

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

INSTITUTO DE BIOLOGIA



PRISCILA ZONZINI RAMOS

**ESTUDO DA ETIOLOGIA DA PERDA AUDITIVA EM
AMOSTRA DE INDIVÍDUOS BRASILEIROS: DIRETRIZES
PARA PROTOCOLO DE CONDUTA CLÍNICA**

Este exemplar corresponde à redação final
da tese defendida pelo(a) candidato (a)
PRISCILA ZONZINI RAMOS
Edi Lúcia Sartorato
e aprovada pela Comissão Julgadora.

Dissertação apresentada ao Instituto de
Biologia para obtenção do Título de
Mestre em Genética e Biologia
Molecular, na área de Genética Animal e
Evolução.

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Edi Lúcia Sartorato

Co-orientador: Prof. Dr. Arthur Menino Castilho

Campinas, 2012

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA POR
ROBERTA CRISTINA DAL' EVEDOVE TARTAROTTI – CRB8/7430
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA - UNICAMP

R147e

Ramos, Priscila Zonzini, 1987-

Estudo da etiologia da perda auditiva em amostra de indivíduos brasileiros: diretrizes para protocolo de conduta clínica / Priscila Zonzini Ramos. – Campinas, SP: [s.n.], 2011.

Orientador: Edi Lúcia Sartorato.

Coorientador: Arthur Menino Castilho.

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

1. Perda auditiva - Diagnóstico. 2. Perda auditiva - Etiologia. 3. Protocolos clínicos. 4. Genética. 5. Implantes cocleares. I. Sartorato, Edi Lúcia. II. Castilho, Arthur Menino. III. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. IV. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em Inglês: Study of the etiology of hearing loss in a sample of Brazilian individuals: guidelines for clinical management protocol

Palavras-chave em Inglês:

Hearing loss - Diagnosis

Hearing loss – Etiology

Clinical protocols

Genetics

Cochlear implant

Área de concentração: Genética Animal e Evolução

Titulação: Mestre em Genética e Biologia Molecular

Banca examinadora:

Edi Lúcia Sartorato [Orientador]

Agrício Nubiato Crespo

Mônica Barbosa de Melo

Data da defesa: 16-02-2012

Programa de Pós Graduação: Genética e Biologia Molecular

Campinas, 16 de Fevereiro de 2012.

BANCA EXAMINADORA

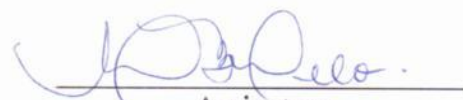
Prof.^a. Dr.^a. Edi Lúcia Sartorato (Orientadora)


Assinatura

Prof. Dr. Agrício Nubiato Crespo


Assinatura

Prof.^a. Dr.^a. Mônica Barbosa de Melo


Assinatura

Prof. Dr. Carlos Takahiro Chone

Assinatura

Prof.^a. Dr.^a. Laura Maria Mariscal Ottoboni

Assinatura

“Criatividade é inventar,
experimentar, crescer, correr
riscos, quebrar regras, cometer
erros, e se divertir”

(Mary Lou Cook)

À minha família tão querida.
Por compartilharem dos meus
sonhos, conquistas e alegrias.

AGRADECIMENTOS

À Prof^a. Dr^a. Edi Lúcia Sartorato pela orientação, apoio, incentivo e confiança.

Ao Prof. Dr. Arthur Menino Castilho pela co-orientação e atenção oferecida no decorrer deste trabalho.

Aos Professores Dr. Marcelo Lima Ribeiro, Dr^a. Camila Andréa de Oliveira e Dr^a. Carmen Veríssima Ferreira pela contribuição no exame de qualificação.

Às Professoras Dr^a. Andréa Trevas Maciel Guerra e Dr^a. Fernanda Caroline Soardi por terem gentilmente aceito participar da banca prévia para avaliação da tese.

Aos Professores Dr. Agrício Nubiato Crespo e Dr^a. Mônica Barbosa de Melo por terem gentilmente aceito 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 e que de alguma forma contribuíram, ajudaram, incentivaram e me ensinaram: Paulo, Carol, Erika, Nathy, Fabio, Rogério, Vanessa, Sueli, Nathy Graviola, Mari, Diego, Flávia Elfo, Vanessinha, Gleice, Ana Letícia, Dai, Xuxa, Mara, Zélo, Renata, Flávia Flor, Denise, Cris, Helena, Débora, Reginaldo, Fer, Luli, Ana Paula, Renan, Bela, Dri e Rose. Em especial, ao meu namorado Emerson pelo carinho e paciência.

À Prof^a. Dr^a. Maricilda Palandi de Mello pelo exemplo de profissionalismo e caráter.

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

A toda a equipe do Ambulatório de Otorrinolaringologia do HC, médicos, fonoaudiólogas, enfermeiras e outros funcionários.

Aos meus pacientes e familiares, 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, Luciano e Lélia, meus irmãos, Luíza e Bruno, e todos da minha família pelo apoio e compreensão. Obrigada por terem acreditado em mim.

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

SUMÁRIO

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	xix
LISTA DE TABELAS E QUADROS.....	xxv
LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS.....	xxix
RESUMO	xxxiii
ABSTRACT	xxxvii
1. INTRODUÇÃO.....	41
1.1. O sistema auditivo	41
1.2. Definição e epidemiologia das perdas auditivas.....	44
1.3. Etiologia genética da surdez	48
1.3.1. Genes de conexinas.....	53
1.3.1.1. Gene <i>GJB2</i>	56
1.3.1.2. Gene <i>GJB6</i>	59
1.3.2. Genes mitocondriais.....	60
1.4. Diagnóstico das perdas auditivas.....	63
1.5. Implante coclear.....	68
1.6. Justificativa do estudo.....	70
2. OBJETIVOS.....	73
1.7. Objetivo geral	73
1.8. Objetivos específicos	73
3. METODOLOGIA	77
3.1. Casuística.....	77
3.2. Diagnóstico das perdas auditivas.....	77
3.3. Estudo molecular	79
3.3.1. Extração do DNA genômico de sangue periférico.....	79
3.3.2. Detecção de mutações em genes nucleares	80
3.3.2.1. Triagem da mutação c.35delG no gene da conexina 26 (<i>GJB2</i>)	80
3.3.2.2. Identificação das deleções del(<i>GJB6</i> -D13S1830) e del(<i>GJB6</i> -D13S1854) no gene <i>GJB6</i>	81

