final dos anos 80, David Kemp desenvolveu a tecnologia de captação das emissões otoacústicas (EOAs), e houve também o surgimento de procedimentos e equipamentos automáticos para captação do PEATE (Potencial Evocado Auditivo de Tronco Encefálico). E por recomendação do *Nacional Institute of Health-NIH* foram incluídos no sistema de triagem auditiva para todos os RNs nos primeiros três meses de vida. Em 1994 o JCIH endossou o objetivo de detecção universal da perda auditiva na criança, incentivando pesquisas para aprimoramento dos métodos de identificação e intervenção da perda auditiva. Evidências de que a intervenção precoce interferia positivamente no desenvolvimento cognitivo e de linguagem de crianças com perda auditiva validaram essa recomendação do JCIH (21, 97, 98).

Estudos comprovaram que crianças com habilidades cognitivas normais identificadas com perda auditiva antes dos seis meses de idade tiveram melhor desempenho em tarefas de linguagem do que crianças identificadas após os seis meses, independentemente da perda auditiva (99). Em 1999, a Academia Americana de Pediatria emitiu uma declaração recomendando a triagem auditiva e a intervenção precoce (100).

Em 2000, o JCIH, referindo-se aos avanços na tecnologia da triagem, apoiou a triagem auditiva neonatal universal por meio de um programa de detecção e intervenção precoce integrado e interdisciplinar (101). Aplicar a triagem auditiva apenas nas crianças identificadas como de risco, detectava precocemente apenas 50% das crianças com perda

auditiva. Antes disso, a idade de identificação da perda auditiva era de 30 meses e para muitas crianças com perda leve ou moderada, o diagnóstico da perda ocorria apenas na idade escolar (102).

Em 2007, o JCIH publicou os parâmetros e as recomendações utilizadas. Os princípios gerais e os indicadores de qualidade propostos por esta entidade foram:

Princípios gerais

1. Todas as crianças, com no máximo um mês de vida, devem ter acesso à triagem por meio de uma medida fisiológica;
2. Todas as crianças reprovadas na triagem auditiva inicial e no reteste devem passar, até no máximo três meses de idade, por avaliação fonoaudiológica e médica, para confirmar a presença de perda auditiva;
3. Todas as crianças com perda auditiva permanente confirmada devem, depois do diagnóstico, se valer dos serviços de intervenção precoce, assim que possível e nunca após os seis meses de idade;
4. O Programa de detecção e intervenção precoce deve ser centrado na família, com os direitos infantis e da família e privacidade garantida através de escolha informada, tomada de decisão compartilhada, e consentimento dos pais, de acordo com as diretrizes estaduais e federais. As famílias devem ter acesso a informações sobre todas as intervenções e as opções de tratamento e aconselhamento sobre a perda de audição;
5. A criança e a família devem ter acesso imediato à tecnologia de alta qualidade, incluindo aparelhos auditivos, implantes cocleares e outros dispositivos de apoio, quando apropriado;
6. Todos os recém-nascidos e crianças devem ser monitorados, no atendimento médico domiciliar, para verificar se há perda auditiva. A avaliação contínua de desenvolvimento da comunicação deve ser conduzida por profissionais qualificados, para todas as crianças, quer apresentem ou não indicadores de risco para perda auditiva;
7. Programas de intervenção interdisciplinares apropriados para crianças com perda auditiva e suas famílias devem ser prestados por profissionais que estão bem informados sobre a perda de audição na infância. Os programas de intervenção devem reconhecer e desenvolver os pontos fortes, as escolhas informadas, tradições e crenças culturais das

famílias. O planejamento e implementação de sistemas de informação, devem servir de interface com os prontuários médicos eletrônicos.

Indicadores de qualidade

1. Porcentagem de todos os recém-nascidos que completam a triagem até um mês de idade: o valor de referência recomendado é mais do que 95%(é aceitável a correção para prematuros);
2. Porcentagem de todos os recém-nascidos que falham na primeira triagem inicial e nas subsequentes, antes da avaliação audiológica completa: o referencial recomendado é inferior a 4%;
3. Quanto às crianças que falham na triagem inicial e em quaisquer subsequentes, a porcentagem dos que realizam a avaliação audiológica completa, em até três meses de idade: o valor de referência recomendado é 90%;
4. Para as famílias que optarem por amplificação, a porcentagem de crianças com perda auditiva bilateral confirmada e que recebem aparelhos de amplificação dentro de um mês após a confirmação da perda auditiva: o valor de referência recomendado é de 95% (37).

Estima-se que nos Estados Unidos praticamente todas as crianças são triadas ao nascimento. Entretanto, ainda enfrentam o grande desafio de aumentar a adesão dos familiares de crianças que falham na triagem auditiva ao Programa de Triagem Auditiva Neonatal e Intervenção (103, 104, 105).

O Brasil é o país da América Latina com um dos maiores e mais antigos programas de triagem auditiva (106). Desde 1987 são desenvolvidos programas de triagem auditiva neonatal junto à população de alto e baixo risco (107). Em 1998, foi criado GATANU, o Grupo de Apoio a Triagem Auditiva Neonatal, onde o principal objetivo é conscientizar a população para os problemas de audição na infância, e da necessidade para se identificar e intervir precocemente. Nesse mesmo ano também foi criado o Comitê Brasileiro de Perdas Auditivas na Infância- CBPAI, que recomendou a triagem auditiva universal, realizada na ocasião da alta hospitalar, por métodos preferencialmente fisiológicos - PEATE ou emissões otoacústicas ou na falta de recursos financeiros, por métodos comportamentais-reflexo cócleo- palpebral. Em 2000, foi criada a Força Tarefa em Pediatria com o objetivo

de promover e divulgar junto aos pediatras ações de prevenção e identificação precoce das perdas auditivas (9, 108).

Em 2004, foi criada pelo Ministério da Saúde a Política Nacional de Atenção a Saúde Auditiva, por meio da Portaria GM/MS número 2073, com ações que englobavam a atenção básica (trabalhos de promoção da saúde, prevenção e identificação precoce dos problemas auditivos), média e a alta complexidade (diagnóstico, acompanhamento, adaptação/dispensação de próteses auditivas) e terapia fonoaudiológica para maiores e menores de três anos respectivamente. Em outubro do mesmo ano o Ministério da Saúde publicou as portarias 587 e 589, para organizar redes estaduais de serviço de saúde auditiva, para normatizar a Política Nacional de Atenção a Saúde (109).

A OMS em 2009 apresentou dados que revelaram que a triagem auditiva é realizada em aproximadamente 10% dos nascimentos em algumas regiões do país, aplicadas por audiologistas, financiada por pais, governo ou por planos privados de saúde. Além disso, o protocolo mais comumente utilizado na primeira etapa da triagem é o teste de EOAE (10).

O COMUSA (Comitê Multiprofissional em saúde auditiva) foi criado em 2010 para elaborar um documento a partir de recomendações de profissionais de sociedades científicas das áreas de fonoaudiologia, audiologia, otorrinolaringologia e pediatria (110). Esta publicação seguiu as diretrizes do JCIH, 2007, com pequenas adaptações para a situação sócio-sanitária do Brasil (111).

Em agosto de 2010 foi sancionada a Lei Federal Nº 12.303 de 2/08/2010, que tornou obrigatória a realização gratuita do exame denominado Emissões Otoacústicas Evocadas, em todos os hospitais e maternidades, nas crianças nascidas em suas dependências (24). Pelo decreto 7.612, publicado em 2011, fica instituído o Plano Nacional dos Direitos da Pessoa com Deficiência – Plano Viver sem Limite, com a finalidade de promover, por meio da integração e articulação de políticas, programas e ações, o exercício pleno e equitativo dos direitos das pessoas com deficiência, nos termos da Convenção Internacional sobre os Direitos das Pessoas com Deficiência. O Plano Viver sem Limite é executado pela União em colaboração com Estados, Distrito Federal, Municípios, e com a sociedade. São consideradas pessoas com deficiência aquelas que têm impedimentos de longo prazo de natureza física, mental, intelectual ou sensorial, os quais, em interação com diversas

barreiras, podem obstruir sua participação plena e efetiva na sociedade em igualdades de condições com as demais pessoas (112).

Em 2012, por meio da portaria ministerial número 793 houve a instituição da Rede de Cuidados à Pessoa com Deficiência, no âmbito do Sistema Único de Saúde, que revoga a portaria 2073. Esta nova Portaria instituiu a Rede de Cuidados à Pessoa com Deficiência, por meio da criação, ampliação e articulação de pontos de atenção à saúde para pessoas com deficiência temporária ou permanente; progressiva, regressiva, ou estável; intermitente ou contínua, no âmbito do Sistema Único de Saúde (SUS). São objetivos gerais da Rede de Cuidados à Pessoa com Deficiência:

I - ampliar o acesso e qualificar o atendimento às pessoas com deficiência temporária ou permanente; progressiva, regressiva, ou estável; intermitente ou contínua no SUS;

II - promover a vinculação das pessoas com deficiência auditiva, física, intelectual, ostomia e com múltiplas deficiências e suas famílias aos pontos de atenção;

III - garantir a articulação e a integração dos pontos de atenção das redes de saúde no território, qualificando o cuidado por meio do acolhimento e classificação de risco (113).

Em 2012, foram publicadas as Diretrizes de Atenção da Triagem Auditiva Neonatal, com objetivo de oferecer orientações às equipes multiprofissionais para o cuidado da saúde auditiva na infância, em especial à Triagem Auditiva Neonatal, nos diferentes pontos de atenção da rede. Sua elaboração foi uma ação conjunta da Área Técnica de Saúde da Pessoa com Deficiência / Departamento de Ações Programáticas Estratégicas (DAPES) / Secretaria de Atenção à Saúde (SAS) e a Coordenação-Geral de Média e Alta Complexidade/Departamento de Atenção Especializada (DAE)/SAS. Contou com a colaboração da Área Técnica Saúde da Criança/DAPES/SAS/MS, de técnicos de Secretarias Estaduais e Municipais de Saúde, da Academia Brasileira de Audiologia, Sociedade Brasileira de Fonoaudiologia, Sociedade Brasileira de Otologia, Sociedade Brasileira de Pediatria e Associação Brasileira de Otorrinolaringologia e Cirurgia Cervicofacial (114).

Em 2013, o Ministério da Saúde apresentou metas para Política Nacional de Triagem Neonatal integrando a triagem sanguínea (teste do pezinho), a triagem auditiva e ocular. Propôs como ações estratégicas de implementação: Diagnóstico nacional sobre a situação da triagem auditiva neonatal (número de serviços que realizam a TAN, cobertura

populacional, rede de referência para diagnóstico e tratamento); Desenvolvimento de estratégias de implementação e ampliação da triagem auditiva articulada às ações da Rede Cegonha, Rede de Cuidados à pessoa com deficiência e Saúde da Criança; Instituição de sistema de monitoramento e avaliação da implementação da triagem auditiva neonatal (115).

3.6. Diagnóstico das perdas auditivas

Qualquer tipo de alteração auditiva, independentemente do grau ou tipo, acarreta sérias alterações no desenvolvimento global da criança, o que afirma a importância do diagnóstico da deficiência auditiva ser realizado o mais precoce possível. Nesse sentido, as Políticas de Saúde Pública têm preconizado atenção diagnóstica e terapêutica especializada às pessoas com ou sem risco ou suspeita de deficiência auditiva, por meio da oferta de triagem e monitoramento da audição de neonatos, pré-escolares e escolares (109, 116, 117).

Quando a perda auditiva é severa ou profunda, é mais fácil de ser diagnosticada. Quando se trata de perda parcial (permanente ou transitória) de grau leve a moderado, o diagnóstico é mais difícil, entretanto os prejuízos acarretados no aprendizado são significativos (19). Frequentemente, tais tipos de perda passam despercebidas por não existir um trabalho sistematizado de detecção e seguimento de casos, o que requer ação conjunta entre profissionais de saúde, professores e pais (118).

Os avanços no campo da genética molecular humana intensificada nos últimos anos pelo Projeto Genoma Humano conduziram a uma rápida identificação e caracterização dos genes e de alterações gênicas (mutações) responsáveis pelas doenças humanas (18).

A biologia molecular tornou-se uma ferramenta fundamental no diagnóstico de doenças monogênicas. Os testes genéticos moleculares podem ser classificados de acordo com a finalidade de sua utilização: (1) testes com finalidade diagnóstica confirmatória, utilizados para confirmar ou excluir o diagnóstico de uma doença genética em um indivíduo sintomático; (2) testes com finalidade de triagem pré-natal, neonatal ou para identificação de portadores assintomáticos de uma doença autossômica recessiva ou ligada ao cromossomo X, que não apresentam risco de desenvolver a doença, mas podem

transmiti-la a sua descendência; (3) testes preditivos, sejam testes pré-sintomáticos que identificam indivíduos saudáveis que mais tarde apresentarão uma doença hereditária, sobretudo doenças autossômicas dominantes de início tardio, ou testes de identificação de susceptibilidade genética a doenças comuns multifatoriais ou complexas ou testes preditivos de resposta a medicamentos (119).

Testes genéticos para perda auditiva hereditária geram informações para o paciente que pode facilitar intervenção terapêutica no menor tempo possível (120).

Nos últimos 20 anos, o principal objetivo de pesquisas moleculares relacionadas à perda auditiva genética é a detecção de novos genes envolvidos neste tipo de perda. A técnica mais utilizada é o sequenciamento de regiões suscetíveis a conter genes candidatos de perda auditiva (19).

O sequenciamento automático foi muito empregado na descoberta de novos genes e alterações, porém apresentava baixo rendimento, pois o sequenciamento de grandes fragmentos apresentava custo elevado e demandava muito tempo para seu preparo e análise. Diante estas limitações, os sequenciadores automáticos começaram a ser aplicados para varredura de pequenos genes ou fragmentos. Com isso variações das técnicas de *PCR* (*Polymerase Chain Reaction*) foram elaboradas, com o objetivo de detectar as principais mutações, porém, apesar de ser uma técnica com resultados bons ainda se limitava a poucos dados e muito gasto (19).

Como dito anteriormente, muitos genes e mutações estão relacionados à perda auditiva de origem genética. Sendo assim, há a necessidade de um estudo capaz de abranger um número maior de mutações já descritas em um único ensaio, gerando um diagnóstico mais preciso e completo, possibilitando o entendimento dos mecanismos moleculares da perda auditiva em indivíduos com etiologia desconhecida.

As novas tecnologias '*high-throughput*' (alto rendimento), permitem a realização de vários ensaios simultâneos de uma só vez, podendo esclarecer a etiologia de várias perdas auditivas. Além disso, estas técnicas também possibilitaram o rápido diagnóstico de várias patologias de origem genética e a genotipagem de indivíduos, detectando *SNPs* (do inglês *Single-Nucleotide Polymorphism*), mutações, deleções, inserções, etc. (121).

As principais características destas novas tecnologias são a utilização de pequenos volumes de amostras e reagentes nas reações, ótima acurácia e simplicidade (devido à

automação, estações de pipetagem que diminuem o tempo necessário para o desenvolvimento da parte experimental e possíveis erros da pipetagem manual), realização simultânea de diversos ensaios e conseqüentemente menor custo (121).

A triagem auditiva neonatal universal tem sido recomendada como principal estratégia para diminuir a idade em que o diagnóstico da perda auditiva é realizado (101,122).

O diagnóstico precoce de alterações auditivas e a intervenção iniciada até os seis meses de idade garantem à criança o desenvolvimento da compreensão e da expressão da linguagem, bem como o seu desenvolvimento social, comparável com crianças normais da mesma faixa etária. Adicionalmente, as crianças com deficiência auditiva que são adequadamente tratadas antes dessa idade demonstram vantagem significativa no desenvolvimento das habilidades de comunicação, quando comparadas a crianças com potencial cognitivo semelhante, mas que foram identificadas tardiamente (123).

MATERIAL E MÉTODOS

4. Material e Métodos

4.1. Casuística

Fizeram parte deste estudo 1.243 recém-nascidos provenientes do Hospital Universitário de Jundiaí - SP em parceria com a ATEAL – Jundiaí - SP no período de Março a Dezembro de 2013, esses recém-nascidos foram coletados por ordem de nascimento.

A ATEAL (Associação Terapêutica de Estimulação Auditiva e Linguagem), é uma instituição sem fins lucrativos, que visa a (re) habilitação de portadores de deficiência auditiva na região de Jundiaí –SP. A ATEAL fará o acompanhamento nos recém-nascidos portadores de mutações para a perda auditiva.

Os indivíduos foram selecionados por ordem de nascimento, e todos tiveram sua participação autorizada, no momento da audiometria (teste da orelhinha). O teste da orelhinha ou exame de emissões otoacústicas evocadas consiste na produção de um estímulo sonoro e na captação do seu retorno através de uma delicada sonda introduzida na orelhinha do bebê auxiliando assim o diagnóstico precoce da perda auditiva.

Na ocasião, realizou-se também um levantamento de dados com os pais que incluiu: fatores de risco, histórico familiar e descendência. Os dados dos exames audiológicos e da anamnese foram compilados em uma tabela e disponibilizada para consulta pela ATEAL. Os responsáveis que aceitaram participar desse estudo assinaram um termo de consentimento livre e esclarecido. Este projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP em 22/05/2012 sob o Parecer CEP N° 396/2006.

Dos 1243 recém-nascidos participantes do estudo, 77 deles foram incluídos no rastreamento de mutações pela técnica de Espectrometria de Massa (Sequenom).

4.2. Métodos

O estudo molecular foi realizado no laboratório de Genética Molecular Humana do Centro de Biologia Molecular e Engenharia Genética (CBMEG) da UNICAMP.

A coleta das amostras foi dividida em duas etapas, nos 200 primeiros recém-nascidos foram realizadas três tipos de coleta: 1- Saliva com *Swab*, realizada por fonoaudiólogas na ocasião do teste da orelhinha; 2- Gota de sangue em papel FTA®; 3- Gota de sangue em microtubo contendo EDTA (Figura 4). As coletas 2 e 3 foram realizadas no momento do teste do pezinho por enfermeiras previamente treinadas, para aproveitar o procedimento, a fim de não causar mais incomodo ao recém-nascido. Esses métodos de coleta foram escolhidas por serem menos invasivos e pela facilidade de serem implementados na rotina. Os outros 1043 recém-nascidos tiveram amostra coletada apenas em papel FTA. Todos os 1243 recém-nascidos foram rastreados para a *c.35delG*, desses, em 77 foi feito espectrometria de massa.