3.3.2.3. Amplificação do gene <i>GJB2</i>	82
3.3.2.4. Rastreamento de mutações no gene <i>GJB2</i> por sequenciamento.....	84
3.3.2.4.1. Purificação dos produtos de PCR.....	84
3.3.2.4.2. Reação para sequenciamento	84
3.3.2.4.3. Análise das sequências obtidas	85
3.3.3. Triagem da mutação m.1555A>G no gene mitocondrial <i>MTRNR1</i>	85
3.3.4. Genotipagem utilizando a plataforma TaqMan® OpenArray®.....	86
3.3.4.1. Desenho dos ensaios	88
3.3.4.2. Análise qualitativa e quantitativa das amostras	89
3.3.4.3. Preparo das amostras	90
3.3.4.4. Pipetagem e distribuição das amostras	90
3.3.4.5. Selagem das lâminas.....	91
3.3.4.6. Termociclagem	92
3.3.4.7. Captura e análise dos resultados	92
4. RESULTADOS	95
4.1. Coleta de dados	95
4.2. Ocorrência dos diferentes tipos de perda auditiva	97
4.3. Alterações radiológicas.....	98
4.4. Alterações genéticas	99
4.4.1. Rastreamento da mutação c.35delG no gene <i>GJB2</i>	100
4.4.2. Detecção das deleções del(<i>GJB6</i> -D13S1830) e del(<i>GJB6</i> -D13S1854) no gene <i>GJB6</i>	100
4.4.3. Análise de outras mutações no gene <i>GJB2</i>	101
4.4.3.1. Alteração G>A na posição 79.....	101
4.4.3.2. Alteração T>C na posição 101	102
4.4.3.3. Alteração G>A na posição 109.....	102
4.4.3.4. Alteração G>T na posição 139	103
4.4.3.5. Alteração T>C na posição 269	103
4.4.3.6. Alteração G>A na posição 283.....	104
4.4.3.7. Alteração G>A na posição 457.....	104
4.4.3.8. Alteração A>G na posição 503.....	105

4.4.3.9. Alteração G>A na posição 516.....	105
4.4.3.10. Mutação c.35delG.....	106
4.4.4. Identificação da mutação m.1555A>G no gene mitocondrial <i>MTRNR1</i>	106
4.5. Genotipagem utilizando a plataforma TaqMan® OpenArray®	112
4.6. Etiologia das perdas auditivas	115
4.7. Custo dos exames específicos.....	117
4.8. Rendimento dos exames de imagem e genéticos.....	118
4.9. Protocolo diagnóstico	120
5. DISCUSSÃO.....	125
6. CONCLUSÕES.....	133
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	137
ANEXOS.....	155
ANEXO 1	157
ANEXO 2	159
ANEXO 3	163

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>).42
- 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>).43
- Figura 3.** Representação esquemática da estrutura das conexinas, demonstrando os domínios transmembrânicos (TM1-TM4), extremidades aminoterminal (NH2) e carboxiterminal (COOH), alça intracitoplasmática (IC) e alças extracelulares (EC1 e EC2) (Baseado em: Rabionet *et al.*, 2002).53
- Figura 4.** Modelos ilustrativos das interações entre as conexinas. A= Representação de duas subunidades de conexinas adjacentes, ilustradas em amarelo e verde, com os domínios amino terminal (NT) indicados em vermelho, e os quatro domínios transmembrânicos (TM1-TM4) identificados; B= Representação de seis subunidades de conexinas, ilustradas em diferentes cores, com seus domínios NT em vermelho, formando um hemicanal (Retirado de: Beyer *et al.*, 2011).54
- Figura 5.** Representação esquemática da organização dos canais intercelulares dependendo da combinação de conexinas que compõem os conexons (Modificado de: <<http://mbiocel.wordpress.com/author/mbiocel>>).55
- Figura 6.** Representação esquemática da estrutura do gene *GJB2* (Baseado em: Benson, *et al.* GenBank. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>>).57
- Figura 7.** Algoritmo para a avaliação e manejo de crianças com perda auditiva neurosensorial (Modificado de Preciado *et al.*, 2005).67

Figura 8. Ciclos de amplificação para o estudo das deleções del(<i>GJB6</i> -D13S1830) e del(<i>GJB6</i> -D13S1854).....	82
Figura 9. Ciclos utilizados para a amplificação do gene <i>GJB2</i>	83
Figura 10. Ciclos de amplificação para posterior sequenciamento do gene <i>GJB2</i>	84
Figura 11. Ciclos de amplificação para o estudo da mutação mitocondrial m.1555A>G.....	86
Figura 12. Ilustração esquemática da lâmina de OpenArray® (Retirado de: TaqMan® OpenArray® Genotyping System Manual. Disponível em: Life Technologies website < http://products.invitrogen.com/ivgn/product/4459283 >).	87
Figura 13. Ilustração da plataforma TaqMan® OpenArray® (Retirado de: Life Technologies website. Products & Services. Disponível em: < http://products.invitrogen.com/ivgn/product/4459283 >).	88
Figura 14. Aparelhos utilizados para a análise qualitativa e quantitativa das amostras. A= NanoDrop® 8000 (Thermo Scientific), usado para a verificação da pureza (Retirado de Thermo Scientific website. NanoDrop products. Disponível em: < www.nanodrop.com/Productnd8000overview.aspx?AspxAutoDetectCookieSupport=1 >); B= Qubit® 2.0 Fluorometer (Invitrogen), utilizado para a quantificação das amostras (Retirado de: Life Technologies website. Products & Services. Disponível em: < www.invitrogen.com/site/us/en/home/brands/Product-Brand/Qubit/qubitfluorometer.html >)...	89
Figura 15. Ilustração esquemática da distribuição das amostras na lâmina de OpenArray® (Modificado de: TaqMan® OpenArray® Genotyping System Manual. Disponível em: Life Technologies website < http://products.invitrogen.com/ivgn/product/4459283 >).	91
Figura 16. Termociclador Dual Flat Block GeneAmp® PCR System 9700 da Applied Biosystems, utilizado para a etapa de termociclagem (Retirado de: TaqMan® OpenArray® Genotyping System Manual. Disponível em: Life Technologies website < http://products.invitrogen.com/ivgn/product/4459283 >).	92
Figura 17. Representação gráfica da incidência das perdas auditivas congênitas, progressivas e abruptas.	98

Figura 18. Representação gráfica da incidência das perdas auditivas pós-linguais e pré-linguais.	98
Figura 19. 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 <i>Plus DNA Ladder</i> (Invitrogen); N= Controle homozigoto normal (N/N); HO= Controle homozigoto mutante (35delG/35delG); HE= Controle heterozigoto mutante (35delG/N).....	100
Figura 20. Gel de agarose mostrando os fragmentos gerados pela técnica de PCR- <i>multiplex</i> para a análise das deleções no gene <i>GJB6</i> . L= Marcador de peso molecular 1Kb <i>Plus DNA Ladder</i> (Invitrogen); 1= Controle normal; 2= Controle heterozigoto del(<i>GJB6</i> -D13S1830); 3= Controle homozigoto del(<i>GJB6</i> -D13S1830); 4= Controle heterozigoto para a del(<i>GJB6</i> -D13S1854).....	101
Figura 21. Eletroferograma mostrando em destaque a alteração G>A na posição 79 em heterozigose.....	101
Figura 22. Eletroferograma mostrando em destaque a alteração T>C na posição 101 em heterozigose.....	102
Figura 23. Eletroferograma mostrando em destaque a alteração G>A na posição 109 em heterozigose.....	102
Figura 24. Eletroferograma mostrando em destaque a alteração G>T na posição 139 em heterozigose.....	103
Figura 25. Eletroferograma mostrando em destaque a alteração T>C na posição 269 em heterozigose.....	103
Figura 26. Eletroferograma mostrando em destaque a alteração G>A na posição 283 em heterozigose.....	104
Figura 27. Eletroferograma mostrando em destaque a alteração G>A na posição 457 em heterozigose.....	104
Figura 28. Eletroferograma mostrando em destaque a alteração A>G na posição 503 em heterozigose.....	105
Figura 29. Eletroferograma mostrando em destaque a alteração G>A na posição 516 em heterozigose.....	105

Figura 30. Eletroferogramas mostrando em destaque a presença da mutação c.35delG em homozigose (acima) e em heterozigose (abaixo).	106
Figura 31. Gel de agarose mostrando os fragmentos gerados após a restrição enzimática para análise da mutação m.1555A>G. L= Marcador de peso molecular 1Kb <i>Plus DNA Ladder</i> (Invitrogen); 1= Controle sem digerir; 2= Controle sem a mutação; 3= Controle com a mutação.	107
Figura 32. Imagens geradas após o ensaio de OpenArray®. A= Imagem que mostra o posicionamento da lâmina dentro do OpenArray NT Cyclor®; B= Imagem para a confirmação de que os ensaios foram depositados na lâmina; C= Imagem que mostra a fluorescência VIC® capturada pela leitura; D= Imagem que mostra a fluorescência FAM® capturada pela leitura. .	113
Figura 33. Resultado gerado no software TaqMan® OpenArray® Genotyper após a realização dos ensaios. Em azul estão representados os pacientes homozigotos mutantes, nos quais somente fluoróforo o FAM® foi detectado; em vermelho os homozigotos normais, nos quais só o VIC® foi identificado; e em verde os heterozigotos, nos quais ambos os fluoróforos foram detectados.	114
Figura 34. Esquema ilustrando a investigação da etiologia e diagnóstico das perdas auditivas nos pacientes envolvidos no estudo.	115
Figura 35. Representação gráfica do perfil etiológico das perdas auditivas congênitas, progressivas e abruptas.....	117
Figura 36. Representação gráfica do rendimento diagnóstico do rastreamento genético e dos exames de imagem.	118
Figura 37. Representação gráfica do rendimento diagnóstico do rastreamento genético.	119
Figura 38. Protocolo diagnóstico para a avaliação de indivíduos com perda auditiva neurossensorial severa a profunda bilateral.....	121

LISTA DE TABELAS E QUADROS

LISTA DE TABELAS E QUADROS

Tabela 1. Principais síndromes que apresentam a perda auditiva como sinal clínico (Baseado em Van Camp & Smith. Hereditary Hearing Loss Homepage. Disponível em < http://hereditaryhearingloss.org >).	49
Tabela 2. Genes associados à perda auditiva não-sindrômica (Modificado de Hilgert <i>et al.</i> , 2009a; Baseado em Van Camp & Smith. Hereditary Hearing Loss Homepage. Disponível em < http://hereditaryhearingloss.org >).	51
Tabela 3. Nomenclatura dos genes e das proteínas do grupo das β -conexinas.	56
Tabela 4. Sequências dos <i>primers</i> utilizados na triagem das deleções del(<i>GJB6</i> -D13S1830) e del(<i>GJB6</i> -D13S1854) e tamanho dos fragmentos gerados.	81
Tabela 5. Sequências dos <i>primers</i> utilizados para a amplificação do gene <i>GJB2</i> e tamanho dos fragmentos gerados.....	83
Tabela 6. Dados referentes ao sexo, idade na época em que foi realizado o implante coclear e data da cirurgia dos pacientes analisados.	95
Tabela 7. Alterações encontradas nos exames de imagem dos pacientes analisados.....	99
Tabela 8. Resultados dos testes moleculares realizados nos pacientes e nos parentais. Em destaque estão as alterações genéticas encontradas.	107
Tabela 9. Alterações moleculares identificadas nos pacientes estudados.	110
Tabela 10. Número de pacientes nos quais as alterações moleculares explicaram a causa da perda auditiva, para cada grupo.....	111
Tabela 11. Número de pacientes com histórico familiar de perda auditiva, para cada grupo.....	111
Tabela 12. Alterações genéticas analisadas pela técnica TaqMan® OpenArray® Genotyping.	112
Tabela 13. Perfil etiológico das perdas auditivas.	116

Quadro 1. Fatores ambientais e genéticos envolvidos com a perda auditiva (Modificado de Russo, 2000).....	45
Quadro 2. Resumo das etapas para investigação diagnóstica detalhada das perdas auditivas.....	64

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

AASI	Aparelho de amplificação sonora individual
ADP	Difosfato de adenosina
ATP	Trifosfato de adenosina
cDNA	DNA complementar
Cx	Conexina
dB	Decibel
DNA	Ácido desoxirribonucléico
DNAmt	DNA mitocondrial
ECG	Eletrocardiograma
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
g	Gramma
h	Hora
IRF	Índice de reconhecimento de fala
kb	Kilobase
kDa	Kilodalton
L	<i>Ladder</i>
LRF	Limiar de reconhecimento de fala
M	Massa molar
min	Minuto
mL	Mililitro
mM	Milimolar
ng	Nanograma
OMIM	<i>Online Mendelian Inheritance in Men</i>
OMS	Organização Mundial de Saúde
pb	Par de base
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i> (reação em cadeia da polimerase)
PEATE	Potenciais Evocados Auditivos de Tronco Encefálico
pH	Potencial de hidrogênio iônico

RNA	Ácido ribonucléico
RNA_r	RNA ribossomal
RNA_t	RNA transportador
RNM	Ressonância nuclear magnética
rpm	Rotações por minuto
SNP	<i>Single nucleotide polymorphism</i> (polimorfismo de nucleotídeo único)
<i>Taq</i>	<i>Thermus aquaticus</i> (enzima polimerase)
TBE	Tris, base, ácido bórico, EDTA
TC	Tomografia computadorizada
TE	Tris EDTA
T_m	Temperatura de <i>melting</i> (fusão)
U	Unidade
μL	Microlitro
μg	Micrograma
°C	Graus centígrados