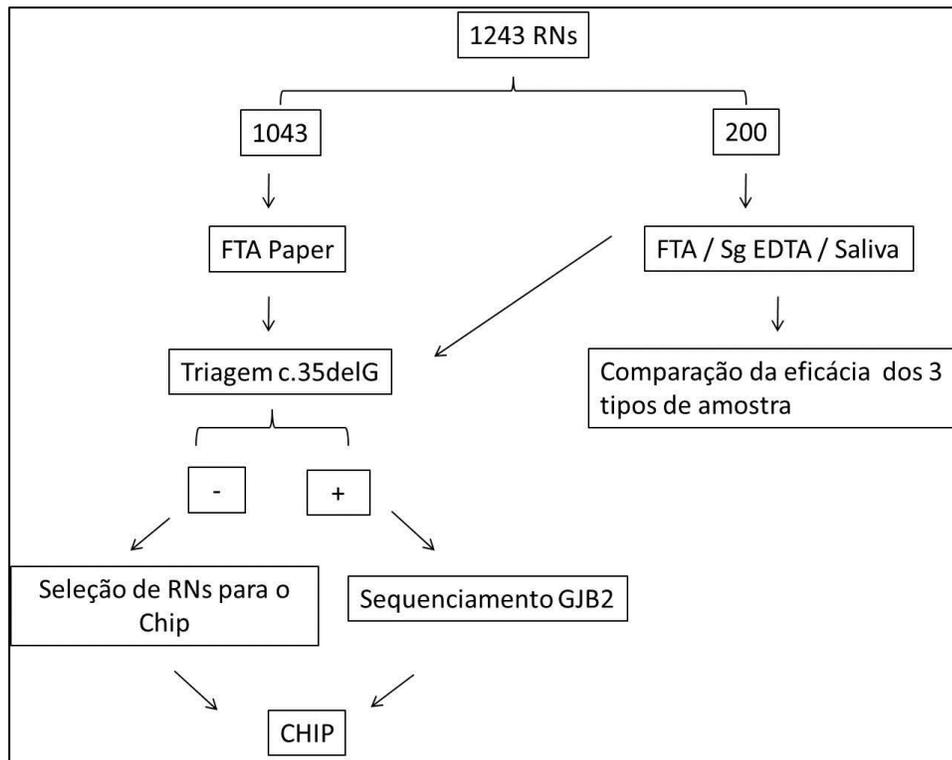


Figura 4: Fluxograma da distribuição da coleta de amostras.

4.2.1. Extração de DNA de Papel

O protocolo de extração foi realizado de acordo com técnicas previamente

padronizadas no Laboratório de Genética Molecular Humana do CBMEG – UNICAMP.

O sangue periférico foi coletado diretamente sobre papel tipo *FTA card*. A amostra então foi colocada para secar por uma hora antes do seu processamento.

Utilizando um picotador ou furador estéril, a amostra foi removida do meio da mancha do papel e colocada dentro de um tubo de amplificação com capacidade para no mínimo 500 μL . A cada tubo foi adicionado 200 μL de NaOH (50mM) e em seguida a amostra foi agitada em vórtex por um a dois segundos em velocidade baixa. Os tubos ficaram por cinco minutos à temperatura ambiente. A seguir, o reagente foi removido ao máximo, cuidadosamente. Esta operação foi repetida mais uma vez, totalizando duas lavagens.

Completada esta etapa, foram adicionados 200 μL de TE 1X [10 mM Tris-HCl (pH 8.0), 0.1 mM EDTA]. Cada tubo foi agitado em vórtex por um a dois segundos em velocidade baixa. Os tubos descansaram por cinco minutos em temperatura ambiente. Após este tempo, retirou-se o sobrenadante de cada amostra. Repetiu-se esta operação por mais uma vez, totalizando duas lavagens.

Após a remoção total do sobrenadante dos tubos, estes foram mantidos em temperatura ambiente *overnight* para secagem total do papel.

Em seguida adicionou-se 300 μL de TE 1X [10 mM Tris-HCl (pH 8.0), 0.1 mM EDTA] em cada tubo, os tubos foram então incubados à 57°C em banho maria por uma hora, para que o DNA se desprendesse do papel.

4.2.2. Extração de DNA de Saliva

O protocolo de extração foi realizado de acordo com técnicas previamente padronizadas no Laboratório de Genética Molecular Humana do CBMEG – UNICAMP.

A saliva foi coletada utilizando-se Swab, através de movimentos circulares nos dois lados da bochecha. Em seguida o Swab foi cortado em um microtubo de 1,5mL contendo 600 μL de NaOH 50mM.

Em seguida o tubo foi levado ao vórtex em alta rotação por 10 segundos, na sequencia foi incubado à 95°C em banho-maria seco.

Após ser retirado do banho-maria, o Swab foi removido do tubo cuidadosamente com o auxílio de uma pinça, e então a amostra foi levada novamente ao vórtex para agitação por 10 segundos.

Por último a solução foi neutralizada com 60 μL de Tris-HCl 1M (ph=8), agitada novamente no vórtex e então armazenada em temperatura -20°C .

4.2.3. Extração de DNA de pequenos volumes

O sangue foi coletado em tubo de 2mL contendo 300 μL de EDTA 0,5M, onde foi acrescentado 400 μL de iodeto de sódio 6M, a fim de promover a lise celular. Em seguida a amostra foi homogeneizada no vórtex por 20 segundos, e então foi colocado 600 μL de clorofórmio + álcool isoamílico (v/v, 24:1), agitou-se novamente e em seguida a amostra foi centrifugada a 12.000 rpm por 8 minutos em temperatura ambiente, ocorrendo a separação de fases.

A fase de cima foi aspirada com o auxílio de uma pipeta pasteur e transferida para outro tubo, onde foi acrescentado 400 μL de isopropanol gelado e incubado por 3 minutos a temperatura ambiente, para precipitar o DNA genômico. O tubo foi invertido por um minuto até que fosse formada uma nuvem na fase intermediária.

A amostra foi novamente centrifugada à 12.000 rpm por 10 minutos em temperatura ambiente, e seu sobrenadante foi então descartado. O sedimento foi lavado com 500 μL de isopropanol a 37% em temperatura ambiente tomando-se cuidado para não fragmentar o pellet.

O isopropanol 37% foi então descartado, e o sedimento permaneceu em temperatura ambiente *overnight* para completa secagem. Após a secagem o DNA foi ressuscendido em 100 μL de tampão TE (pH = 8), incubado por 10 minutos a 37°C e então armazenado a -20°C .

4.3. Triagem da mutação *c.35delG* no gene da conexina 26 (*GJB2*)

A mutação *c.35delG* no gene *GJB2* foi rastreada pela técnica de PCR alelo-específico (AS-PCR), utilizando ARMS primers (do inglês Amplification Refractory Mutations System) para a detecção de mutações de ponto (124). Esta técnica foi desenvolvida no Laboratório de Genética Molecular Humana do CBMEG, a qual se encontra patenteada (Patente N° P10005340-6; Método de teste para surdez de origem genética – UNICAMP, 2002).

4.4. Amplificação do gene *GJB2*

O éxon codificante do gene *GJB2*, com 681 pb, foi dividido para amplificação pela técnica de PCR, de acordo com as condições previamente descritas por Kelsell (53) Denoyelle (58) . As sequências dos *primers* e o tamanho dos fragmentos resultantes são mostrados na Tabela 1.

Tabela 1: Sequências dos *primers* utilizados para a amplificação do gene *GJB2* e tamanho dos fragmentos.

Par	Primer 5' – 3'	Tamanho (pb)
1	Cx1F – CTC CCT GTT CTG TCC TAG Cx1R – GAC ACG AAG ATC AGC TGC	284
2	Cx2F – GCT ACG ATC ACT ACT TCC C Cx2R – GGT TGC CTC ATC CCT C	520

Para um volume de 50 µL de reação, foram utilizados: 1 µL de DNA genômico, 5 µL de desoxinucleotídeo trifosfato (dATP, dCTP, dGTP e dTTP), 1 µL de cada cada primer (direto e inverso), 0,3 µL da enzima Taq DNA polimerase em tampão de PCR 10X (Tris-HCl 10mM pH 8,8), 1,5 µL de MgCl₂, completando com água até o volume final.

As amplificações foram realizadas em aparelho termociclador Veriti® 96-Well Thermal Cycler (Applied Biosystems), sendo realizados 30 ciclos de aquecimento a 94°C

para a desnaturação do DNA, seguido da temperatura de 60°C para o anelamento dos primers, e então de 72°C para a extensão das novas fitas (Figura 5).

Os produtos de amplificação foram visualizados em gel de agarose 1%, após coloração com brometo de etídio.

Os fragmentos do gene foram amplificados para posterior rastreamento de mutações por sequenciamento.

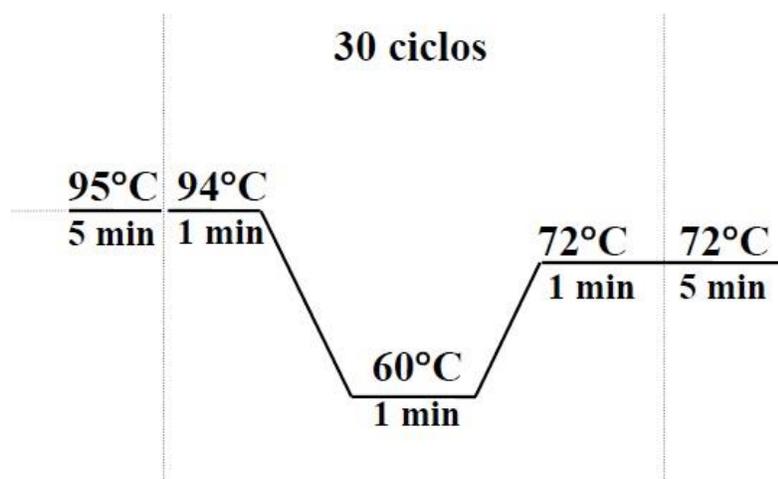


Figura 5: Ciclos utilizados para a amplificação do gene GJB2.

4.5. Rastreamento de mutações no gene *GJB2* por sequenciamento

As reações de sequenciamento foram realizadas no sequenciador automático ABI PRISM® 3700 DNA Analyzer utilizando-se o *BigDye™ Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit* (Applied Biosystem, EUA), de acordo com o protocolo recomendado pelo fabricante. Para o preparo das reações foram utilizados: 1 µL de DNA, 1 µL do *mix BigDye™*, 1 µL do *primer* direto ou reverso (5 pmol/µL) e água deionizada para completar o volume de 10 µL. As condições de amplificação estão especificadas na Figura 6.

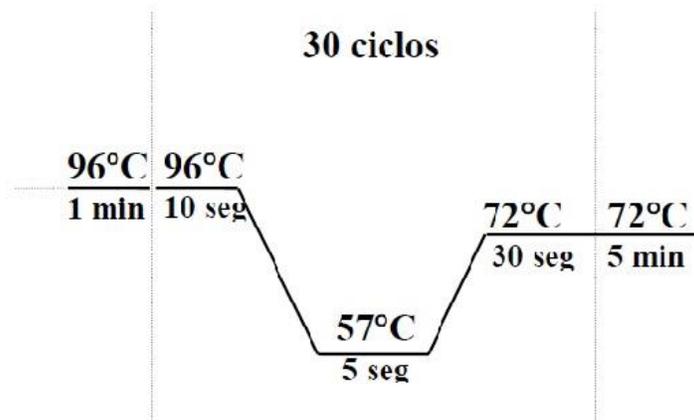


Figura 6: Ciclos de amplificação para posterior sequenciamento do gene GJB2.

Após a amplificação, as reações de sequenciamento foram purificadas. Primeiramente foram adicionados 2,5 µL de EDTA 125mM em cada pocinho e ressuspendeu-se as amostras em 25 µL de etanol 100% gelado em cada pocinho. A placa foi selada e incubada à temperatura ambiente por 15 minutos, em seguida a placa foi centrifugada a 4000rpm, 4°C, por 35 minutos. Após, a placa foi invertida sobre papel toalha e deu-se *spin* até 250rpm. Adicionou-se 30 µL de etanol 70% gelado em cada pocinho, a placa foi centrifugada a 4000rpm, 4°C, por 10 minutos. Após, a placa foi invertida sobre papel toalha e deu-se *spin* até 250rpm. Por último a placa secou por *overnight*.

As reações foram mantidas à -20 °C até o momento da colocação da placa no aparelho ABI PRISM® 3700 DNA Analyzer. Antes da colocação da placa no sequenciador, foram adicionados 10 µL de formamida e a placa foi homogeneizada e em seguida centrifugada rapidamente. A amostra foi desnaturada (5 min a 95 °C) e em seguida colocada no gelo por 10min.

4.6. Análise das sequências obtidas

As sequências obtidas foram analisadas e comparadas com as sequências normais dos genes, com o auxílio dos programas *Chromas Lite*®

(http://www.technelysium.com.au/chromas_lite.html) e *CLC Sequence Viewer* 6.1 (CLC bio A/S).

4.7. Genotipagem utilizando a Técnica de Espectrometria de Massa

Nesse estudo foi utilizado o ensaio *iPLEX® Gold Genotyping - MALDI-TOF /MS - MassArray-System* (Sequenom, Inc.).

O ensaio iPlex Gold é um método que combina as vantagens da técnica de PCR *Multiplex*, com extensão de uma única base, com a sensibilidade e precisão do sistema *MALDI-TOF/MS (Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-Of-Flight Mass Spectrometry)*. A tecnologia baseia-se em uma reação de extensão de base única para discriminação alélica e utiliza terminadores com massa modificada que não são fluorescentes. Os produtos amplificados são detectados pelo sistema MALDI-TOF que diferencia cada alelo pela sua massa. Esse método permite a genotipagem de até 40 SNPs simultaneamente e quantidades de ensaios que podem variar de 96 a 384 amostras, oferecendo um alto nível de flexibilidade e baixo custo por genótipo.

O sistema é composto por um robô (MassArray® Liquid Handler Station), utilizado no preparo das reações de PCR; por um dispensador de amostras (MassArray® Nanodispenser), utilizado na transferência dos produtos das reações de PCR para SpectroChips, que são avaliados no espectrômetro de massa; e por um espectrômetro de massa (MassArray® Compact System), utilizado na medida das massas das moléculas associadas à matriz do SpectroChip (Figura 7). O sistema é acompanhado de um pacote de softwares que realizam a transferência dos dados em tempo real e geram relatórios com as informações de cada SNP para as amostras analisadas (MassArray® Typer 3.4) .



Figura 7: Equipamentos utilizados no Sistema MassArray.

Nesse estudo, a técnica de espectrometria de massa foi utilizada para rastreamento de mutações nos principais genes, nucleares e mitocondriais, envolvidos na perda auditiva.

4.7.1. Definição dos ensaios

A escolha dos genes a serem estudados foi baseada na tabela dos mais importantes genes envolvidos na perda auditiva, selecionados com base na frequência das mutações reportadas (19). Ao todo, 6 genes e 59 mutações foram selecionados para este estudo. As mutações, seus respectivos genes e referências estão descritos na Tabela 2.

Tabela 2: Padrão de herança, as mutações selecionadas para o estudo, e seus respectivos genes e referências.

Herança	Gene	Alteração	Mudança na proteína	Referência
Autos. Recessiva	GJB2	<i>c.283G>A</i>	<i>p.V95M</i>	Kelley et al., 1998
		<i>c.339T>G</i>	<i>p.S113R</i>	Kelley et al., 1998
		<i>c.279G>A</i>	<i>p.M93I</i>	Wu et al., 2002
		<i>c.286G>A</i>	<i>p.W24X</i>	Kelsell et al., 1997
		<i>c.439G>A</i>	<i>p.E147K</i>	Murgia, et al., 1999
		<i>c.617A>G</i>	<i>p.N206S</i>	Kenna et al., 2001
		<i>c.385G>A</i>	<i>p.E129K</i>	Kenna et al., 2001
		<i>c.109G>A</i>	<i>p.V37I</i>	Kelley et al., 1998
		<i>c.269T>C</i>	<i>p.L90P</i>	Murgia, et al., 1999
		<i>c.550C>G</i>	<i>p.R184W</i>	Wilcox et al., 2000
		<i>c.551G>C</i>	<i>p.R184P</i>	Denoyelle et al., 1997
		<i>c.516G>A</i>	<i>p.W172X</i>	Posukh et al., 2005
		<i>c.224G>A</i>	<i>p.R75Q</i>	Uyguner et al., 2002
		<i>c.101T>C</i>	<i>p.M34T</i>	Feldmann et al., 2003
		<i>c.457G>A</i>	<i>p.V153I</i>	Marlin et al., 2001
		<i>c.503A>G</i>	<i>p.K168R</i>	Samanich et al., 2007
		<i>c.35delG</i>	<i>G12Vfs</i>	Zelante et al., 1997
		<i>c.167delT</i>	<i>p.L56Rfs</i>	Zelante et al., 1997
		<i>c.235delC</i>	<i>p.L79Cfs</i>	Fuse et al., 1999
		<i>c.139G>T</i>	<i>p_E47X</i>	Denoyelle et al., 1997
	<i>IVS1+1G>A</i>	<i>Splicing defect</i>	Green et al., 1999	
	<i>279delT</i>	<i>p.Ser93ArgfsX3</i>	Palos et al., 2008	
	<i>c.412G>T</i>	<i>p.V138F</i>	Van Hauwe et al., 1998	
	<i>c.425C>T</i>	<i>p.P142L</i>	Park et al., 2005	
	<i>c.446G>A</i>	<i>p.G149R</i>	Park et al., 2005	
	<i>c.578C>T</i>	<i>p.T193I</i>	Adato et al., 2000	
	<i>c.1226G>A</i>	<i>p.R409H</i>	Van Hauwe et al., 1998	
	<i>c.1229C>T</i>	<i>p.T410M</i>	Coyle et al., 1998	
	<i>c.1238A>G</i>	<i>p.Q413R</i>	Pryor et al., 2005	
	<i>c.1334T>G</i>	<i>p.L445W</i>	Van Hauwe et al., 1998	
	<i>c.1707+5 G>A</i>	<i>p.IVS15+5G>A</i>	Park et al., 2005	
	<i>c.1826T>G</i>	<i>p.V609G</i>	Pryor et al., 2005	
	<i>c.2326C>T</i>	<i>p.R776C</i>	Pryor et al., 2005	
	<i>c.IVS8+1G-A</i>	<i>Splicing defect</i>	Chen et al., 2007	
	<i>c.845G>A</i>	<i>p.C282Y</i>	Chen et al., 2007	
	<i>c.10573delA</i>	<i>p.Ser3525fs</i>	Lezirovitz et al., 2008	
	<i>c.9957_9960delTGAC</i>	<i>p.Asp3320fs</i>	Lezirovitz et al., 2008	
	<i>c.3313G>T</i>	<i>p.E1105X</i>	Nal et al., 2007	
	<i>c.3334delG</i>	<i>p.G1112fsX1124</i>	Nal et al., 2007	
	<i>c.6796G>A</i>	<i>p.V2266M</i>	Nal et al., 2007	
	<i>c.2485C>T</i>	<i>p.Q829X</i>	Migliosi et al., 2002	
	OTOF	<i>c.29052923del19ins11</i>	<i>p.A969fs</i>	Rodríguez-Ballesteros et al., 2008

		<i>c.1552-1567del16</i>	<i>p.R518fs</i>	Romanos et al., 2009
		<i>c.3400C>T</i>	<i>p.R1134X</i>	Rodríguez-Ballesteros et al., 2008
		<i>c.4960G>A</i>	<i>p.G1654S</i>	Romanos et al., 2009
		<i>c.2348delG</i>	<i>p.G783fs</i>	Varga et al., 2003
Autos. Recessiva	OTOF	<i>c.5800-5801insC</i>	<i>p.L1934fs</i>	Rodríguez-Ballesteros et al., 2008
		<i>1841G>A</i>	<i>p.G614E</i>	Romanos et al., 2009
		<i>c.3239G>C</i>	<i>p.R1080P</i>	Romanos et al., 2009
		<i>c.5431A>T</i>	<i>p.K1811X</i>	Romanos et al., 2009
		<i>c.5785A>C</i>	<i>p.N1929H</i>	Romanos et al., 2009
		<i>c.4491T>A</i>	<i>p.Y1497X</i>	Yasunaga et al., 1999
		<i>c.4227_1G>T</i>	<i>Splicing defect</i>	Rodríguez-Ballesteros et al., 2008
		<i>c.3413T>C</i>	<i>p.L1138P</i>	Rodríguez-Ballesteros et al., 2008
		<i>c.1601delC</i>		Rodríguez-Ballesteros et al., 2008
		<i>c.2122C>T</i>	<i>p.R708X</i>	Rodríguez-Ballesteros et al., 2003
Mitocondrial	MT-TSI	<i>m.7445A>G</i>	NA	Hyslop et al., 1997
	MT-RNR1	<i>m.1555A>G</i>	NA	Fischel-Ghodsian et al., 1993
		<i>m.1494C>T</i>	NA	Prezant et al, 1993

Autos. Recessiva – Autossômica Recessiva

As mutações no gene *GJB2* foram selecionadas com base nos arquivos (1999 a 2013) de mais de 2500 indivíduos com perda auditiva, encaminhados ao Laboratório de Genética Humana do Centro de Biologia Molecular e Engenharia Genética, Unicamp.