RESUMO

RESUMO

A surdez é considerada a doença sensorial mais prevalente em humanos, causada por uma variedade de fatores ambientais e genéticos. No Brasil, não há dados oficiais referentes à prevalência e à etiologia das deficiências auditivas, mas sabe-se que os fatores ambientais ainda superam os de origem genética. No diagnóstico etiológico da surdez, a realização concomitante de exames laboratoriais, de imagem e genéticos, embora amplie a chance diagnóstica, onera o Sistema de Saúde, devido ao alto custo. Deste modo, o objetivo do presente estudo foi avaliar a eficácia dos exames de imagem e genéticos e seu impacto em Saúde Pública, bem como estabelecer um protocolo diagnóstico, visando maior eficiência e redução de custos na determinação da etiologia das perdas auditivas. Foi realizada a análise de 100 indivíduos com perda auditiva neurossensorial, atendidos no Ambulatório de Otorrinolaringologia do Hospital das Clínicas da UNICAMP, no período de 2002 a 2010, e que foram submetidos ao implante coclear. Uma investigação detalhada foi realizada nos pacientes, incluindo exames de imagem, genéticos e laboratoriais (em casos específicos). Após a realização dos exames específicos, o número de casos com a etiologia não esclarecida foi reduzido de 72 para 42, representando redução de 42%. Alterações radiológicas foram identificadas em 29 pacientes, enquanto alterações moleculares foram encontradas em 31 indivíduos, incluindo a c.35delG, p.V27I, p.M34T, p.V37I, p.E47X, p.L90P, p.V95M, p.K168R, p.W172X no gene *GJB2*, a del(*GJB6*-D13S1830) no gene *GJB6* e a m.1555A>G no gene mitocondrial *MTRNR1*. Os exames de imagem e genéticos contribuíram, respectivamente, para o diagnóstico etiológico de 20% e 19% dos casos analisados. A etiologia não foi esclarecida em 42% dos pacientes, em 25% foi de origem ambiental, 19% genética, e em 14% dos casos decorrente de malformações ou outros problemas na orelha interna. Pôde-se concluir que tanto os exames de imagem quanto os genéticos foram importantes para a identificação da etiologia das perdas auditivas, no entanto, os testes moleculares contribuíram principalmente para o diagnóstico dos pacientes com surdez congênita, enquanto os exames radiológicos tiveram maior contribuição para os casos com perda progressiva ou abrupta. A alta prevalência de mutações no gene *GJB2* foi confirmada, especialmente da mutação c.35delG, nos casos de perda auditiva neurossensorial severa a profunda bilateral. A pesquisa molecular teve importante contribuição no diagnóstico etiológico

da surdez, além de possibilitar o aconselhamento genético e sugerir melhor prognóstico para o implante coclear, como observado em estudos prévios. O TaqMan® OpenArray® Genotyping é uma técnica 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. O protocolo sequencial permite a otimização do diagnóstico etiológico e redução dos custos, ao contrário da realização concomitante de exames de imagem, laboratoriais e genéticos. Por fim, mesmo com uma investigação detalhada, a etiologia desconhecida continuou prevalecendo, o que aponta para a necessidade de estudos moleculares mais aprofundados, para que a real causa possa ser esclarecida.

ABSTRACT

ABSTRACT

Deafness is considered the most prevalent sensory disorder in humans, caused by a variety of environmental and genetics factors. In Brazil, there are no official data regarding the prevalence and etiology of hearing impairment, but it is known that environmental factors are among the major causes. Although a simultaneous testing approach, including clinical exams, audiological, laboratorial, imaging and genetic expands the etiological diagnosis, overloads the healthcare system due to high costs. Thus, the goal of the present study is to evaluate the effectiveness of imaging and genetics tests and their impact on public health, aiming to increase efficiency and reduce costs of the etiological diagnosis of hearing loss. It was conducted an analysis of 100 patients with sensorineural hearing loss, from Department of Otorhinolaryngology of the State University of Campinas (UNICAMP), submitted to cochlear implantation between 2002 and 2010. A detailed investigation was performed in patients, including imaging and genetics analysis. After specific tests, the number of individuals with unknown cause was reduced from 72 to 42 (42% of reduction). Radiologic abnormalities were identified in 29 of the patients, while molecular alterations were found in 31 individuals, including c.35delG, p.V27I, p.M34T, p.V37I, p.E47X, p.L90P, p.V95M, p.K168R, p.W172X in the *GJB2* gene, del(*GJB6*-D13S1830) in the *GJB6* gene and m.1555A>G in the *MTRNR1* mitochondrial gene. Genetic and imaging results contributed to the etiological diagnosis of 19% and 20% of the cases, respectively. The etiology remained unknown in 42% of the patients, was due to environmental factors in 25%, genetics in 19% and inner ear malformations or other defects in 14% of the cases. It was concluded that both imaging and genetic analysis were important to identify the etiology of hearing loss, however, molecular tests contributed mainly for diagnosis of patients with congenital deafness, while radiologic exams had greater contribution for diagnosis of cases with progressive or sudden hearing loss. The high prevalence of mutations in the *GJB2* gene was confirmed, especially the c.35delG mutation, in cases of sensorineural severe to profound bilateral hearing loss. The molecular research had an important contribution to the etiology of deafness, besides providing genetic counseling and a better prognosis for cochlear implantation, as suggested by previous studies. The TaqMan® OpenArray® Genotyping is a promising technique for molecular diagnostic of hearing loss, because it allows the analysis of

many mutations in several patients at once, which implies in a faster diagnosis at a lower cost. The sequential protocol enables an optimization of the etiological diagnosis and cost reduction, as opposed to simultaneously holding imaging, laboratory and genetic tests. Finally, even with a careful investigation, the unknown etiology prevailed as main cause which points to the need of carrying out detailed genetic studies in those cases with idiopathic hearing loss in order to elucidate the diagnosis.

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

1.1. O sistema auditivo

As informações que seguem a respeito do sistema auditivo foram baseadas: na revisão de Dror & Avraham (2009), no capítulo “The Auditory System” da Segunda edição do livro “Neuroscience”, editado por Purves e colaboradores (2001), disponível no *NCBI Bookshelf* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/bookshelf/br.fcgi?book=neurosci>), e na página da internet da Fundação Otorrinolaringologia (FORL).

O sistema da audição é um dos mais complexos do nosso organismo. Ele é responsável por captar as diferentes ondas sonoras e dar início ao processo de percepção e interpretação do som. É composto pela orelha externa, média, interna e nervo auditivo.

Uma mistura de ondas sonoras é constantemente gerada no ambiente e alcança nossas orelhas. Esta rica coleção de sons é misturada e 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.

A orelha é dividida em três compartimentos anatômicos: orelha externa, média e interna (Figura 1). O principal papel da orelha externa é conduzir as ondas sonoras do ambiente para a orelha interna. As ondas sonoras são captadas pelo pavilhão auricular da orelha externa e conduzidas através do canal auditivo até a membrana timpânica. A orelha média é composta por três pequenos ossos (martelo, bigorna e estribo), os ossículos, que são montados em conjunto e servem como um elo entre o tímpano e a janela oval da orelha interna, que é preenchida por fluido. Após o estímulo sonoro, a vibração do tímpano levará ao movimento dos ossículos da orelha média, e posteriormente, dos fluidos da orelha interna, a parte sensorial da orelha. A orelha interna contém os órgãos sensoriais que nos permitem ouvir e que controlam o nosso equilíbrio e orientação espacial. Essas estruturas são: a cóclea, responsável pela audição; o vestíbulo, sensível à gravidade e aceleração; e o saco endolinfático, desprovido de função sensorial.

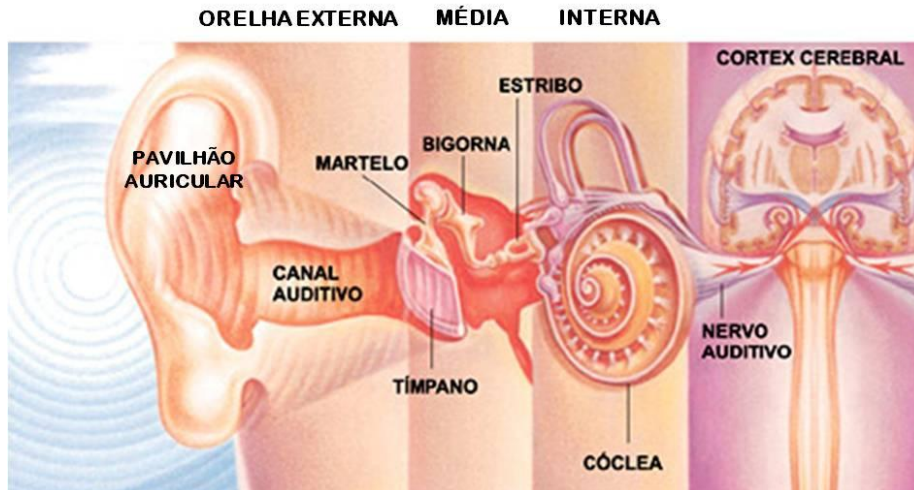


Figura 1. Ilustração esquemática do sistema auditivo, evidenciando as principais partes da orelha externa, média e interna (Modificado de: <http://audiovoxfonoaudiologia.blogspot.com/2010_05_01_archive.html>).

A cóclea é um canal ósseo-membranoso em forma de caracol rodeado pelo osso temporal. É dividido em três compartimentos preenchidos por fluidos: as escalas média, vestibular e timpânica. 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, ou órgão Espiral, que é a porção sensorial propriamente dita do sistema auditivo. Esse órgão, situado na membrana basilar, 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. A Figura 2 traz uma ilustração esquemática da cóclea e detalhe de suas porções, evidenciando a localização das células ciliadas do órgão de Corti e dos estereocílios.

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.

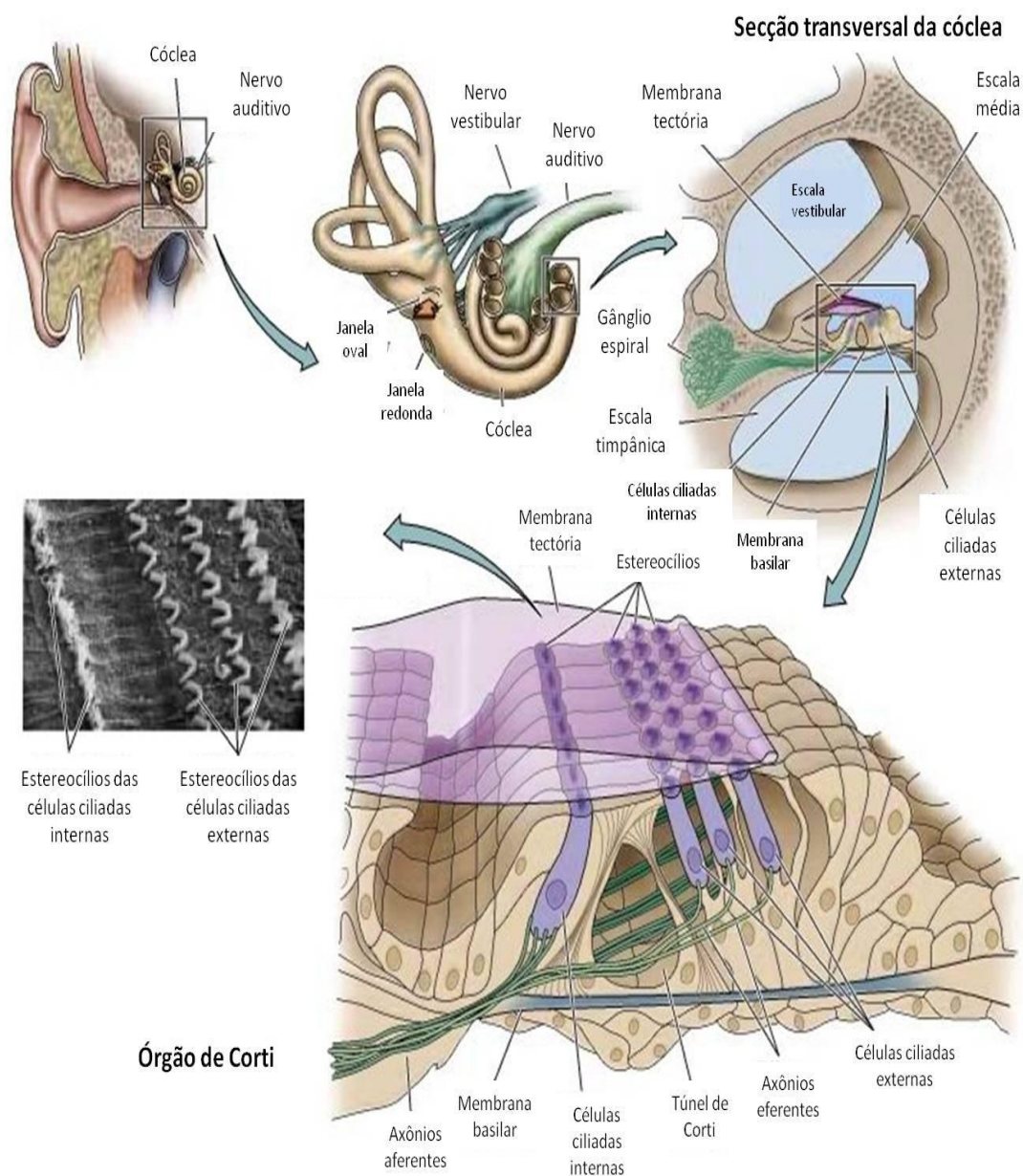


Figura 2. Ilustração esquemática da cóclea vista de frente e em secção transversal. A secção transversal da cóclea mostra a escala média entre as escalas vestibular e timpânica. Em destaque esquema detalhado do órgão de Corti e micrografia dos estereocílios das células ciliadas (Adaptado de: “The inner 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>).