Para os demais genes, as mutações foram selecionadas com base na frequência em que eram reportadas na literatura, e apenas foram incluídas mutações que tivessem sido encontradas em duas ou mais famílias, sendo, portanto, consideradas eventos mutacionais independentes. Em relação aos genes *OTOF*, *SLC26A4* e *MYO15A*, todas as mutações que foram identificadas na população brasileira foram incluídas (125, 126, 93).

4.7.2. Desenho dos ensaios

Oligonucleotídeos de captura dos *SNPs* e/ou mutações (*primers* de amplificação) e oligonucleotídeos de extensão de bases únicas foram desenhados a partir das sequências

selecionadas. O desenho dos ensaios foi realizado com o auxílio do software *MassArray@Assay Design* (versão 4.0, Sequenom Inc., San Diego - USA). Após inserção do ID (identificador) dos *SNPs* no programa, são geradas as sequências de *primers* referentes a cada *SNP* assim como também os grupos de *SNPs* (*multiplex*) a serem avaliados em conjunto. Como se trata de uma plataforma de alta escala, existe a possibilidade de avaliar até 40 *SNPs* simultaneamente em uma única reação para uma dada amostra.

Neste estudo as 60 mutações/*SNPs* selecionados foram divididas em 6 grupos ou “wells” pelo software *MassArray@Assay Design*, lembrando que se trata de um estudo que permite análises *multiplex* por isso a divisão em “wells”. O primeiro grupo ficou com 14 ensaios o grupo 2 com 12 ensaios, o terceiro grupo ficou com 12, o quarto ficou com 10, o quinto com 7 e o sexto com 5 ensaios.

4.7.3. Análise qualitativa das amostras

A pureza das amostras de DNA foram determinadas por densidade óptica em espectrofotômetro NanoDrop® ND-8000 (Thermo Scientific), através da razão de absorbância 260/280nm, sendo valores entre 1.8 e 2.0 referências para DNA “puro”.

4.8. Reações

Todo o processo da técnica iPLEX® Gold Genotyping pode ser analisada na Figura 8.

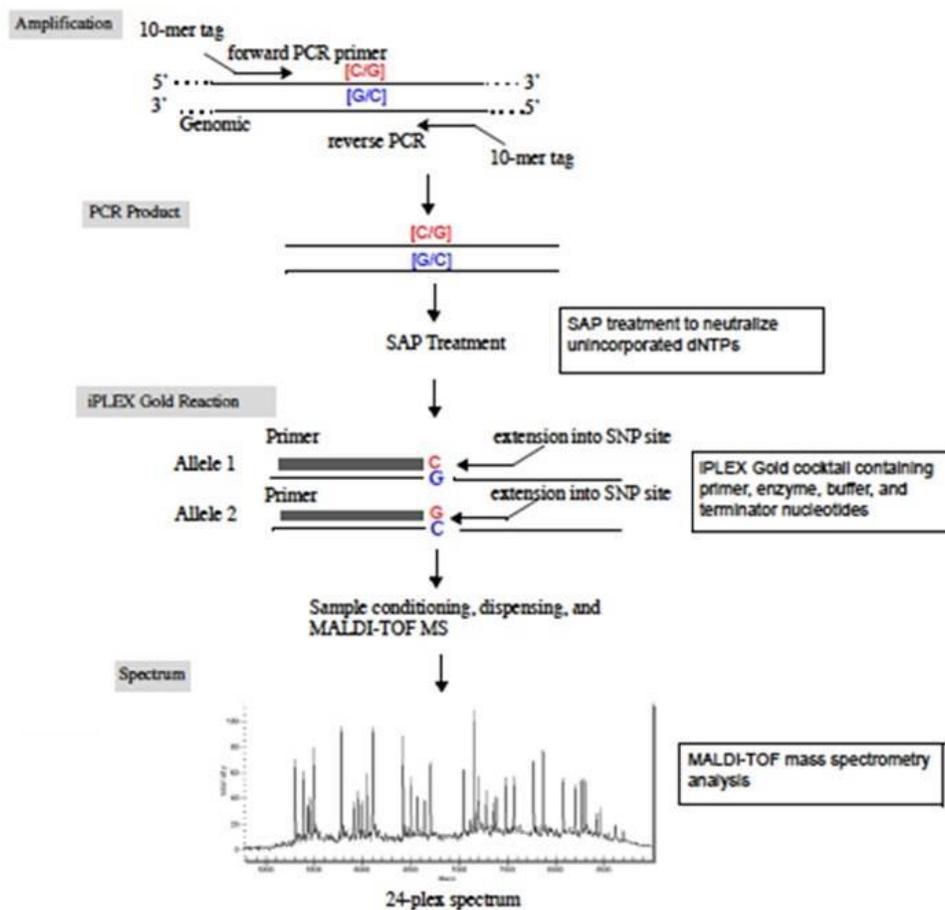


Figura 8: Etapas da técnica de espectrometria de massa iPLEX® Gold Genotyping.

4.8.1. iPLEX® Gold Genotyping

A técnica iPLEX Mass Array baseia-se na extensão do *primer* e oferece dois níveis de especificidade. Primeiramente uma reação de PCR locus específica é realizada, seguido por uma reação locus específica de extensão do *primer* em que um oligonucleotídeo iniciador anela imediatamente *upstream* ao sítio polimórfico a ser genotipado. No ensaio de iPLEX, o *primer* e o DNA alvo amplificado são incubados com terminadores dideoxinucleotídeos de massa modificada. A extensão do *primer* é feita de acordo com a sequência do sítio variante, por uma única base complementar de massa modificada. Através da utilização da técnica de MALDI-TOF de espectrometria de massa, a massa da

extensão do *primer* é determinada. A massa do *primer* indica a sequência e, por conseguinte, os alelos presentes no sítio polimórfico de interesse. O software fornecido pela Sequenom® traduz automaticamente a massa dos *primers* observados para um genótipo em cada reação (127).

4.8.2. PCR Captura: Amplificação de fragmentos contendo os SNPs/Mutações

Uma vez definidos os conjuntos de *SNPs* ou mutações a serem analisados, os *primers* de captura foram empregados na amplificação de produtos de aproximadamente 100pb, englobando a região que apresenta o sítio polimórfico. Nesta etapa os fragmentos contendo os *SNPs* são capturados seguindo protocolo descrito pela Sequenom (*iPLEX Gold Application Guide*).

Para um volume final de 5µL de reação foram utilizados: 10 ng de DNA genômico, 500 µM de desoxinucleotídeo trifosfato (dATP, dCTP, dGTP e dTTP), 100 nM de *primer* (direto e reverso), 2 mM de MgCl₂ e 1 U *HotStar Taq* DNA polimerase e tampão iPlex completando com água até o volume final. As amplificações foram realizadas em aparelho termociclador Veriti® 386-Well Thermal Cycler (Applied Biosystems). As condições da PCR estão resumidas na Figura 9.

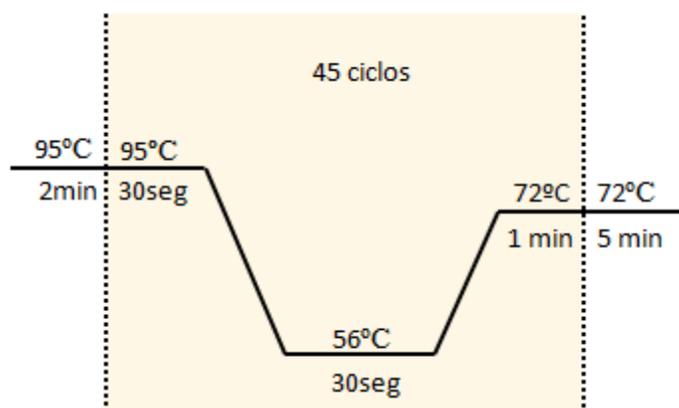


Figura 9: Ciclos de amplificação do PCR captura do método *iPLEX Gold* – Sequenom.

4.8.3. Tratamento com SAP.

Após a reação de PCR, os produtos de amplificação passaram por um tratamento para neutralização dos dNTPs não incorporados, utilizando a enzima *shrimp alkaline phosphatase* (SAP). A SAP corta os fosfatos dos dNTPs não incorporados durante a reação de amplificação, tornando-os inviáveis para futuras reações.

Para um volume final de 2 μL da reação SAP, foram utilizados: 1,53 μL de água, 0,17 μL de tampão SAP (10x), 0,30 μL de enzima SAP (1,7 U/ μL). Adicionou-se a cada amostra 2 μL da reação de SAP, a placa foi incubada a 37°C durante 40 minutos e a 85° C por 5 minutos para ação da enzima.

4.8.4. PCR de extensão – iPLEX Gold

Após os produtos de amplificação terem sido tratados, foi adicionados 2 μL do mix de extensão (*iPLEX Gold reaction*). Durante a reação, o *primer* se anela imediatamente *upstream* ao sítio polimórfico a ser genotipado. Na reação *iPLEX Gold Extend* os nucleotídeos utilizados apresentam massas modificadas (*dideoxynucleotídeos-iPLEX Terminator Mix*), levando a extensão de apenas uma base (SEB - *single extended base process*). A Reação *iPLEX Gold* gera produtos estendidos alelo-específicos de massas diferentes, dependendo do nucleotídeo que foi adicionado, ou seja, dependendo da forma alélica presente naquela amostra.

Mix de Extensão: para um volume final de 2 μL foram utilizados: 0,619 μL de água, 0,2 μL de tampão (*iPLEX Buffer Plus 10x*), 0,2 μL de *iPLEX Terminator Mix*, 0,94 μL de mix dos *primers* de extensão e 0,041 μL de enzima (*iPLEX enzyme*). As amplificações foram realizadas em aparelho termociclador Veriti® 386-Well Thermal Cycler (Applied Biosystems). As condições da PCR estão resumidas na Figura 10.

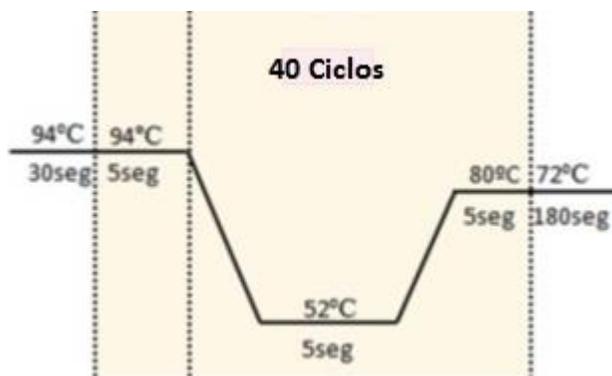


Figura 10: Ciclos de amplificação do PCR extensão do método *iPLEX Gold* - Sequenom.

4.8.5. Purificação dos produtos de PCR e Reação de espectrometria de massa

Antes da reação de espectrometria de massa, os produtos das reações de *iPLEX* foram submetidos a uma purificação com uma resina (*Clean Resin*) que removeu o excesso de íons, que poderiam interferir na leitura do laser. Foram adicionados 6mg de resina a cada poço da placa de 384 e a seguir foram acrescentados 16 μ L de água para completar um volume final de 25 μ L em cada amostra.

Após homogeneização e centrifugação as reações foram transferidas das placas de 384 para um SpectroCHIP, com o auxílio do *MassArray Nanodispenser* (Sequenom Inc., San Diego – USA). O SpectroCHIP foi analisado a partir do *MassArray Analyzer Compact* (Sequenom Inc., San Diego – USA), através da técnica de *MALDI-TOF MS* (*Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry*).

O processo *MALDI-TOF* é iniciado por uma desorção a laser da mistura analito-matrix (128), sendo o analito o produto de amplificação gerado e selecionado durante a reação *iPLEX*. Os subsequentes processos físicos resultam na predominante formação de íons carregados positivamente ou de íons carregados negativamente. Esses íons são extraídos com um campo elétrico e separados em função de suas massas moleculares e de suas cargas. As massas dos compostos de ácidos nucleicos são calculadas através do “tempo de voo” (TOF), que reflete o tempo que o composto laser-ionizado e acelerado

requer para ser levado através do tubo de voo (1-2m de comprimento) do analisador TOF e alcançar o detector do instrumento. No detector, os compostos ionizados geram um sinal elétrico que fica gravado por um sistema de dados e é finalmente convertido em um espectro de massa (128).

O software *MassArray TyperAnalyzer 3.4* acumula as informações geradas durante o processo descrito acima e fornece relatórios que descrevem todos os resultados das análises de cada uma das amostras avaliadas: genótipos e frequências são as principais informações resultantes deste sistema. Os componentes básicos de um espectrômetro de massa consistem de uma fonte de ionização (*laser UV*), um analisador e um detector. O tempo total de processamento de uma placa contendo 384 amostras pode ser de 2 a 3 dias. O processo pode ser interrompido nas etapas pós-PCR, pós-SAP ou pós-Extend.

4.9. Confirmação por Sequenciamento das mutações detectadas pelo Sequenom®.

4.9.1. Amplificação do éxon 66 do gene da *MYO15A*

O gene *MYO15A* possui 66 éxons, foi amplificado apenas o éxon 66, onde se encontra a mutação *c.10573delA* detectada pelo Sequenom®. A região foi amplificada segundo as condições já descritas no item 4.4. As temperaturas utilizadas para o ciclo da PCR estão descritas na Figura 11.

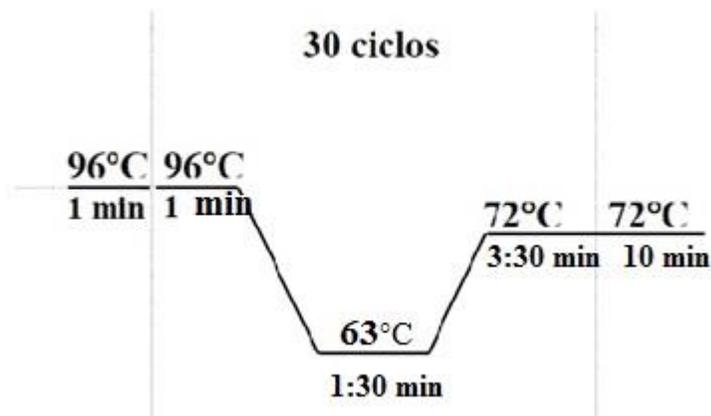


Figura 11: Ciclos de amplificação para posterior sequenciamento do éxon 66 gene *MYO15A*.

As sequências dos *primers* e o tamanho dos fragmentos resultantes é mostrado na Tabela 3.

Tabela 3: Sequências dos *primers* utilizados para a amplificação do éxon 66 gene *MYO15A* e tamanho do fragmento.

<i>Primer 5' – 3'</i>	Tamanho (pb)
Cx1F – GAC TTC CCA TAT GAT TCC TGC	394
Cx1R – CCA GAG AGG ACA AAA TCA CAC	

4.9.2. Amplificação do éxon 15 do gene *OTOF*.

O gene *OTOF* possui 48 éxons, foi amplificado somente o éxon 15, onde se encontra a mutação *c.1552-1567del16* detectada pelo Sequenom®. A região foi amplificada segundo as condições já descritas no item 4.4. As temperaturas utilizadas para o ciclo da PCR estão descritas na Figura 12.

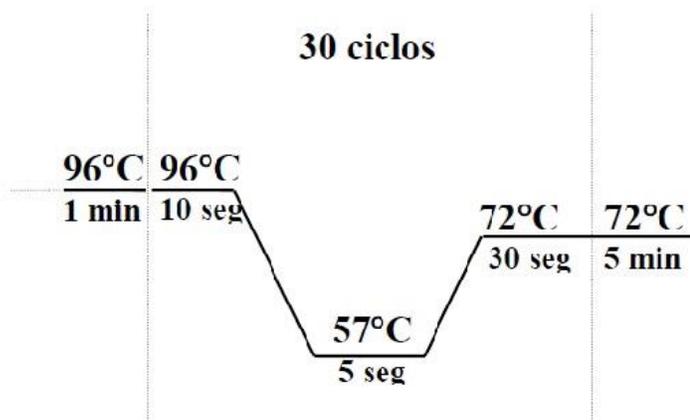


Figura 12: Ciclos de amplificação para sequenciamento do éxon 15 do gene *OTOF*.

As seqüências dos *primers* e o tamanho do fragmento resultante são mostrados na Tabela 4.

Tabela 4: Sequências dos *primers* utilizados para a amplificação do éxon 15 gene *OTOF* e tamanho dos fragmentos.

<i>Primer 5' – 3'</i>	Tamanho (pb)
Cx1F – TGC CAC GCC CTC ACC TGT	303
Cx1R – TGA AGA GAG GGC ATC TCA CA	

4.9.3. Sequenciamento do éxon X da MYO15A e do éxon Y do gene *OTOF*.

O sequenciamento para os dois casos foram realizados de acordo com a descrição já descrita anteriormente nos itens 4.5 e 4.6.