1.2. Definição e epidemiologia das perdas auditivas

De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS), a surdez refere-se à perda total da capacidade auditiva em uma ou nas duas orelhas. Já a deficiência ou perda auditiva, referem-se à perda parcial ou completa da capacidade de ouvir (OMS, 2009).

Os termos surdez, perda auditiva e deficiência auditiva neste trabalho serão adotados para se referir a qualquer comprometimento do sistema auditivo significativo, independentemente do tipo, etiologia, grau e frequência. Essa mesma terminologia pode não se aplicar para outros profissionais, como por exemplo, otorrinolaringologistas e fonoaudiólogos. Entretanto, em publicações científicas sobre genética, esses termos são os mais empregados, já que muitas vezes perdas genéticas com a mesma etiologia exibem gravidade de manifestação muito variável.

A surdez é uma doença extremamente heterogênea, tanto clínica como geneticamente. É considerado o distúrbio sensorial mais prevalente em humanos. Segundo dados da OMS, cerca de 10% da população mundial apresenta algum tipo de problema auditivo.

As deficiências auditivas podem ser classificadas de diferentes formas, como por exemplo, baseada na região afetada da orelha, podendo ser do tipo condutiva, neurossensorial ou mista. A perda condutiva é causada por problemas na orelha média e/ou externa; a neurossensorial é causada por problemas na orelha interna e/ou nervo coclear; e a mista é causada por uma combinação de ambos componentes condutivos e neurossensoriais (Ito *et al.*, 2010).

De acordo com o início da perda auditiva, esta pode ser classificada como congênita, adquirida ou tardia. Se estiver presente ao nascimento ou antes da aquisição da linguagem, a perda auditiva pode ser pré-lingual e, quando se manifesta após a aquisição da linguagem, pós-lingual (Ito *et al.*, 2010).

A surdez pode ainda ser definida de acordo com o seu grau, como leve (de 26 a 40 dB), moderada (de 41 a 70 dB), severa (de 71 a 90 dB) ou profunda (acima de 90 dB) (Davis & Silvermann, 1970). 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.

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 (Finsterer & Fellingner, 2005).

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 (Dror & Avraham, 2009).

A perda auditiva pode ser decorrente de uma série de fatores ambientais e genéticos (Quadro 1). Os fatores ambientais incluem a exposição frequente à alta intensidade do som, trauma acústico, infecções, drogas ototóxicas, entre outros, enquanto os fatores genéticos são causados por mutações em diferentes genes ou em elementos regulatórios que estão envolvidos no desenvolvimento adequado, na estrutura e na função da orelha (Dror & Avraham, 2009).

Quadro 1. Fatores ambientais e genéticos envolvidos com a perda auditiva (Modificado de Russo, 2000).

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

Nos países em desenvolvimento, ainda há maior prevalência dos fatores ambientais como causa das perdas auditivas. As infecções pré-natais como rubéola, meningite, toxoplasmose,

citomegalovirose, 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 riscos 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 (Bauman, 2003; Davis *et al.*, 2003; OMS, 2009).

A maioria das mutações genéticas conhecidas que afetam componentes da orelha interna levam a perdas auditivas neurossensoriais, enquanto um menor número está associado a perdas auditivas condutivas (Dror & Avraham, 2009).

Mais de 400 síndromes descritas têm a perda auditiva como uma de suas manifestações clínicas. Algumas das síndromes mais frequentes são: a síndrome de Pendred (OMIM #274600), associada à alteração tireoidiana; a síndrome de Usher (OMIM #276900), relacionada à retinose pigmentar; e a síndrome de Waardenburg (OMIM #193500), associada a defeitos de pigmentação e telecantho (Shaukat *et al.*, 2003; Hilgert *et al.*, 2009b; Yang *et al.*, 2010).

Surpreendentemente, estudos têm mostrado que um mesmo gene pode estar relacionado tanto com a perda auditiva sindrômica quanto não-sindrômica, ou mesmo envolvido em diferentes padrões de herança, dominante ou recessivo (Ammar-Khodja *et al.*, 2009; Dror & Avraham, 2009).

Dados estatísticos internacionais mostram que 1 em cada 1000 recém-nascidos sofre de perda auditiva profunda, e outro apresentará alguma deficiência auditiva antes da idade adulta (Tekin *et al.*, 2001; Schrijver, 2004). No Brasil, a frequência é estimada em 4 a cada 1000 nascimentos (Piatto & Maniglia, 2001). No entanto, essa frequência varia, dependendo da amostra e da região estudada, podendo a surdez estar presente em 2 a 7 para cada 1000 recém-nascidos (Simões & Maciel-Guerra, 1992; Russo, 2000).

Além disso, a surdez pode surgir com o passar da idade. 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 relacionada à idade, também conhecida como presbiacusia (Dror & Avraham, 2009).

Inúmeras perdas auditivas têm como causa malformações tanto na orelha média como na orelha interna. Estima-se que mais de 25% das perdas auditivas congênitas cursam com alterações morfológicas da orelha interna (Castiquini *et al.*, 2006).

O aqueduto vestibular é um canal ósseo estreito que se abre sobre a superfície medial do osso temporal e passa para o vestíbulo da orelha interna. Um tubo membranoso, chamado ducto endolinfático, atravessa o aqueduto vestibular até o saco endolinfático na superfície posterior da porção petrosa do osso temporal, onde entra em contato com a dura-máter. Valvassori e Clemis (1978) descreveram pela primeira vez uma síndrome onde ocorre o alargamento do aqueduto vestibular, sendo caracterizada pela presença de ducto e saco endolinfático muito maiores do que o normal. O aqueduto vestibular alargado é a malformação mais comum da orelha interna associada à perda auditiva (Pinto *et al.*, 2005; Preciado *et al.*, 2005; Silva *et al.*, 2008; Wu *et al.*, 2008).

Adicionalmente, estudos apontam que mutações em alguns genes estão associadas à perda auditiva induzida por ruído, aumentando o risco de indivíduos afetados perderem a sua audição no âmbito da exposição a sons de alta intensidade (Konings *et al.*, 2009).

Diversos trabalhos internacionais têm mostrado a prevalência e a etiologia das perdas auditivas na infância (Pascolini & Smith, 2008; Ardle & Bitner-Glindzicz, 2010; Ito *et al.*, 2010). Porém, estima-se que de 20 a 40% destas tenham origem desconhecida. Há grande dificuldade, em especial nos países subdesenvolvidos, para estabelecer tais dados, principalmente, devido a diferenças epidemiológicas e desinformação da população (Cruz *et al.*, 2009).

No Brasil, não há dados oficiais referentes à prevalência e à etiologia das deficiências auditivas. Os estudos são escassos e, quando realizados, seguem metodologias distintas, o que dificulta a comparação dos dados.

Alguns trabalhos, utilizando diferentes metodologias, encontraram valores de prevalências que variaram de 5 a 6,8%, dependendo da região do país estudada (Ribeiro & Pinheiro, 2004; Béria *et al.*, 2007; Cruz *et al.*, 2009).

Quanto à etiologia, acredita-se que 16% dos casos de surdez sejam de origem genética, sendo que em 70% dos casos a surdez é não-sindrômica. Em 80% das perdas auditivas não-sindrômicas a herança é autossômica recessiva, em 10 a 20% autossômica dominante, em 2 a 3% ligada ao cromossomo X e em 1% é de herança materna (Godinho *et al.*, 2003).

Em nosso país, os fatores ambientais ainda superam os de origem genética e, além disso, um grande número de casos é tido como idiopático (Pupo *et al.*, 2008). Estudos mostram que a etiologia não é esclarecida em 32 a 40% dos indivíduos brasileiros com perda auditiva (Pupo *et al.*, 2008; Calháu *et al.*, 2011). A alta prevalência da etiologia desconhecida aponta para a necessidade de aprofundamento no diagnóstico, dispondo também de estudos genéticos, de imagem e laboratoriais.

À medida que vêm sendo implantadas melhorias no setor de saúde, e com o avanço e o aprofundamento nos estudos genéticos relacionados às perdas auditivas, a proporção de causas genéticas tende a aumentar.

1.3. Etiologia genética da surdez

Nos últimos anos houve avanços significativos na pesquisa sobre as bases moleculares do sistema auditivo, permitindo a identificação e caracterização de vários genes e proteínas relacionados à audição. O conhecimento cada vez maior sobre esses genes contribui não só para 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 (Stover & Diensthuber, 2011).

Um dos maiores empecilhos na localização de genes envolvidos na deficiência auditiva é a dificuldade de acesso à cóclea e às demais estruturas da orelha interna. A construção de um banco de cDNA de material coclear fetal possibilitou o endereçamento de genes candidatos por abordagem tecido-específica (Robertson *et al.*, 1994; Wilcox & Fex, 1992). O grande número de genes expressos na cóclea reflete a complexidade dos mecanismos moleculares envolvidos neste órgão de intrincada natureza (Heller *et al.*, 1998).

As funções dos genes envolvidos com a audição são diversificadas e a lista 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 (Finsterer & Fellingner, 2005; Friedman *et al.*, 2007).

Estima-se que de 300 a 500 genes estejam envolvidos no mecanismo da audição. Dada a complexidade fisiológica da audição, não é de se espantar o grande número de genes relacionados e o fato da surdez exibir uma grande heterogeneidade genética (Finsterer & Fellingner, 2005).

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, dominante ou recessivo, ou ainda estar envolvido tanto com surdez síndrômica quanto não-síndrômica (Friedman *et al.*, 2007).

Apesar de existirem mais de 400 síndromes descritas que incluem a surdez como uma de suas manifestações clínicas, apenas 30% dos casos de perda auditiva hereditária são síndrômicos (Hilgert *et al.*, 2009b). Até o momento já foram identificados pelo menos 35 genes associados a esse padrão. A seguir estão destacadas as principais síndromes que apresentam a surdez como sinal clínico (Tabela 1).

Tabela 1. Principais síndromes que apresentam a perda auditiva como sinal clínico (Baseado em Van Camp & Smith. Hereditary Hearing Loss Homepage. Disponível em <<http://hereditaryhearingloss.org>>).

Síndrome	Gene	Loco	Localização cromossômica
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>SIX1</i>	BOS3	14q21.3-q24.3
Jervell e Lange-Nielsen	<i>KCNQ1</i>	JLNS1	11p15.5
	<i>KCNE1</i>	JLNS2	21q22.1-q22.2
Pendred	<i>SLC26A4</i>	PDS	7q21-34
	<i>FOXI1</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	5q32-q33.1
Doença de Norrie	<i>NDP</i>	NDP	Xp11.3
CHARGE	<i>SEMA3E</i>	-	7q21.11
	<i>CHD7</i>	-	19q13.3

CHARGE: *Coloboma, heart, atresia, retardation, genital anomaly and ear anomaly.*

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

A maioria dos casos de perda auditiva hereditária é não-sindrômica, aproximadamente 70% (Hilgert *et al.*, 2009b). Os diferentes locos ou regiões candidatas a apresentarem genes associados à surdez não-sindrômica recebem o prefixo DFN (do inglês *deafness*), seguido de um número que indica a ordem em que foram descobertos. As mutações genéticas conhecidas que levam à surdez podem ser de herança autossômica recessiva (DFNB), autossômica dominante (DFNA), ligada ao X (DFNX) ou mitocondrial (Dror & Avraham, 2009).

Em relação aos mecanismos de herança, estima-se que aproximadamente 75 a 80% dos casos de surdez genética não-sindrômica sejam 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% (Kokotas *et al.*, 2007; Hilgert *et al.*, 2009b; Smith *et al.*, 2010).

A heterogeneidade genética da perda auditiva não-sindrômica é extremamente elevada. Até o momento, foram mapeados quase 150 locos e mais de 60 genes já foram identificados (Van Camp & Smith. Hereditary Hearing Loss Homepage. Disponível em <<http://hereditaryhearingloss.org>>). A Tabela 2 lista os 62 genes já descritos relacionados à surdez não-sindrômica. Para cada gene é mencionado o loco e a função de seus produtos no processo da audição. Além disso, a tabela está dividida de acordo com o modo de herança: autossômico recessivo, autossômico dominante, ligado ao cromossomo X e mitocondrial.