4.10. Estudo *In Silico*

4.10.1. Polyphen-2

A ferramenta Polyphen-2 (Fenotipagem de Polimorfismo) (129) é uma ferramenta baseada na homologia de estruturas utilizadas para a previsão do impacto funcional e estrutural de substituições de resíduos de aminoácidos nas proteínas. As previsões feitas por Polyphen-2 são realizadas por meio de três fontes de dados: as sequências obtidas na base de dados SwissProt (<http://expasy.org/sprot/>), alinhamento de sequências múltiplas usando o software BLAST e informações estruturais (130).

O primeiro passo do Polyphen-2 é o alinhamento múltiplo de sequências homólogas utilizando a ferramenta BLAST. Em seguida, o resultado do alinhamento múltiplo é usado pelo software de PSIC (Contagens independente da posição específica) para calcular uma matriz de "configurações de perfil". Polyphen-2 calcula o valor absoluto da diferença entre os valores de "perfis" dos resíduos de aminoácidos na posição variante de interesse. Valores elevados desta diferença pode indicar que a mutação estudada raramente é observada na família de proteínas (131).

Utilizando a informação descrita na base de dados Swall e SwissProt, a posição do resíduo de aminoácido variante é mapeado na estrutura de proteína correspondente a sequência primária, com o objetivo de avaliar se a substituição de aminoácidos pode afetar o núcleo hidrófobo da proteína, interação com agentes de ligação ou outras características importantes da proteína (130). Mutações que apresentam um valor inferior a 0,5 são considerados mutações toleráveis e as que apresentam um valor superior a 0,5 são considerados altamente prejudicial. A precisão da previsão do programa é de 80% (130), com a proporção de "falso negativo" e "falso positivo", 31% e 9%, respectivamente (132).

4.10.2. SIFT

A ferramenta computacional “*SIFT*” (Sorting intolerante a partir tolerante), é responsável por determinar o efeito funcional causada por substituições de resíduos de aminoácidos de proteínas. O algoritmo usado é baseado na premissa de que a evolução de proteína está correlacionada com a sua função. Por isso, o alinhamento de uma família de proteínas deve mostrar a conservação de resíduos de aminoácidos localizados em posições-chave para a função da proteína (133).

Através do site da ferramenta (134), se analisou as mutações de resíduos de aminoácidos que foram avaliadas pelo algoritmo de predição. Inicialmente a sequência da proteína é analisada pela ferramenta PSI-BLAST (*Position-Specific Iterated BLAST*), para obter as sequências de proteínas similares. Em seguida, o algoritmo usa as sequências resultantes desta pesquisa com valores obtidos acima do limite de 90%, para criar, assim, uma matriz de valores de "posições específicas" (matriz de pontuação posição específica, PSSM). A matriz prevê regiões conservadas de valores altos e baixos para regiões pouco conservadas dentro do conjunto de sequências estudadas.

Usando a matriz de valores gerada, o algoritmo calcula a probabilidade para todas as substituições possíveis de resíduos de aminoácido em cada posição de alinhamento. As substituições que apresentam um valor menor que 0,05 são consideradas prejudiciais, enquanto que aqueles com valores superiores a 0,05 não são considerados como prejudiciais (133,132). A acurácia preditiva do método SIFT é de 78% (133), onde os valores de "falso-negativos" e "falso-positivos" são 31% e 20%, respectivamente (132).

4.10.3. Aling GVG

A ferramenta Aling GVG (135), calcula a variação de Grantham (GV), que mede o grau de alterações bioquímicas entre os aminoácidos encontrados na posição dada pelo alinhamento de sequências múltiplas, e o Desvio Grantham (GD), que analisa a "distância bioquímica do aminoácido alterado a partir do aminoácido observado numa posição particular (dada por GV)".

O método combina os pontos de GV-GD para prever a atividade de cada mutação não sinônima (136,137). Atualmente existe uma nova classificação indo da mais deletéria "C65" para o menos prejudicial "C0", em escala que pode ser observada na Figura 13 (136). A ferramenta Aling GVG tem uma percentagem de especificidade e sensibilidade de 88,3 e 90,6%, respectivamente (137).

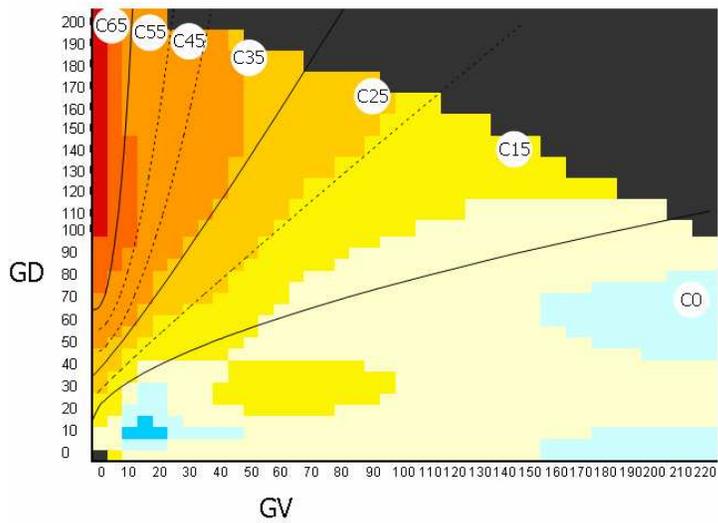


Figura 13: Relação das classes indo da C65 mais deletéria até C0 menos deletéria.

RESULTADO

5. Resultados

5.1. Resultados comparativos dos diferentes tipos de coletas e amostras de DNA.

Em 200 recém-nascidos foram coletadas três tipos de amostra, sendo elas: Saliva, Sangue em papel FTA e Sangue em EDTA.

5.1.1. Amostra de Saliva

A média da concentração foi de 11,5 ng/μL e o volume final da amostra foi de aproximadamente 660 μL. Para uma ótima pureza, os valores da razão A260/280 devem estar entre 1,8 e 2,0. Após a leitura e o cálculo da média dos valores, notou-se que nesse tipo de amostra a média da pureza foi de 1,7.

5.1.2. Amostras em papel FTA.

A concentração variou entre 35 a 90 ng/ μL em volume final de 300 μL. As amostras apresentaram valor médio de pureza de 1,8. Nesse método, quando é necessário repetir a reação, nova extração de DNA deve ser realizada.

5.1.3. Amostra de sangue em EDTA.

Também nesse tipo de coleta, após extração, a concentração e a pureza de todas as amostras de DNA foram determinadas. Nesse método a concentração média de DNA foi de 40 ng/μL em um volume final de 100μL. A pureza observada foi de 1,8.

Os resultados comparativos são mostrados na Tabela 5.

Tabela 5: Análises dos diferentes tipos de coleta.

	Saliva	Sangue em papel	Sangue em EDTA
Volume obtido	660 μL	300 μL	100 μL
Média das concentrações do DNA (ng/μL)	11,5	60	40
Pureza do DNA	1,7	1,8	1,8

5.2. Resultado do rastreamento da mutação *c.35delG* utilizando 3 diferentes tipos de amostra de DNA

Para analisar o comportamento das amostras de DNA obtidas de diferentes tipos de amostra frente à técnica de AS-PCR *c.35delG*, amostras de saliva, sangue em EDTA e sangue em papel de 200 recém-nascidos foram testados. Os resultados podem ser observados na Tabela 6.

Tabela 6: Resultado do rastreamento por AS-PCR da mutação *c.35delG* utilizando 3 diferentes tipos de amostra de DNA em 200 pacientes.

Resultados	Saliva	EDTA	Papel
Normais	170	187	197
Heterozigotos	2	2	2
Falharam	28	11	1
Total de amostras analisadas	200	200	200

5.3. Rastreamento da mutação *c.35delG* no gene *GJB2* por AS-PCR .

Para determinação da frequência da mutação *c.35delG* em recém-nascidos, além das 200 primeiras amostras também foram analisadas as outras 1.043 amostras de sangue em papel. Para este estudo utilizou-se a técnica de AS-PCR (PCR- Alelo Específico) que permite distinguir pacientes heterozigotos, homozigotos mutantes e homozigotos normais, de acordo com os padrões de bandas obtidos, conforme pode ser observado na Figura 14.

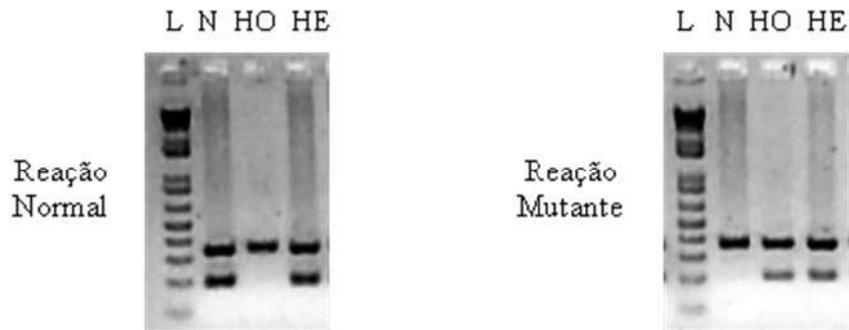


Figura 14: Gel de agarose mostrando os fragmentos gerados pela técnica de PCR alelo-específico para a análise da mutação *c.35delG*. L= Marcador de peso molecular 1Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen); N= Controle homozigoto normal (N/N); HO= Controle homozigoto mutante (*35delG/35delG*); HE= Controle heterozigoto mutante (*35delG/N*).

Dessa forma, foram identificados 11 indivíduos heterozigotos para a mutação *c.35delG* e em 1.232 essa mutação não foi detectada. Os resultados positivos detectados por esta técnica foram subsequentemente confirmados por sequenciamento de Sanger.

5.4. Sequenciamento do gene *GJB2*

A região codificante do gene *GJB2* (éxon 2) foi sequenciada em todas as 11 amostras positivas para a mutação *c.35delG*. A técnica de sequenciamento direto confirmou os resultados obtidos no AS-PCR (Figura 15) e ainda permitiu a identificação da alteração G>A na posição 79 do gene em um desses pacientes heterozigotos *c.35delG*.

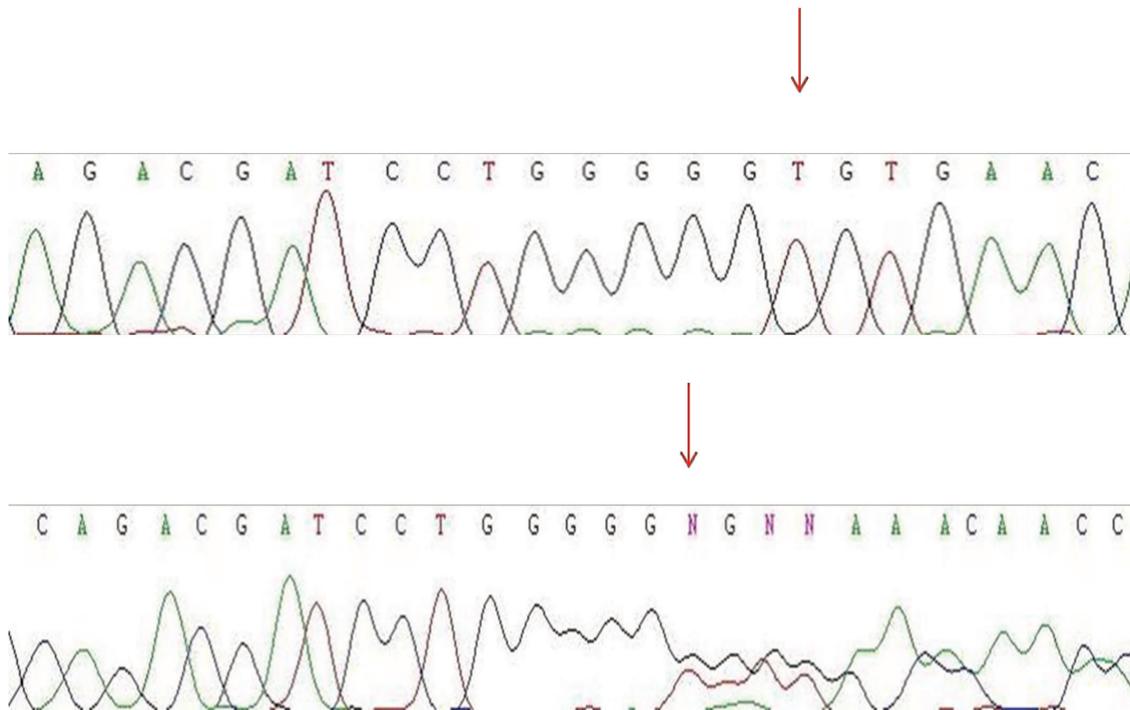


Figura 15: Eletroferograma mostrando em destaque a presença da mutação c.35delG em heterozigose.

A substituição da base G pela base A na posição 79 (c.79G>A) leva à troca do aminoácido valina por isoleucina no códon 27 (*p.V27I*), situado no primeiro domínio transmembrânico da conexina 26. Essa variação foi previamente descrita por Kelley e colaboradores em 1998 (68), e é considerada polimorfismo. A Figura 16 mostra o eletroferograma do recém-nascido heterozigoto para essa alteração.

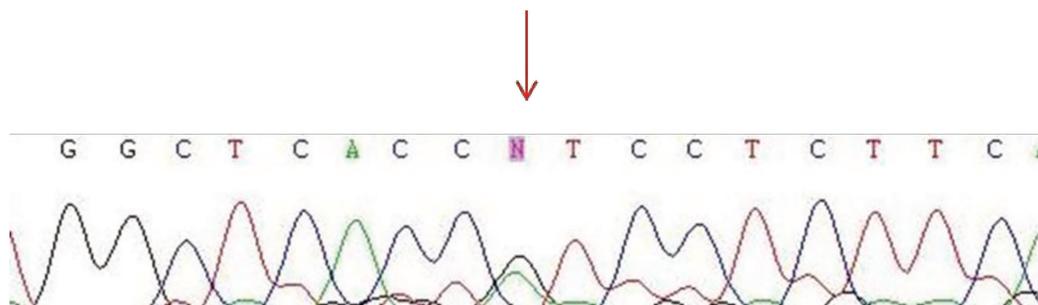


Figura 16: Eletroferograma mostrando em destaque a alteração G>A na posição 79 em heterozigose.

Os resultados obtidos para a *c.35delG* foram concordantes em ambas as técnicas utilizadas, como mostrado na Tabela 7. E a mutação *p.V27I* rastreada por sequenciamento direto.

Tabela 7: Comparação resultados dos 11 indivíduos portadores da *c.35delG* em heterozigose entre as técnicas de AS-PCR e Sequenciamento.

Número de indivíduos	AS-PCR35delg	Sequenciamento
10	Heterozigoto	<i>c.35delG/N</i>
1	Heterozigoto	<i>c.35delG/p.V27I</i>

Os resultados demonstraram que a frequência de indivíduos heterozigotos para a mutação *c.35delG* no grupo analisado foi de 1:113. E frequência alélica de 0,0044%.

5.5. Espectrometria de Massa Sequenom®.

Para avaliar o comportamento da técnica de espectrometria de massa frente aos diferentes tipos de amostra (papel, saliva e sangue), amostras de recém-nascidos incluídos na casuística, amostras normais para a mutação *c.35delG*, e controles heterozigotos para mutações presentes no estudo foram testados. Esses controles foram selecionados do banco de dados do Laboratório de Genética Humana do CBMEG/UNICAMP. Observou-se que a genotipagem utilizando o espectrômetro de massa Sequenom® foi eficiente para todos os tipos de amostras (papel, saliva e sangue), pois em todos os tipos de amostra foi possível se analisar os resultados. Na Figura 17 estão representados os resultados comparativos da genotipagem da mutação *p.P142L (c.425C>T)*.

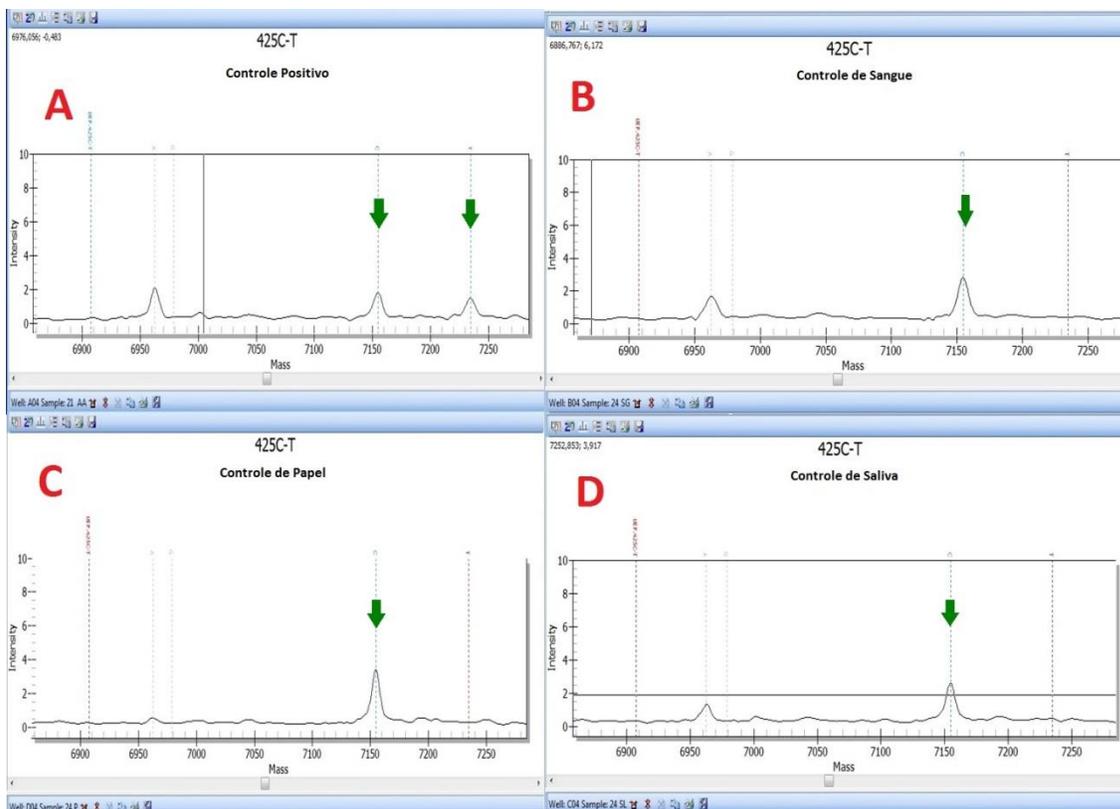


Figura 17: Gráficos mostrando a detecção de alelos pela espectrometria de massa. A Figura “A” representa um paciente controle heterozigoto para a mutação *p.P142L*, onde os alelos C e T estão representados por picos na região colorida pontilhada, indicados pela seta. As figuras ”B, C e D” são amostras de sangue, papel e saliva, respectivamente, e representam gráficos de pacientes normais para esta mutação, onde apenas o alelo C (normal) é detectado.

5.5.1. Análise das Amostras selecionadas para o Sequenom®

Após os testes com os controles e os três tipos de amostra, realizou-se a genotipagem de 77 amostras incluídas no presente estudo. Desses, 11 apresentaram *c.35delG* em heterozigose pelo AS-PCR e sequenciamento e 24 eram normais. Foram incluídos ainda, 42 indivíduos que clinicamente apresentavam algum indicador de risco para perda auditiva, como falha pelo menos uma vez no teste da orelhinha e histórico familiar, o fluxograma pode ser analisado na Figura 18.

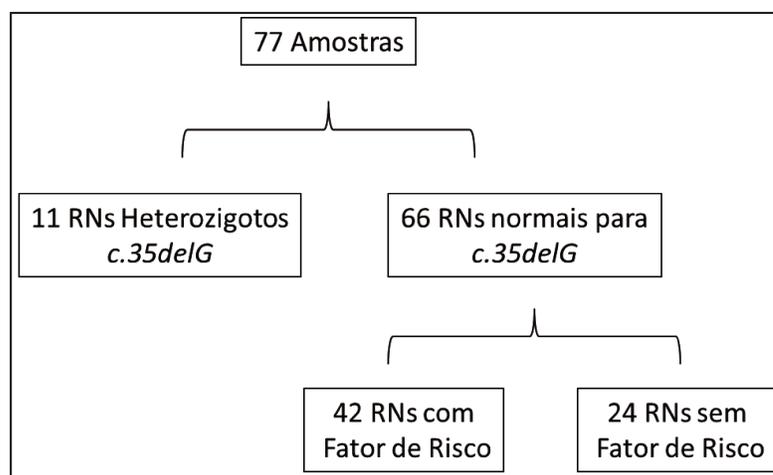


Figura 18: Fluxograma das amostras utilizadas na técnica de Espectrometria de Massa.

Simultaneamente, amostras controles positivos para 18 mutações já identificadas foram utilizadas para confirmação da eficácia dessa técnica na detecção de tais mutações. As mutações testadas e os resultados obtidos pelo Sequenom® podem ser observados na Tabela 8.

Tabela 8: Mutações utilizadas como controles positivos.

GENE	Mutação detectada por Sequenciamento direto	Sequenom®
<i>SLC26A4</i>	<i>p.Ser93argfxX3</i>	<i>p.Ser93argfxX3</i>
<i>SLC26A4</i>	<i>p.P142L</i>	<i>p.P142L</i>
<i>SLC26A4</i>	<i>IVS8+1G>A</i>	<i>IVS8+1G>A</i>
<i>SLC26A4</i>	<i>p.R409H</i>	<i>p.R409H</i>
<i>GJB2</i>	<i>M34T</i>	<i>M34T</i>
<i>GJB2</i>	<i>p.R184W</i>	<i>p.R184W</i>
<i>GJB2</i>	<i>p.V85M</i>	<i>p.V85M</i>
<i>GJB2</i>	<i>p.V37I</i>	Não detectada
<i>MT-RNR1</i>	<i>A1555G</i>	<i>A1555G</i>
<i>SLC26A4</i>	<i>p.T410M</i>	<i>p.T410M</i>
<i>SLC26A4</i>	<i>p.IVS15+5G>A</i>	<i>p.IVS15+5G>A</i>
<i>GJB2</i>	<i>p.W24X</i>	<i>p.W24X</i>
<i>GJB2</i>	<i>G12Vf2</i>	<i>G12Vf2</i>
<i>SLC26A4</i>	<i>p.T193I</i>	<i>p.T193I</i>
<i>GJB2</i>	<i>p.L56Rfs</i>	<i>p.L56Rfs</i>
<i>GJB2</i>	<i>p.E47X</i>	<i>p.E47X</i>
<i>GJB2</i>	<i>p.V153I</i>	<i>p.V153I</i>

Os resultados obtidos pela técnica de espectrometria de massa Sequenom® foram concordantes em 94,1% (16/17) das amostras controles. Nessa técnica apenas a reação para a mutação *p.V37I* não foi detectada.

5.5.1.1. Mutações Rastreadas pelo Sequenom®

Alteração *c.35delG* (Gene *GJB2*)

Identificada em heterozigose nos 11 recém-nascidos previamente rastreados por AS-PCR e seu sequenciamento. A Figura 19 compara o resultado de um paciente mutante em heterozigose e um paciente normal para *c.35delG*.

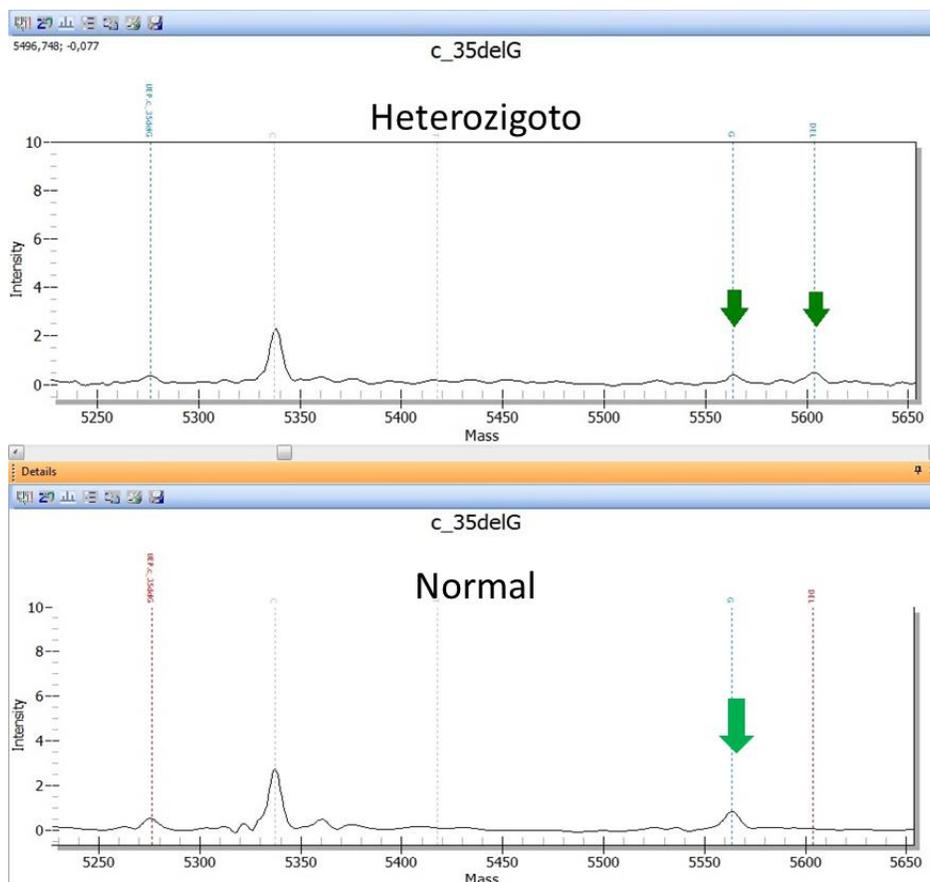


Figura 19: Gráfico mostrando a detecção de alelos pela espectrometria de massa da mutação *c.35delG*, os alelos estão representados por picos na região colorida pontilhada, indicados pela seta e mostram a base G e a deleção.

Alteração *c.10573delA* (Gene *MYO15A*)

O Sequenom® identificou a mutação *c.10573delA* em heterozigose em um indivíduo com indicador de risco (falha no teste da orelhinha). A Figura 20 compara o resultado de um paciente mutante em heterozigose e um paciente normal para *c.10573delA*.

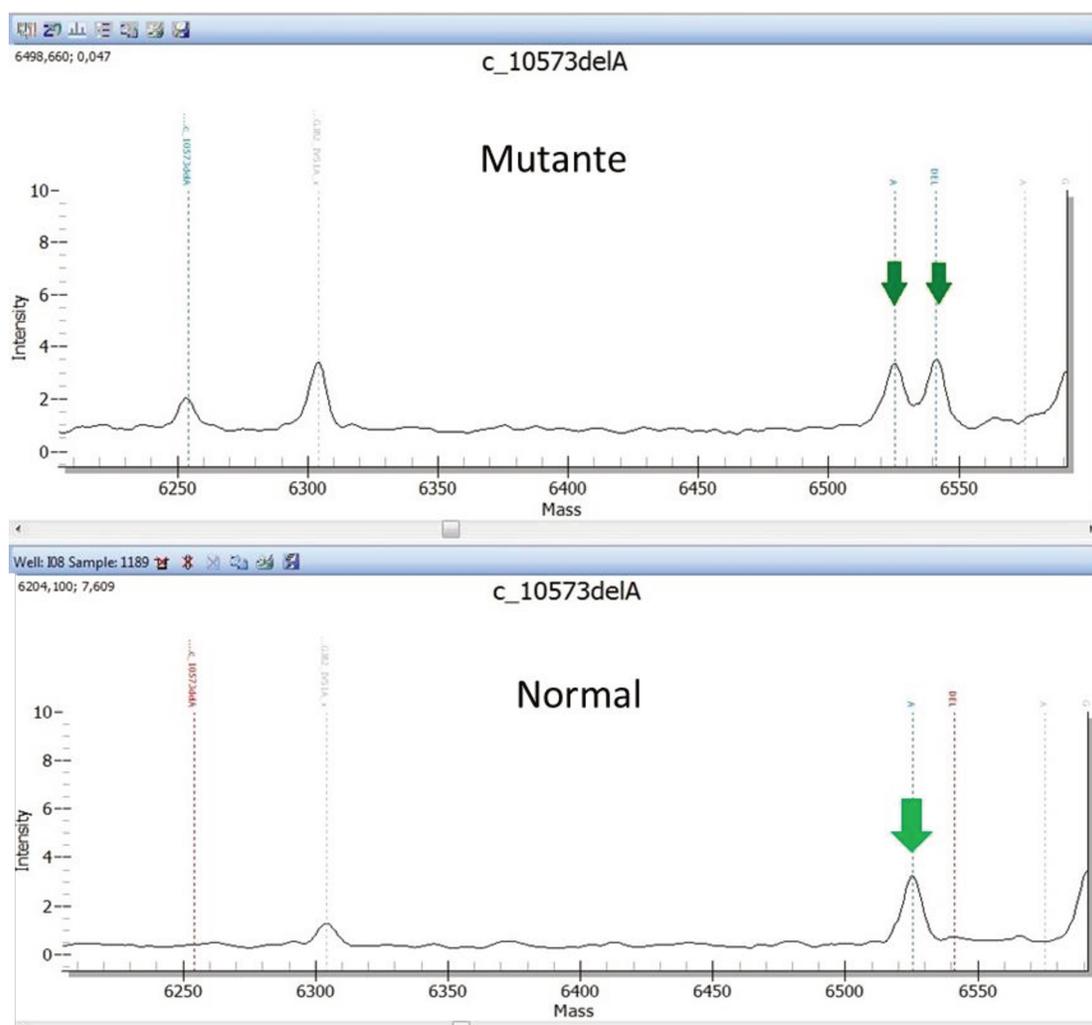


Figura 20: Gráfico mostrando a detecção de alelos pela espectrometria de massa da mutação *c.10573delA*, os alelos estão representados por picos na região colorida pontilhada, indicados pela seta e mostram a base A e a deleção.

Alteração *c.1552-1567del16* (Gene *OTOF*)

O Sequenom identificou a mutação *c.1552-1567del16* em heterozigose em dois paciente. A Figura 21 compara o resultado de um paciente mutante em heterozigose e um paciente normal para *c.1552-1567del16*.

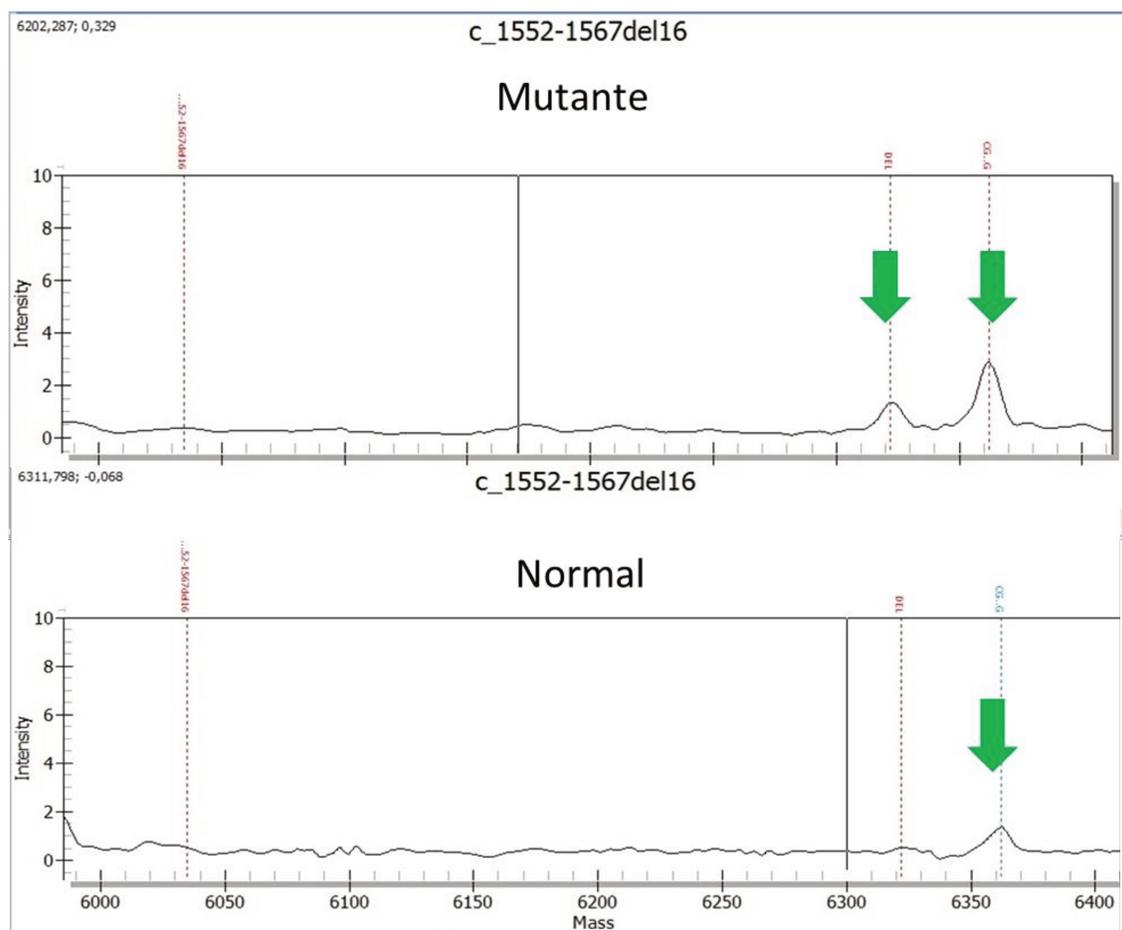


Figura 21: Gráfico mostrando a detecção de alelos pela espectrometria de massa da mutação *c.1552-1567del16*, os alelos estão representados por picos na região colorida pontilhada, indicados pela seta e mostram a base A e a deleção.

Os resultados obtidos pela técnica de espectrometria de Massa iPLEXGold Sequenom® são mostrados na Tabela 9.

Tabela 9: Pacientes rastreados pelo Sequenom®.

n° de Paciente	AS-PCR <i>c.35delG</i>	Sequenciamento do gene <i>GJB2</i>	Mutações encontradas pelo Sequenom®
11	Heterozigoto	<i>c.35delG/N</i>	<i>c.35delG/GJB2</i>
2	Normal	N/N	<i>c.1552-1567del16 /OTOF</i>
1	Normal	N/N	<i>c.10573delA /MYO15A</i>

Entre as 59 mutações estudadas, 4 falharam em todas as amostras testadas (Tabela 10).

Tabela 10: Relação de mutações que falharam no experimento.

Well	Mutação	Gene
1	<i>p.L445W</i>	<i>SLC26A4</i>
2	<i>p.K168R</i>	<i>GJB2</i>
4	<i>p.R1080P</i>	<i>OTOF</i>
6	<i>p.L1138P</i>	<i>OTOF</i>

5.6. Confirmação das alterações encontradas no Sequenom por Sequenciamento

Alteração *c.10573delA* (Gene *MYO15A*)

A presença da mutação *c.10573delA* no gene *MYO15A* detectada por Espectrometria de Massa em um recém-nascido não foi confirmada pela técnica de sequenciamento direto. No entanto, a mutação *c.10573 A > G* em heterozigose foi identificada na mesma região do gene *MYO15A* (Figura 22). A troca da base A para G leva a alteração do aminoácido Serina para uma Glicina (138). Trata-se de uma mutação ainda não descrita.

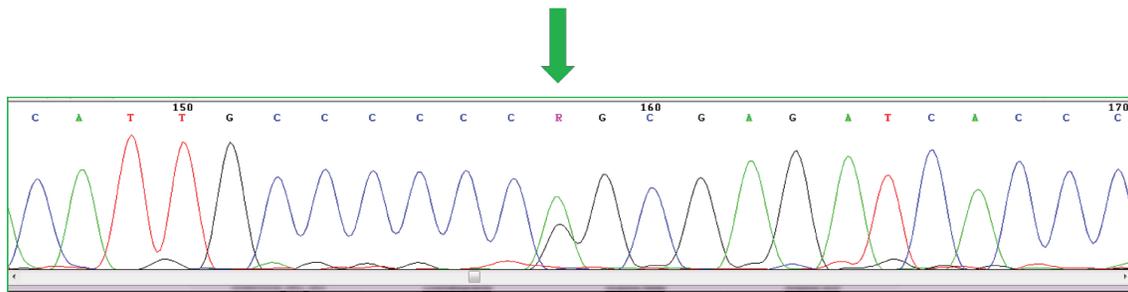


Figura 22: Eletroferograma mostrando em destaque à alteração A>G em heterozigose.

Alteração *c.1552-1567del16* (Gene *OTOF*)

A presença da mutação *c.1552-1567del16* no gene *OTOF* detectada por EM/Sequenom, em dois recém-nascidos não foi confirmada em nenhum deles pela técnica de sequenciamento direto de Sanger, levando a um falso positivo. (Figura 23).

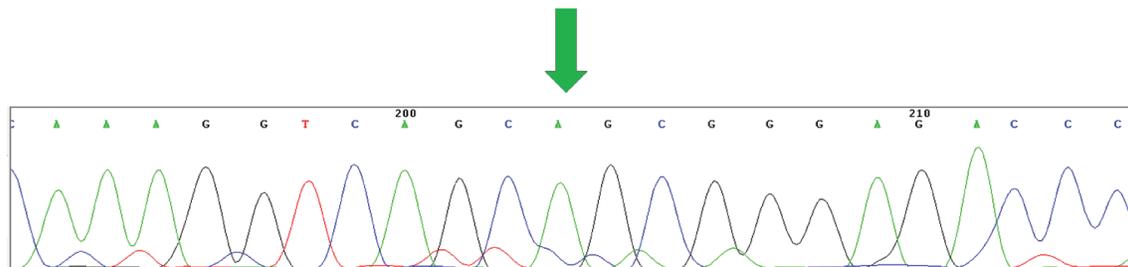


Figura 23: Eletroferograma do sequenciamento da alteração *c.1552-1567del16*, onde a seta indica a base correta.

5.7. Estudo *In Silico* da mutação *c.10573A >G*

No presente estudo foram utilizadas três ferramentas para análise *In Silico* (Polyphen, Sift, Aling) da mutação *c.10573A >G*, e todas mostraram que essa mutação apresenta efeito deletério. Os resultados obtidos pelos programas podem ser observados nas Figuras 24, 25 e 26.

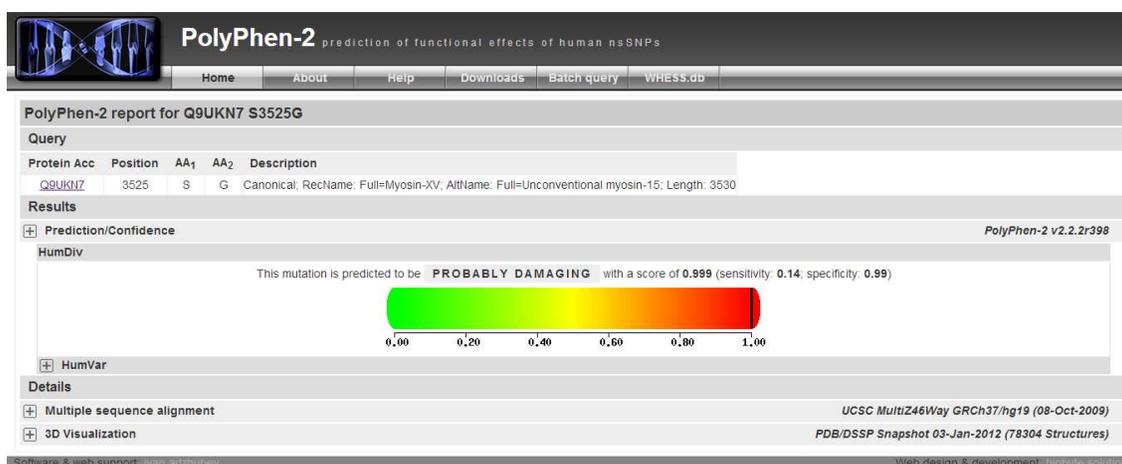


Figura 24: Resultados da análise *in Silico* pela ferramenta Polyphen-2, onde a predição para a mutação *c.10573A >G* mostrou ter 0,99 de especificidade, em uma escala que vai de 0,00 a 1,00.

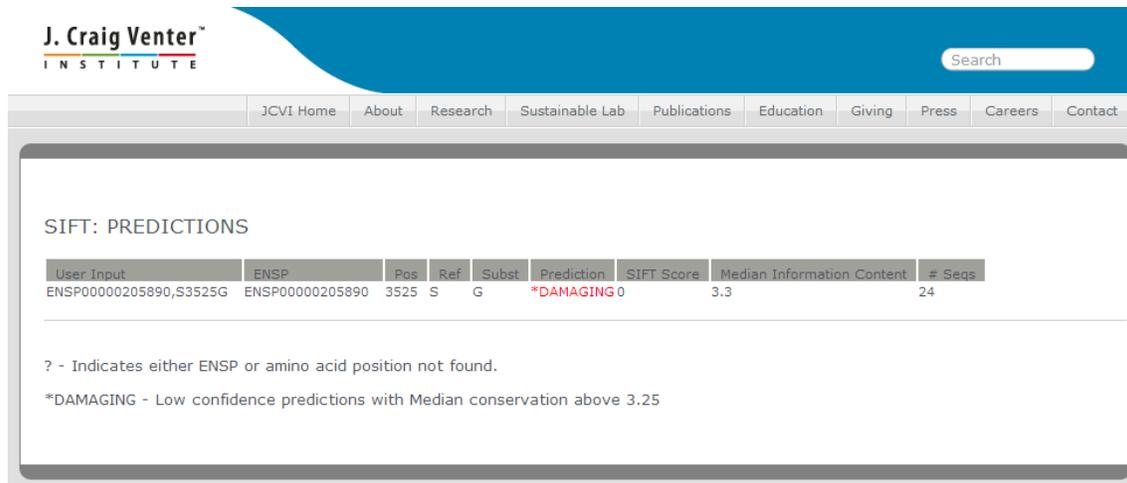


Figura 25: Resultados da análise *in Silico* pela ferramenta *SIFT*, que também identificou a mutação *c.10573A >G* como deletéria. Apresentando um score de 0 (zero), lembrando que na escala considerada pela ferramenta *SIFT*, mutações que apresentam um score com valor menor que 0,05 são prejudiciais ao organismo.

The following classifiers, ordered from most likely to interfere with function to least likely, were used:

- GD>=65+Tan(10)x(GV^2.5) => Class C65 <=> most likely
- GD>=55+Tan(10)x(GV^2.0) => Class C55
- GD>=45+Tan(15)x(GV^1.7) => Class C45
- GD>=35+Tan(50)x(GV^1.1) => Class C35
- GD>=25+Tan(55)x(GV^0.95) => Class C25
- GD>=15+Tan(75)x(GV^0.6) => Class C15
- Else (GD<15+Tan(75)x(GV^0.6)) => Class C0 <=> less likely

Substitution	GV	GD	Prediction
S3525G	0.00	55.27	Class C55

Figura 26: Resultados da análise *in Silico* pela ferramenta *Aling*, que também identificou a mutação *c.10573A >G* como deletéria. Os valores encontrados pela ferramenta foram GV= 0,00 e GD=55,27, o que demonstra que essa alteração está na classe C55. Os valores de referência utilizados pelo *Aling* vão da C65, sendo a mais prejudicial, até C0, menos prejudicial.

DISCUSSÃO

6. Discussão

As restrições e problemas que a surdez congênita traz a seus portadores são diversas e atingem vários aspectos do desenvolvimento global da criança. Estudos mostram que crianças identificadas com perda auditiva até os seis meses de idade tiveram um melhor desempenho na reabilitação do que crianças identificadas após esse período. O diagnóstico precoce permite uma rápida intervenção, que pode incluir estimulação auditiva, indicação do aparelho de Amplificação Sonora Individual (AASI) o mais precocemente possível e até mesmo implante coclear ainda no período crítico de maturação e plasticidade funcional do sistema nervoso central, com prognóstico mais favorável em relação ao desenvolvimento da criança.

No Brasil existem leis que tornam obrigatório a realização do exame de emissões otoacústicas (teste da orelhinha) em recém-nascidos de todo o território nacional. Os bebês que falham neste teste são encaminhados para o exame de PEATE (BERA). Infelizmente, testes genéticos relacionados à surdez ainda não são disponibilizados pelo SUS, e dessa forma a maioria da nossa população não tem acesso a esses exames específicos que geralmente apresentam um alto custo. Em decorrência disso, muitos casos permanecem com a causa da surdez não identificada, não recebendo, portanto, o atendimento e acompanhamento adequado.

O presente estudo foi realizado com recém-nascidos com o objetivo de se estabelecer um protocolo de coleta de amostra para análise genética e propor o desenvolvimento de um painel diagnóstico com as principais mutações relacionadas com a perda auditiva, com o intuito de se ter um rápido diagnóstico e evidenciar a importância da realização de testes genéticos logo ao nascimento, diminuindo o tempo entre diagnóstico, intervenção e reabilitação adequada.

Inicialmente neste estudo foram analisadas três tipos de coleta para identificar o melhor método quanto à facilidade de obtenção da amostra, qualidade e concentração do DNA extraído. Nessa análise foi possível demonstrar que o melhor método de coleta foi sangue em papel FTA®, por ser de fácil armazenamento, apresentar um protocolo de extração de DNA facilmente executável, e ainda produzir amostra com boa concentração e

pureza. Além disso, esse método causa menos desconforto para o recém-nascido já que a coleta é realizada simultaneamente ao teste do pezinho.

Por outro lado, a coleta de saliva é realizada no momento do teste da orelhinha com o bebê dormindo, o que ocorre após a amamentação. A baixa concentração de DNA dessa amostra pode ser explicada devido ao acúmulo de leite na boca do recém-nascido. Protocolos para extração de DNA de saliva salientam que a boca deve receber uma assepsia antes de ter a amostra coletada.

As coletas de saliva e sangue em EDTA podem ser recomendadas em casos especiais, casos em que, por exemplo, não seja possível a coleta em papel FTA, apesar de apresentarem valores inferiores de concentração de DNA. A coleta de saliva e sangue em EDTA também apresentaram resultados satisfatórios.

A forma mais comum de surdez neurossensorial congênita é decorrente de alterações no gene que codifica a proteína Cx26 (139, 140). Mutações nesse gene estão envolvidas em 80% dos casos com herança autossômica recessiva, e ainda, são responsáveis por cerca de metade de todos os casos de perda auditiva de origem genética (58,19). A mutação mais frequente é a *c.35delG*, que corresponde a 70% das alterações encontradas nesse gene, em várias populações (59). A mutação *c.35delG* apresenta padrão de herança autossômica recessiva. Portanto, para causar surdez é necessário estar presente em homozigose.

Para rastreamento e determinação da frequência da mutação *c.35delG* no gene *GJB2* na casuística do presente estudo, primeiramente utilizou-se a técnica de AS-PCR, a qual identificou 11 RNs heterozigotos para essa mutação. Para confirmação desse resultado, realizou-se o sequenciamento do gene *GJB2*, onde se encontra a mutação *c.35delG*. A técnica confirmou o resultado previamente rastreado por AS-PCR, apresentando uma frequência de 0,88% de indivíduos afetados. Os primeiros estudos no Brasil mostraram que a frequência de indivíduos heterozigotos em uma amostra de recém-nascidos foi de 0,97% (71). Em outro estudo, a prevalência dessa mutação foi estimada em cerca de 0,94%, em 84 indivíduos em um total de amostras de 8.974 (141). Portanto, os resultados obtidos nesse estudo se aproximam dos dados previamente encontrados na literatura. Já para a frequência alélica para heterozigotos da *c.35delG* foi determinada em 0,0044%, podendo ser

comparada com a taxa encontrada no primeiro estudo realizado no Brasil, que apresentou uma frequência de 0,0048% (71).

Em um dos indivíduos portadores da mutação *c.35delG* em heterozigose, o sequenciamento do gene *GJB2* permitiu a identificação da alteração G para A na posição 79 (*c.79G>A*). Esta alteração leva à substituição do aminoácido valina por isoleucina no códon 27 (*p.V27I*), situado no primeiro domínio transmembrânico da conexina 26. A variação da base G para A na posição 79 (*c.79G>A*) do gene *GJB2* foi previamente descrita por Kelley *et al.* em 1998 (68), e é considerada polimorfismo sem efeito no fenótipo do indivíduo. Dentre os indivíduos com a mutação *c.35delG* em heterozigose nenhum falhou no teste de EOA, indicando que essas crianças não apresentam perda auditiva ao nascimento. A mutação *c.35delG* do gene *GJB2* tanto em homozigose quanto em heterozigose é a principal causa de perda auditiva recessiva não-sindrômica na maioria das populações(142, 143, 144). De acordo com a literatura, as análises do gene *GJB2* (locus DFNB1) em pacientes com perda auditiva, demonstram heterozigose em aproximadamente 10 a 42% dos casos, a despeito de que a maioria das mutações são recessivas (59), dados que, portanto, ressaltam a importância da investigação dos casos heterozigotos para o locus DFNB1.

Os indivíduos portadores em heterozigose da mutação *c.35delG* rastreados nesse estudo receberão aconselhamento genético e terão acompanhamento clínico pelos profissionais da ATEAL, que realizarão novos testes ao longo da vida do paciente para acompanhar possíveis perdas auditivas progressivas.

Com a grande heterogeneidade de genes relacionados à perda auditiva, a busca por ferramentas e tecnologias que consiga fazer o rastreamento dessas principais mutações na nossa população vem se intensificando.

Para a determinação do painel genético para diagnóstico, utilizou-se a técnica de Espectrometria de Massa iPlexGold Genotyping, que incluiu o rastreamento das 60 mutações mais frequentemente encontradas em nossa população. Essa técnica permite a análise de até 40 SNPs/Mutações simultaneamente, o que implica em um diagnóstico mais rápido e com menor custo.

Para o estudo utilizando a técnica de espectrometria de massa, primeiramente realizou-se testes para se comparar o comportamento dos diferentes tipos de amostra frente

a esta tecnologia, amostras de sangue em papel, em EDTA e em papel FTA, foram testadas e todas mostraram resultados satisfatórios, demonstrando assim a sensibilidade e versatilidade da técnica frente a diferentes métodos de extração ou amostra. Em seguida foram selecionados 77 recém-nascidos e paralelamente foram utilizados controles positivos do banco de dados do Laboratório de Genética Humana do CBMEG/UNICAMP para 17 mutações previamente detectadas pelas técnicas convencionais de PCR e sequenciamento com o objetivo de avaliar a sensibilidade e especificidade da técnica. Os resultados da técnica Sequenom® foi concordante para 16 dos 17 controles, dando um falso negativo para a mutação *V37I*. Provavelmente isso ocorreu devido à baixa qualidade da amostra. Esse resultado indica a importância da padronização dos ensaios e a necessidade que a técnica impõe de se utilizar amostras de boa integridade, pureza e concentração, para que se possa garantir a confiabilidade dos resultados.

Entre os 77 recém-nascidos rastreados pela técnica de Sequenom, a mutação *c.35delG/GJB2* foi detectada nos 11 indivíduos que já haviam sido analisados pela técnica de AS-PCR e Sequenciamento. Além disso, identificou duas outras mutações, a *c.1552-1567del16/OTOF* em dois indivíduos e a mutação *c.10573delA/MYO15A* em um indivíduo, ambas em heterozigose. Para validação desses resultados foi utilizado a técnica de sequenciamento.

A presença da mutação *c.1552-1567del16* no gene *OTOF* não foi confirmada, indicando que se tratava de um falso positivo provavelmente devido à anelamentos inespecíficos já que se trata de reações multiplex.

No caso da mutação *c.10573delA* no gene da *MYO15A*, esperava-se que o sequenciamento indicasse a ausência da base A e portanto detectasse a base seguinte que seria a base G, já que a técnica de Espectrometria de Massa (Sequenom®) consegue detectar a próxima base subsequente à região de ligação do primer. A alteração *c.10573A>G* se trata do SNP *rs182332665*, uma variante rara no gene da *MYO15A*, que causa a troca da base A por uma G, levando a uma mudança do aminoácido Serina para Glicina (138). Seu efeito no fenótipo ainda é desconhecido, mas análises *in Silico* (*Polyphen*, *Sift* e *Aling*) realizadas nesse estudo demonstraram que essa alteração pode ser deletéria e poderia estar envolvida com perda auditiva hereditária. Trata-se de uma mutação ainda não descrita na literatura.

No presente estudo, o recém-nascido portador da mutação *c.10573A>G* falhou no primeiro teste de emissões otoacústicas, e passou no segundo. Até o momento não é possível afirmar quais são os danos causados por esta mutação. Contudo, esse achado destaca a necessidade da investigação de outras mutações no gene *MYO15A* que associadas à mutação *c.10573A>G* possam justificar o fenótipo.

Entre as 59 mutações estudadas pela técnica de espectrometria de massa, 4 delas falharam (*p.L445W* gene *SLC26A4*; *p.K168R* gene *GJB2*; *p.R1080p* e *p.L1138P* gene *OTOF*). Essas falhas podem ter ocorrido por interação de primers, já que se trata de uma técnica *multiplex*.

Apesar da técnica de Espectrometria de Massa (Sequenom®) ainda estar em fase de desenvolvimento e padronização, os resultados obtidos neste estudo demonstraram que se trata de um método eficaz na detecção de alterações genéticas em larga escala, tendo grande potencial para o diagnóstico molecular da perda auditiva. Com a grande heterogeneidade de genes relacionados à perda auditiva, a busca por ferramentas e tecnologias que consiga fazer o *screening* dessas principais mutações na nossa população vem se intensificando. A utilização de plataformas *high-throughput* é uma das principais soluções para as triagens simultâneas, pois conseguem em um tempo muito inferior, quando comparada às técnicas moleculares convencionais utilizadas, fazer a varredura de um número superior de alterações, podendo variar de uma alteração até centenas de alterações. No caso de recém-nascidos, como já foi citado anteriormente, o diagnóstico realizado até os 6 meses de idade tem grande relevância para que a criança receba o devido encaminhamento, tanto para tratamento adequado e reabilitação quanto para implante coclear e aconselhamento genético.

Dessa forma, o diagnóstico genético com um amplo número de mutações pode contribuir consideravelmente para o prognóstico desses pacientes. Além disso, a identificação precoce de mutações específicas através do diagnóstico molecular diminui a necessidade de outros testes clínicos, facilita as previsões quanto à progressão da perda auditiva e de outras alterações, no caso da surdez síndrômica.

Os resultados encontrados no estudo provam a importância da implementação do rastreamento da mutação *c.35delG* do gene *GJB2* em todos os recém-nascidos, já que foi detectada em indivíduos que não falharam no teste da orelhinha e por se tratar de uma

mutação muito frequente na nossa população. O estudo também mostra a importância da implementação do chip com as mutações mais frequentes na nossa população em todos os RNs que falharem no teste da orelhinha, para que possa obter um diagnóstico mais completo em um período menor, para que esse paciente seja encaminhado para a reabilitação mais correta.

Espera-se que os resultados obtidos com este trabalho possam auxiliar no desenvolvimento de um novo programa de triagem auditiva neonatal, conciliando testes fisiológicos com testes genéticos com a intenção de tornar o diagnóstico etiológico mais rápido e eficiente, levando a uma diminuição dos casos de perda auditiva com causas idiopáticas.

CONCLUSÕES

7. Conclusões

1. O melhor método de coleta é o de sangue em FTA® por ser pouco invasivo, permitir a coleta simultaneamente ao teste do pezinho, e por obter uma amostra de DNA adequada.

2. Neste estudo a prevalência de heterozigotos para a mutação *c.35delG* no gene *GBJ2* foi de 0,88%. A pesquisa molecular teve importante contribuição por detectar casos positivos para essa mutação o que possibilitará o aconselhamento genético adequado e acompanhamento periódico das crianças.

3. A técnica de espectrometria de massa Sequenom® é uma ferramenta promissora para o diagnóstico molecular da perda auditiva, pois permite a análise de diversas mutações em vários pacientes de uma só vez, o que implica em um diagnóstico mais rápido a um custo mais baixo.

4. O estudo ainda demonstrou que o desenvolvimento de um painel diagnóstico para rastreamento principalmente da mutação *c.35delG/GJB2*, em recém-nascidos juntamente com o a triagem auditiva neonatal, pode permitir a otimização do diagnóstico etiológico, redução dos custos e rápida intervenção nos RNs que apresentarem perda auditiva.

5. A associação das avaliações fonoaudiológicas e genéticas permite o diagnóstico etiológico de perdas auditivas que à primeira vista são semelhantes, mas que não obedecem à mesma estrutura genética. Os estudos moleculares devem ser abrangentes, evitando diagnósticos precipitados que prejudiquem o aconselhamento genético.

REFERÊNCIAS

8. Referências

- 1 - Gatto CI, Tochetto TM. Deficiência auditiva infantil: implicações e soluções. Rev CEFAC. 2007; 9 (1): 110-15.
- 2 - Silveira JAM, Silveira AM, Bento RF, Butugan O, Miniti A, Almeida ER. Potenciais Evocados Auditivos (EcoG e/ ou BERA) em 2545 crianças com suspeita de disacusia e/ou distúrbios de comunicação (Estudo da Etiologia, Graus da Deficiência Auditiva e Precocidade do Diagnóstico). Rev. Bras. Otorrinolaringol. 1996; 62: 388-408.
- 3 - Butugan O, Santoro PP, Almeida ER, Silveira JAM, Grasel SS. Diagnóstico precoce da deficiência auditiva no primeiro ano de vida de crianças com alto risco através da audiometria de tronco cerebral. Jornal de Pediatria. 2000; 22(2): 115-122.
- 4 - Nóbrega M. Aspectos diagnósticos e Etiológicos da Deficiência Auditiva em crianças e adolescentes. [Dissertação]. São Paulo (SP): Universidade Federal de São Paulo/Escola Paulista de Medicina; 1994.
- 5 - Simões AM, Maciel-Guerra AT. A surdez evitável: predominância de fatores ambientais na etiologia da surdez neurossensorial profunda. Jornal de Pediatria, 1992; 68: 254-257.
- 6 – Bitner-Glindzicz, M. Hereditary deafness and phenotyping in humans. Br Med Bull. 2002; 63: 73-94.
- 7 - Finitzo T, Albright K OJ. The newborn with hearing loss: detection in the nursery. Pediatrics. 1998; 102: 1452-60.
- 8 - Piatto, VB & Maniglia, JV. Importância do Gene Conexina 26 na etiologia da deficiência auditiva sensorineural não-sindrômica. Acta Awho., 2001; 20(2): 106-112.
- 9 – GATANU disponível em: <www.gatanu.org>
- 10 – Organização Mundial de Saúde. Deafness and Hearing Impairment. 2013. Disponível em: <<http://www.who.int/features/factfiles/deafness/en/>>.
- 11 - Baroch KA. Universal newborn hearing screening: finetuning process. Curr Opin Otolaryngol Head Neck Surg. 2003; 11:424-427.
- 12- Yoshinaga-Itano C, Sedey A. Language, speech, and social emotional development of children who are deaf or hard of hearing: the early years. The Volta Review. 2000; 100 (5):298.

- 13 - Sininger Y, Doyle K, Moore J. The case for early identification of hearing loss in children. *Pediatr Clin North Am.* 1999; 46(1):1-14.
- 14 - Roslyng-Jensen AMA. Importância do diagnóstico precoce na deficiência auditiva. In: Lopes-Filho O. *Tratado de fonoaudiologia.* São Paulo: Roca; 1997. p. 297-309.
- 15 - Dror AA, Avraham KB. Hearing Loss: Mechanisms Revealed by Genetics and Cell Biology. *Annual Review of Genetics.* 2009; 43: 411-437.
- 16 – Gorlin RJ, Toriello HV, Cohen MM. *Hereditary hearing loss and it's syndromes.* New York. Oxford University Press. 1995, p.43-61.
- 17 – Finsterer J, Fellingner J. Nuclear and mitochondrial genes mutated in nonsyndromic impaired hearing. *Int J Pediat Otorhinolaryngol,* 2005, 69: 621-649.
- 18 - OECD – Organisation for economic co- operation development. *Quality assurance and proficiency testing molecular genetic testing: Summary results of survey of 18 countries – Paris, 2005* < <http://www.oecd.org/science/biotech/34779945.pdf>>
- 19 - Hilgert N, Smith RJH, Van-Camp G. Function and expression pattern of nonsyndromic deafness genes. *Curr Mol Med.* 2009, 9(5): 546–564.
- 20 - Nothorn JL, Downs MP. *Audição em crianças.* 4a ed. São Paulo (SP): Manole; 2005.
- 21 - Joint Committee on Infant Hearing (JCIH). 2007. Year 2007 Position statement: Principles and guidelines for early hearing detection and intervention programs. *Pediatrics* 2007, 120 (4): 898-921.
- 22 – Comusa - Comitê Multiprofissional em Saúde Auditiva. Disponível em: < http://www.audiologiabrasil.org.br/pdf/COMUSA_final_17_mai2009.pdf>
- 23 – Gravel JS, Hood LJ. Avaliação audiológica infantil. In: Musiek FE, Rintelmann WF. *Perspectivas atuais em avaliação auditiva.* São Paulo: Manole, 2001.p. 301-322.
- 24 - Brasil. Lei N° 12.303, de 2 de agosto de 2010. Dispõe sobre a obrigatoriedade da realização do exame denominado Emissões Otoacústicas evocadas. Brasília, 2010.
- 25 - Petit, C. Genes responsible for human hereditary deafness. *Nature Genetic.* 1996; 19: 385-391.
- 26 - Bonaldi LV. Sistema Auditivo Periférico. In: Bevilacqua MC, Martinez MAN, Balen AS, Pupo AC, Reis ACMB, Frota S. *Tratado de Audiologia.* São Paulo: Santos; 2011.

- 27- Moussalle S, Di Nardo P, Steffen N, Stangler S, Reis H. *Guia Prático de Otorrinolaringologia Anatomia, Fisiologia E Semiologia*. Porto Alegre: EDIPUCRS, 1997.
- 28- Medeiros, E.B. *Introdução à Teoria Acústica*. Anais do I SEMEA, Belo Horizonte, 2002.
- 29- Ilustração modificada de:
< http://audiovoxfonoaudiologia.blogspot.com/2010_05_01_archive.html>
- 30- Ilustração Adaptado de: “The inner ear”, capítulo “The Auditory System” do livro “Neuroscience”, editado por Purves e colaboradores (2001) e disponível no *NCBI Bookshelf* – <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/bookshelf/br.fcgi?book=neurosci&part=894>).
- 31 - Bento RF. Tratado de Otologia. São Paulo: Atheneu; 2013.736p.
- 32 - Stephens D, Héту R. Impairment, disability, and handicap in audiology. *Audiology*. 1991; 30: 185-200.
- 33 - Joint Committee on Infant Hearing (JCIH). Joint Committee on Infant Hearing 1982 statement. *ASHA*; 24: 1017-1018.
- 34 1q- Lopes-Filho, O. Deficiência auditiva. In: Lopes-Filho O. Tratado de Fonoaudiologia. São Paulo: Roca; 1997. p. 3-24.
- 35 - Russo IC P, Santos TMM. *Audiologia infantil*. 3a ed. São Paulo: Cortez; 1989.
- 36- Santos TMM, Russo ICP. *A prática da Audiologia clínica*. 3a ed. São Paulo: Cortez, 1991.
- 37 - Ito T, Noguchi Y, Yashima T, Ohno K, Kitamura, K. Hereditary Hearing Loss and Deafness Genes in Japan. *J Med Dent Sci*. 2010; 57: 1-10.
- 38 - Russo ICP. Overview of audiology in Brazil: state of the art. *Audiology*. 2000; 39(4): 202-206.
- 39 - Bauman NG. *Ototoxic Drugs Exposed: The shocking truth about prescription drugs and other chemicals that can (and do) damage our ears*, Stewartstown, PA, Guidepost Publications, 2003.

- 40 - Davis RR, Kozel P, Erway LC. Genetic influences in individual susceptibility to noise: A review. *Noise Health*. 2003; 5(20): 19-28.
- 41 - Calháu CMDF, Lima-Júnior LRP, Reis AMCS, Capistrano AKB, Lima DVSP; Calháu ACDF et al. Etiology profile of the patients implanted in the cochlear implant program. *Braz J Otorhinolaryngol*. 2011; 77(1): 13-8.
- 42 - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (2010). Disponível em: <<http://www.ibge.gov.br/>>.
- 43 - Stover T, Diensthuber, M. Molecular biology of hearing. *Laryngohinootologie*. 2011; 90(1): 22-34.
- 44 - Friedman LM, Dror AA, Avraham KB. Mouse models to study inner ear development and hereditary hearing loss. *Int J Dev Biol*. 2007; 51: 609-631.
- 45 - Kalatzis V, Petit C. The fundamental and medical impacts of recent progress in research on hereditary hearing loss. *Hum.Mol.Genet*. 1998; 7(10): 1589-1597.
- 46 - Van-Camp G, Smith RJH. Hereditary Hearing Loss Homepage. Disponível em <<http://hereditaryhearingloss.org>>.
- 47 - Sobe T, Vreugde S, Shanin H, Berlin M, Davis N, Kanaan M et al. The prevalence and expression of inherited connexin 26 mutations associated with nonsyndromic hearing loss in the Israeli population. *Human Genet*. 2000; 106: 50-51.
- 48 - Kokotas H, Petersen MB, Willems PJ. Mitochondrial deafness. *Clin Genet*. 2007; 71: 379-91.
- 49 - HUGO Gene Nomenclature Committee. Disponível em <www.genenames.org>.
- 50 - Xue G, Qing-yan Z, Yue-Shuai S, Guo-Jian W, Yong-Yi Y, Feng X. Novel compound heterozygous mutations in the MYO15A gene in autosomal recessive hearing loss identified by whole-exome sequencing. *Am J Hum Genet*. 2005; 77(6): 945-57.
- 51 - Godinho R, Roland E, Neto JFL. VI Manual de Otorrinolaringologia Pediátrica, Disponível em, <<http://www.iapo.org.br>>.
- 52 - Guilford P, Ben AS, Blanchard S, Levilliers J, Weissenbach J, Belkahia A et al. A non-syndrome form of neurosensory, recessive deafness maps to the pericentromeric region of chromosome 13q. *Nat Genet*. 1994; 6(1), 24-28.

- 53 – Kelssell DP, Dunlop J, Stevens HP, Lench NJ, Liang JN, Parry G et al. Connexin 26 mutations in hereditary non-syndromic sensorineural deafness. *Nature*. 1997; 387: 80-83.
- 54 - Bliznetz VA, Galkina GN, Matyushchenko AG, Kisina TG, Markova AV. Changes in the Connexin 26 Gene (GJB2) in Russian Patients with Hearing Loss: Results of Long Term Molecular Diagnostics of Hereditary Nonsyndromic Hearing Loss. *Genetika*. 2012; 48: 112–124.
- 55 - Rabionet R, Gasparini P, Estivill X. Molecular genetics of hearing impairment due to mutations in gap junction genes encoding beta connexins. *Hum Mutat*. 2000; 16(3): 190-202.
- 56 - Rabionet R, Lópes-Bigas N, Arbonès ML, Estivill X. Connexin mutations in hearing loss, dermatological and neurological disorders. *TRENDS in Molecular Medicine*. 2002; 8(5): 205-212.
- 57 - Benson DA, Karsch-Mizrachi I, Lipman DJ, Ostell J, Sayers EW. GenBank. *Nucleic Acids Res*, 2011. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>>.
- 58 - Denoyelle F, Weil D, Wilcox AS, Lench NJ, Allen-Powell DR, Osborn AH. Prelingual deafness: high prevalence of a 30delG mutation in the connexin 26 gene. *Human Molecular Genetic*. 1997; 6: 2173-2177.
- 59 – Wilcox SA, Saunders K, Osborn AH, Arnold A, Wunderlich J, Kelly T et al. High frequency hearing loss correlated with mutations in the GJB2 gene. *Hum Genet*. 2000; 106(4): 399-405.
- 60 - Krawczak & Cooper. Human Gene Mutation Database. Disponível em: <www.hgmd.org>).
- 61 – Snoeckx RL1, Huygen PL, Feldmann D, Marlin S, Denoyelle F, Waligora J, et al. GJB2 mutations and degree of hearing loss: a multicenter study. *Am J Hum Genet*. 2005; 77(6): 945-957.
- 62 - Cohn ES, Kelley PM, Fowler TW, Gorga MP, Lefkowitz DM. Clinical studies of families with hearing loss attributable to mutations in the connexin 26 gene (*GJB2* / *DFNB1*). *Pediatrics*. 1999; 103: 546- 550.
- 63 - Zelante L, Gasparini P, Estivill X, Melchionda S, D'Agruma L, Govea N et al. Connexin 26 mutations associated with the most common form of non-syndromic

neurosensory autosomal recessive deafness (DFNB1) in Mediterraneans. *Hum Mol Genet.* 1997; 6(9): 1605-1609.

64 - 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. *Human Molecular Genetics.* 1997; 6(12): 2163-2172.

65 - Gasparini P, Rabionet R, Barbujani G, Melchionda S, Petersen M, Brondum-Nielsen K et al. High carrier frequency of the 35delG deafness mutation in European populations, Genetic Analysis Consortium of *GJB2* 35delG. *Eur J Hum Genet.* 2000; 8: 19-23.

66 - Van-Laer L, Coucke PR, Mueller F, Caethoven G, Flothmann K, Prasad SD et al. A common founder for the 35delG *GJB2* gene mutation in connexin 26 hearing impairment. *J Med Genet.* 2001; 38:515–518.

67 - Roux AF, Pallares-Ruiz N, Vielle A, Faugère V, Templin C, Leprevost D et al. Molecular epidemiology of DFNB1 deafness in France. *BMC Med Genet.* 2004; 5(5): 1-10.

68 – Kelley PM, Harris DJ, Comer BC, Askew JW, Fowler T, Smith SD et al.. Novel mutations in the connexin 26 gene (*GJB2*) that cause autosomal recessive (DFNB1) hearing loss. *Am J Hum Genet.* 1998; 62(4): 792-799.

69 – Rothrock CR, Murgia A, Sartorato EL, Leonardi E, Wei S, Lebeis SL, et al.. Connexin 26 35delG does not represent a mutational hotspot. *Hum Genet.* 2003; 113:18–23.

70 - Snoeckx RL, Huygen PL, Feldmann D, Marlin S, Denoyelle F, Waligora J et al. *GJB2* mutations and degree of hearing loss: a multicenter study. *Am J Hum Genet.* 2005; 77: 945–957.

71 - Sartorato EL, Gottardi E, Oliveira CA, Magna LA, Annichino-Bizzachi JM, Seixas CA et al. Determination of carrier frequency of the 35delG mutation in Brazilian neonates. *Clinical Genetics.* 2000; 58(4): 339-402.

72 - Oliveira CA, Alexandrino F, Sandes KA, Silva WA, Maciel-Guerra AT, Magna LA, Sartorato EL. Frequency of the 35delG mutation in the *GJB2* gene in samples of European, Asian and African Brazilians. *Human Biology.* 2004; 76(2): 313-316.

73 – Antoniadis T, Rabionet R, Kroupis C, Aperis GA, Economides J, Petmezakis, J et al. High prevalence in the Greek population of the 35delG mutation in the connexin 26 gene causing prelingual deafness. *Clin Genet.* 1999; 55(5): 381-382.

74 - Wu CC, Lu YC, Chen PJ, Yeh PL, Su YN, Hwu WL et al. Phenotypic analyses and mutation screening of the *SLC26A4* and *FOXI1* genes in 101 Taiwanese families with bilateral nonsyndromic enlarged vestibular aqueduct (DFNB4) or Pendred syndrome. *Audiol Neurootol.* 2010; 15(1): 57-66.

75 - Everett LA, Glaser B, Beck JC, Idol JR, Buchs A, Heyman M et al. Pendred syndrome is caused by mutations in a putative sulphate transporter gene (*PDS*). *Nature Genetics.* 1997; 17: 411-422.

76 - Scott DA, Wang R, Kreman TM, Sheffield VC, Karniski LP. The Pendred syndrome gene encodes a chloride-iodide transport protein. *Nature Genetics.* 1999; 21(4): 440-443.

77- Nakaya K, Harbidge DG, Wangemann P, Schultz BD, Green ED, *et al.* Lack of pendrin HCO₃⁻ transport elevates vestibular endolymphatic [Ca²⁺] by inhibition of acid-sensitive TRPV5 and TRPV6 channels. *Am. J. Physiol. Renal. Physio.* 2007; 292: 1314–1321.

78 – Bamiou DE, Phelps P, Sirimanna T. Temporal bone computed tomography findings in bilateral sensorineural hearing loss. *Archives of Disease in Childhood.* 2000; 82(3): 257–260.

79 - Mafong DD, Shin EJ, Lalwani AK. Use of laboratory evaluation and radiologic imaging in the diagnostic evaluation of children with sensorineural hearing loss. *Laryngoscope.* 2002; 112(1): 1-7.

80 - Angeli S, Lin X, Liu XZ. Genetics of hearing and deafness. *Anatomical Record.* 2012; 295(11): 1812-1829.

81 - Roux AF, Pallares-Ruiz N, Vielle A, Faugère V, Templin C, Leprevost D, et al. Molecular epidemiology of DFNB1 deafness in France. *BMC Medical Genetics.* 2004; 5(5):1-10.

82 – Dulon D, Safieddine S, Jones SM, Petit C. Otoferlin is critical for a highly sensitive and linear calcium-dependent exocytosis at vestibular hair cell ribbon synapses. *The Neuroscience Journal.* 2009; 29(34): 10474-10487.

83 – Getics Home Reference. Disponível em: <<http://ghr.nlm.nih.gov/gene/OTOF>>

84 - Yasunaga S, Grati M, Chardenoux S. *OTOF* encodes multiple long and short isoforms: genetic evidence that the long ones underlie recessive deafness DFNB9. American Journal of Human Genetics. 2000; 67(3): 591–600.

85 - Van Camp G, Smith RJH. Hereditary Hearing Loss Homepage. Disponível em: <<http://hereditaryhearingloss.org/>>.

86 - Usami SI, Iwasa YI, Nishio SY, Yoshimura H, Kumakawa SA, et al. *OTOF* mutation screening in Japanese severe to profound recessive hearing loss patients. *BMC Medical Genetics*. 2013; 14:95-97.

87 - Migliosi V, Modamio-Hoybjor S, Moreno-Pelayo MA. Q829X, a novel mutation in the gene encoding otoferlin (*OTOF*), is frequently found in Spanish patients with prelingual nonsyndromic hearing loss. *Journal of Medical Genetics*. 2002; 39 (7): 502–506.

88 - Belyantseva IA, Boger ET, Friedman TB. Myosin XVa localizes to the tips of inner ear sensory cell stereocilia and is essential for staircase formation of the hair bundle. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2003; 100 : 13958–13963.

89- Sirmaci A, Erbek S, Price J, Huang M, Duman D, Cengiz FB et al. A truncating mutation in *SERPINB6* is associated with autosomalrecessive nonsyndromic sensorineural hearing loss. *American Journal of Human Genetics*. 2010; 86 (5): 797-804.

90 - Liang Y, Wang A, Belyantseva IA, Anderson DW, Probst FJ, Barber TD, et al. Characterization of the human and mouse unconventional myosin XV genes responsible for hereditary deafness DFNB3 and shaker 2. *Genomics*; 1999; 61: 243-258.

91 - Manor U, Disanza A, Grati, MH, Andrade L, Lin H, Di Fiore PP, et al. Regulation of stereocilia length by myosin XVa and whirlin depends on the actin-regulatory protein Eps8. *Curr Biol*. 2011; 21: 167-172.

92- OMIM - Online Mendelian Inheritance in Man. Disponível em: <<http://omim.org/allelicVariant/602666>>

93 - Lezirovitz K, Braga MC, Thiele-Aguiar RS, Auricchio MT, Pearson PL, Otto PA et al. A novel autosomal dominant deafness locus (DFNA58) maps to 2p12-p21. *Clinical Genetics*. 2009; 75 (5): 490-493.

94 - Abreu-Silva RS, Lezirovitz K, Braga MC, Spinelli M, Pirana S, Della-Rosa VA et al. Prevalence of the A1555G (12S rRNA) and tRNASer(UCN) mitochondrial mutations in hearing impaired Brazilian patients. *Braz J Med Biol Res.* 2006; 39(2): 219-226.

95 - Lopes Filho, O. Deficiência Auditiva. In: *Novo Tratado de Fonoaudiologia.* Barueri (SP): Manole; 2013.p.3-14.

96 – Northern JL, Downs MP. *Audição na Infância.* Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2005.

97 - National Institutes of Health Consensus Development Conference Statement March 1-3, 1993. Disponível em:
<<http://consensus.nih.gov/1993/1993hearinginfantschildren092html.htm>>

98 - Joint Committee on Infant Hearing (1995).1994 position statement. *Audiology Today.* 1995; 6: 6-9.

99 - Yoshinaga-itano C, Sedey A, Coulter DK, Mehl AL. Language of early and a later identified children with hearing loss. *Pediatrics.* 1998; 102: 1161-1171.

100 - American Academy of Pediatrics. Task Force on Newborn and an infant Hearing. Newborn and an infant hearing loss: detection and an intervention. *Pediatrics.* 1999; 103: 527-530.

101 - Joint Committee on Infant Hearing (JCIH). 2000. Year 2000 position statement: Principles and guidelines for early hearing detection and intervention programs. *Pediatrics.* 2000, 106: 798-817.

102 - Yoshinaga-itano C, Gravel JS. The evidence for universal newborn hearing screening. *Am J Audiol.* 2001; 10: 62-64.

103 - Choo D, Meinzen-Derr J. Newborn Hearing Screening in 2010. *Curr Opin Otolaryngol Head Neck Surg.* 2010; 18 (5): 399-404.

104 - World Health Organization. Newborn and Infant hearing screening:current issues and a guiding principles for action.2010. Disponível em:
<http://www.who.int/blindness/publications/Newborn_and_Infant_Hearing_Screening_Report.pdf>

105 - Shulman S, Besculides M, Saltzman A, Ireys H, White KR, Forsman I. Evaluation of the universal newborn hearing screening and intervention program. *Pediatrics*. 2010; 126 (1): 19-27.

106 – Cavalcanti HG, Guerra RO. The role of maternal socioeconomic factors in the commitment to universal newborn hearing screening in the northeastern region of Brazil. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol*. 2012; 76: 1661-1667.

107 – Azevedo MF. Triagem auditiva neonatal. In: Fernandes FDM, Mendes BCA, Novaes BLPGP. *Tratado de Fonoaudiologia*. São Paulo: Roca; 2010, p. 65-84.

108 - Comitê Brasileiro Sobre Perdas Auditivas Na Infância – CBPAI. Resolução 01/99. Triagem auditiva neonatal universal. Disponível em: <<http://www.gatanu.org/gatanu/cbpai.php>>

109 - Brasil. Ministério da Saúde. Política Nacional de Atenção à Saúde Auditiva Portaria No 587 de 07 de outubro de 2004. Disponível em: <<http://dtr2001.saude.gov.br/sas/PORTARIAS/Port2004/PT-587.htm>>

110 – Lewis DR, Marone SAM, Mendes BCA, Cruz LM, Nóbrega M. Comitê Multiprofissional em Saúde Auditiva: COMUSA. *Braz J Otorhinolaryngol (Impr.)* 2010; 76(1): 121-128.

111 – Joint Committee on Infant Hearing (JCIH). Year 2007 Position statement: Principles and guidelines for early hearing detection and intervention programs. *Pediatrics*. 2007; 120 (4): 898-921.

112 – Brasil. Decreto 7.612, publicado em 2011, fica instituído o Plano Nacional dos Direitos da Pessoa com Deficiência – Plano Viver sem Limite. Brasília, 2012.

113 - Brasil. Portaria no 793, de 24 de abril de 2012. Institui a Rede de Cuidados à Pessoa com Deficiência no âmbito do Sistema Único de Saúde. Brasília, 2012.

114 - Brasil. Diretrizes de atenção da triagem auditiva neonatal. Brasília, 2012.

Disponível em:

<http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/diretrizes_atencao_triagem_auditiva_neonatal.pdf>

115 - Magalhães Junior HM. Programa Nacional de triagem neonatal integrado.

Disponível em: <http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/2h_280213.pdf>

116 - Cecatto SB, Garcia RID, Costa KS, Abdo TRT, Rezende CEB, Rapoport PB. Análise das principais etiologias da deficiência auditiva em Escola Especial “Anne Sullivan”. Rev Bras Otorrinolaringol. 2003; 69(2): 235-240.

117 - Lima MCMP, Rossi TRF, Françaço MFC, Marba ST, Lima GML, Santos MFC. Detecção de perdas auditivas em neonatos de um hospital público. Rev. soc. bras. Fonoaudiol. 2010; 15(1): 1-6.

118 - Cristofolini C, Magni C. Audição: relatos e experiências de professores do ensino fundamental. Rev Fonoaudiol Bras. 2002; 2(2): 31-38.

119 - Cálderón SC, de la Blanca EBP. Marco para la evaluación de las pruebas genéticas en el Sistema Sanitario Público de Andalucía. Agencia de Evaluación de Tecnologías Sanitarias, Sevilla, 2005.

120 – Mutai H, Suzuki N, Shimizu A, Torii C, Namba K, Morimoto N, et al. Diverse spectrum of rare deafness genes underlies early-childhood hearing loss in Japanese patients: a cross-sectional, multi-center next-generation sequencing study. Orphanet Journal of Rare Diseases. 2013; 8:172.

121 - Morrison T, Hurley J, Garcia J, Yoder K, Katz A, Roberts D et al. Nanoliter high throughput quantitative PCR. Nucleic Acids Research. 2006; 34 (18) 123.

122 - Lima, GML & Colella-Santos, MF. Triagem auditiva neonatal. In: Marba, STM, Mezzacappa Filho, F. Manual de Neonatologia Unicamp, 2 ed, Rio de Janeiro: Revinter, 408-411, 2009.

123 - Godinho R, Sih T, Ramos SR. Avaliação Auditiva na Infância. In: Sih, T; Chinski, A; Eavey, R; Godinho, R (Ed). *IV Manual de Otorrinolaringologia Pediátrica da IAPO*. Guarulhos/SP: Lis Gráfica & Editora, 254-263, 2006.

124 – Scott DA; Kraft ML; Carmi R; Ramesh A; Elbedour K; Yairi Y et al.. Identification of mutations in the connexin 26 gene that cause autosomal recessive nonsyndromic hearing loss. Hum Mutat. 1998; 11(5): 387-394.

125 - Romanos J, Kimura L, Fávero ML, Izarra FA, de Mello Auricchio MT, Batisso AC et al. Novel *OTOF* mutations in Brazilian patients with auditory neuropathy. . 2009; 54 (7) :382-385.

126 - Kopp P, Arseven OK, Sabacan L, Kotlar T, Dupuis J, Cavaliere H et al. Phenocopies for deafness and goiter development in a large inbred Brazilian kindred with

Pendred's syndrome associated with a novel mutation in the PDS gene. *J Clin Endocrinol Metab.* 1999; 84(1):336-341.

127 - Tang K, Fu DJ, Julien D, Braun A, Cantor CR, Koster H. Chip-based genotyping by mass spectrometry. *Proc. Natl. Acad. Sci.U.S.A.* 1999; 96:10016-10020

128 - Irwin, D. The MASSARRAY System for Plant Genomics. In: Henry, R.J. (ed) *Plant Genotyping II SNP Technology*. CABI Publishing. 2008, 285.

129 - Polyphen (Fenotipagem de Polimorfismo) disponível em: <<http://genetics.bwh.harvard.edu/pph/>>.

130 - Ramensky V, Bork P, Sunyaev S. Human non-synonymous SNPs: server and survey. *Nucl Acids Res.* 2002; 30: 3894–3900.

131 - Sunyaev SR, Eisenhaber F, Rodchenkov IV, Eisenhaber B, Tumanyan VG, Kuznetso V. En: PSIC: profile extraction from sequence alignments with position-specific counts of independent observations. *Protein Eng.* 1999; 12(5): 387-394.

132 - Ng PC, Henikoff S. Predicting deleterious amino acid substitutions. *Genome Res.* 2001; 11(5): 863-874.

133 - Ng PC, Henikoff S. Predicting the Effects of Amino Acid Substitutions on Protein Function. *Annu Rev Genomics Hum Genet.* 2006; 7: 61–80.

134 - Sift – Disponível em: <<http://sift.jcvi.org/>>.

135 - Aling – Disponível em: <http://agvgd.iarc.fr/agvgd_input.php>.

136 – Tavtigian SV, Greenblatt MS, Lesuer F, Byrnes GB. In silico analysis of missense substitutions using sequence-alignment based methods. *Hum Mutat.* 2008; 29(11): 1327-1336.

137 - Mathe E, Olivier M, Kato S, Ishioka C, Hainaut P, Tavtigian SV. Computational approaches for predicting the biological effect of p53 missense mutations: a comparison of three sequence analysis based methods. *Nucleic Acids Research.* 2006; 34(5): 1317-1325.

138 - http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/snp_ref.cgi?rs=rs182332665

139 – Smith, RJH; Hilderbrand, MS; Van Camp, G. Deafness and hereditary hearing loss overview. In: Pagon, RA; Bird, TD; Dolan, CR *et al.* (Eds). *Gene reviews*. Seattle: University of Washington, 1993. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1434/>>.

- 140 – Richardson, GP; de Monvel, JB; Petit, C. How the genetics of deafness illuminates auditory physiology. *Annu Rev Physiol.* 2011; 73(3): 11-34.
- 141 – Nivolini KAB, da Silva Costa SM, Pomílio MCA, Pereira T, Lopes KC, Moraes VCS, et al. Newborn hearing screening and genetic testing in 8974 Brazilian neonates. *International J of Pediatric Otorhinolaryngology.* 2010; 74: 926–929.
- 142 – Sartorato EL. A genética da surdez. *Pesquisa Fapesp, janeiro/fevereiro 2000*, p.26-28.
- 143 – Carhart R. An improved method for classifying audiograms. *Laryngoscope.* 1945; 55: 640.
- 144 - Akhtar A, Masroor EB, Saeeda k, Jamil A, Kamran A. Linkage study of DFNB3 responsible for hearing loss in human. *Indian J Hum Genet.* 2013; 19(3): 325–33

ANEXOS

9. Anexos

FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

www.fcm.unicamp.br/fcm/pesquisa

CEP, 22/05/12.
(PARECER CEP: N° 396/2006)

PARECER

I-IDENTIFICAÇÃO:

PROJETO: “ESTUDO MOLECULAR DA PERDA AUDITIVA”.

PESQUISADOR RESPONSÁVEL: Edi Lúcia Sartoro

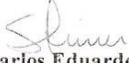
II – PARECER DO CEP.

O Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP tomou ciência e aprova o adendo que inclui o projeto “**DIAGNOSTICO DE SURDEZ DE ORIGEM GENÉTICA: DESENVOLVIMENTO DE PAINEL DIAGNÓSTICO PARA RASTREAMENTO EM RECÉM-NASCIDOS**”, com a finalidade de mestrado da aluna Nathália Zocal Pereira dos Santos, referente ao protocolo de pesquisa supracitado.

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

III – DATA DA REUNIÃO.

Homologado na V Reunião Ordinária do CEP/FCM, em 22 de maio de 2012.


Prof. Dr. Carlos Eduardo Steiner
PRESIDENTE do COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA
FCM / UNICAMP

Comitê de Ética em Pesquisa - UNICAMP
Rua: Tessália Vieira de Camargo, 126
Caixa Postal 6111
13083-887 Campinas – SP

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

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (TCLE)

Diagnóstico de surdez de origem genética: Desenvolvimento de painel diagnóstico para rastreamento em recém-nascidos

Nome do paciente:

Justificativa e objetivos do estudo:

Devido à grande heterogeneidade na genética da surdez ainda existe muita dificuldade na aplicação clínica dos avanços tecnológicos na descoberta dos genes desta patologia. Considerando que, em países desenvolvidos mais da metade dos casos de surdez têm origem genética, o estabelecimento de estratégias diagnósticas já ao nascimento tem uma grande implicação nas políticas públicas nessa área de conhecimento.

O principal objetivo do estudo é a seleção de mutações para diagnóstico simultâneo baseado no espectro de mutações mais comuns observadas em nosso meio. Pretende-se desenvolver um chip de DNA para teste em recém-nascidos. Nesses indivíduos, em alguns casos será possível a detecção de alterações genéticas e, portanto, confirmação do diagnóstico etiológico com consequências diretas no aconselhamento genético e prognóstico.

Procedimentos a que serão submetidos os pacientes: Rastreamento de alterações no gene da conexina 26 (*GJB2*) e gene mitocondrial *MTRNR1*. Os exames complementares serão realizados, caso necessário, isto é, em resultados positivos para análise de alterações no gene da conexina. Os exames serão indicados por um otorrinolaringologista, consistindo das investigações descritas a seguir: Avaliação comportamental da audição: Audiometria; Emissões Otoacústicas Evocadas: Transientes e Produto de Distorção; Potenciais Evocados Auditivos de Tronco Encefálico (PEATE); Tomografia computadorizada e/ou ressonância magnética;

Risco e desconforto: As amostras de sangue periférico serão obtidas por punção venosa, ou punção na polpa digital, ou coleta de sangue na ocasião do teste do pezinho, que são procedimentos médicos comuns, com riscos muito baixos. O risco da coleta de sangue pode incluir hiperemia local transitória, hematoma, celulite ou flebite. O desconforto será mínimo, pois a coleta será realizada por profissional treinado ou pelo responsável pelo projeto, devidamente habilitados para este procedimento. Medidas de proteção: assepsia e antisepsia do local para a coleta de amostra de sangue e utilização de materiais descartáveis. A avaliação de potenciais evocados auditivos de tronco encefálico, tomografia computadorizada e ressonância magnética não apresentam risco ao paciente, exceto às crianças que necessitem de sedação para realização do exame. Contudo, a sedação é de baixo risco e realizada na presença de médico radiologista e otorrinolaringologista e de equipamento de segurança necessários.

Benefícios esperados: O esclarecimento da perda auditiva não é tarefa fácil, em especial em nosso meio. Esse projeto objetiva não só pesquisar alterações moleculares no gene da conexina 26 (*GJB2*) e gene mitocondrial *MTRNR1* em recém-nascidos, mas também desenvolver um chip de DNA para o diagnóstico molecular para realização do exame em larga escala. Existe também a necessidade de se associar os testes genéticos, aos já existentes programas de prevenção e diagnóstico precoce da perda auditiva, a fim de se conhecer a magnitude deste problema e dar um passo de alerta à população, aos profissionais da saúde e às autoridades locais. Isto gera benefícios à população surda e a seus familiares, pois a precocidade do diagnóstico e reabilitação gera grandes reduções no orçamento público.

Garantia de resposta às perguntas: Será garantido aos pacientes e responsáveis, respostas a quaisquer perguntas que possam aparecer em qualquer momento da pesquisa, e esclarecimento de qualquer dúvida acerca dos assuntos relacionados com esta pesquisa. É importante ressaltar que os exames poderão não ser realizados em casos de amostras coletadas em condições insuficientes para análise.

Liberdade de abandonar a pesquisa sem prejuízo para si: O paciente ou responsável deve estar ciente que a participação neste projeto de pesquisa é voluntária e que pode recusar ou retirar seu consentimento, a qualquer momento (incluindo a amostra de sangue), sem comprometer os cuidados médicos que o paciente recebe atualmente ou receberá no futuro.

Garantia de privacidade: Será mantido o sigilo e o caráter confidencial das informações, e a identificação dos pacientes não será exposta nas conclusões ou publicações. Vínculos de parentescos poderão ser observados, mas tais resultados não serão transmitidos aos interessados a menos que sejam requisitados.

Armazenamento de Materiais Biológicos: O material biológico será descartado após o término do estudo.

Compromisso com informações atualizadas do estudo: Durante todo o decorrer da pesquisa será mantido o compromisso de se proporcionar informações atualizadas referentes aos resultados dos procedimentos realizados. Os pacientes que apresentarem exame genético alterados serão convocados para orientação genética.

Despesas da pesquisa: Todas as despesas da pesquisa serão financiadas com recursos de projetos FAPESP e/ou CNPq.

Contato: Se tiver alguma consideração ou dúvida sobre a pesquisa, o paciente ou responsável pode entrar em contato com os pesquisadores responsáveis pelo fone (19) 3521-1091, ou no Laboratório de Genética Molecular Humana do Centro de Biologia Molecular e Engenharia Genética (CBMEG), situado na Avenida Cândido Rondon, 400, Caixa Postal 6010, Cidade Universitária Zeferino Vaz, Campinas/SP.

Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa: Se tiver alguma consideração ou dúvida sobre a ética da pesquisa, o paciente ou responsável pode entrar em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da Faculdade de Ciências Médicas, da UNICAMP, situado na Rua Tessália Vieira de Camargo, 126, Caixa Postal 6111, CEP 13083-887,

Cidade Universitária Zeferino Vaz, Campinas/SP, fone (19) 3521-8936 ou (19) 3521-7187,
e-mail cep@unicamp.br.

Declaro que recebi cópia do presente Termo de Consentimento.

Data: ___/___/_____

Nome do Paciente ou Responsável

Assinatura do Paciente ou Responsável