Tabela 2. Genes associados à perda auditiva não-sindrômica (Modificado de Hilgert *et al.*, 2009a; Baseado em Van Camp & Smith. Hereditary Hearing Loss Homepage. Disponível em <<http://hereditaryhearingloss.org>>).

Herança autossômica recessiva ou dominante		
Gene	Loco	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	Loco	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>PJKK</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

Herança autossômica recessiva (continuação)		
<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 protéico dos estereocílios
<i>USH1C</i>	DFNB18	Proteína do arcabouço protéico 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>ILDR1</i>	DFNB42	Desconhecida
<i>GIPC3</i>	DFNB15/72/95	Feixe de estereocílios
Herança autossômica dominante		
Gene	Loco	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	Loco	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	Loco	Função do produto na audição
<i>MT-RNR1</i>	12S RNAr	RNA ribossômico mitocondrial
<i>MT-TS1</i>	RNAtSer(UCN)	RNA transportador mitocondrial

1.3.1. Genes de conexinas

As conexinas (Cx) são proteínas transmembrânicas envolvidas nas *gap junctions* ou junções comunicantes. Elas compartilham uma homologia comum, apresentando quatro domínios α -hélice transmembrânicos, domínios citoplasmáticos que incluem as extremidades aminoterminal, carboxiterminal e a alça entre o segundo e o terceiro domínio transmembrânico, e duas alças extracelulares (Beyer, 1993). A Figura 3 mostra um esquema que representa a estrutura das conexinas.

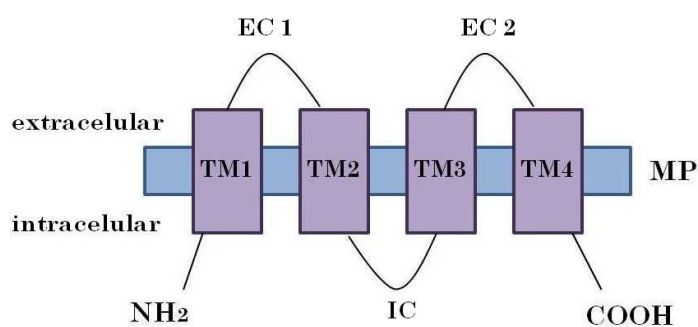


Figura 3. Representação esquemática da estrutura das conexinas, demonstrando os domínios transmembrânicos (TM1-TM4), extremidades aminoterminal (NH₂) e carboxiterminal (COOH), alça intracitoplasmática (IC) e alças extracelulares (EC1 e EC2) (Baseado em: Rabionet *et al.*, 2002).

Seis moléculas de conexinas formam um hemicanal chamado connexon (Rabionet *et al.*, 2002). A Figura 4, a seguir, traz modelos que demonstram a estrutura e as interações entre as conexinas (Beyer *et al.*, 2011).

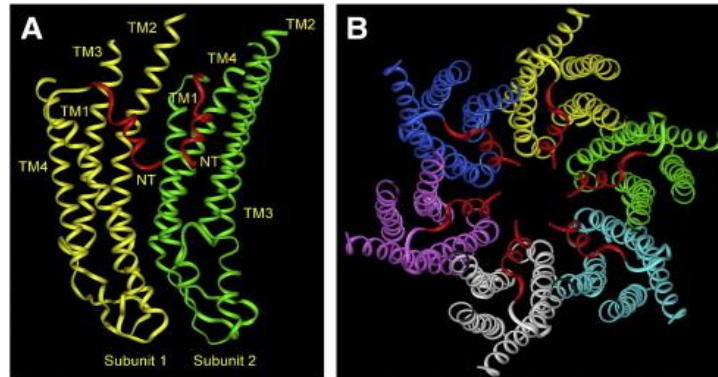


Figura 4. Modelos ilustrativos das interações entre as conexinas. A= Representação de duas subunidades de conexinas adjacentes, ilustradas em amarelo e verde, com os domínios amino terminal (NT) indicados em vermelho, e os quatro domínios transmembrânicos (TM1-TM4) identificados; B= Representação de seis subunidades de conexinas, ilustradas em diferentes cores, com seus domínios NT em vermelho, formando um hemicanal (Retirado de: Beyer *et al.*, 2011).

Os connexons de células adjacentes se unem covalentemente para formar os canais intercelulares que constituem as *gap junctions*. Os connexons podem ser compostos por conexinas de somente um tipo, chamados homoméricos, ou de diferentes tipos, conhecidos como heteroméricos. Da mesma forma, os canais intercelulares podem ser homotípicos ou heterotípicos (Hilgert *et al.*, 2009b) (Figura 5).



Figura 5. Representação esquemática da organização dos canais intercelulares dependendo da combinação de conexinas que compõem os conexons (Modificado de: <<http://mbiocel.wordpress.com/author/mbiocel>>).

As *gap junctions* são regiões de contato entre as células, que estão amplamente distribuídas entre os diferentes tecidos. Elas são muito importantes na comunicação celular, pois permitem a passagem direta de íons e pequenas moléculas entre o citoplasma das células. Consistem de agregados de dezenas a milhares de conexons, formando canais hidrofílicos que conectam as células vizinhas. A abertura dos canais parece ser regulada por vários fatores, tais como fosforilação, voltagem, acidificação, entre outros (Rabionet *et al.*, 2002).

As *gap junctions* estão abundantemente presentes na cóclea e permitem a difusão de pequenas moléculas entre as células adjacentes. Dois sistemas distintos de *gap junctions* cocleares têm sido descritos: o sistema celular epitelial e o sistema do tecido conjuntivo. Acredita-se que, juntas, essas redes estejam envolvidas no acoplamento elétrico e metabólico da célula (Couloigner *et al.*, 2006).

Como os íons potássio entram nas células ciliadas em resposta a estímulos acústicos, ocorre uma onda de despolarização que causa o influxo de íons cálcio e a liberação de neurotransmissores. O acoplamento elétrico facilita a homeostase, em parte, pelo transporte de íons potássio através das *gap junctions* e canais de potássio (Couloigner *et al.*, 2006). Além disso, essas junções também estão envolvidas no acoplamento metabólico (Beltramello *et al.*, 2005).

A primeira conexina foi clonada em 1986 (Kumar & Gilula, 1986; Paul, 1986). Em termos evolucionários, as conexinas podem ser classificadas em pelo menos três subclasses – α , β ou γ – de acordo com o peso molecular ou homologia. Entretanto, a nomenclatura correntemente utilizada faz referência ao tamanho da proteína predita (em kDa) a partir da sequência do cDNA

considerado, precedida do termo genérico Cx (Beyer *et al.*, 1987; Beyer, 1993). Atualmente mais de 20 conexinas já foram identificadas em mamíferos.

A maioria dos genes que codificam essas proteínas é encontrada em *clusters*, ou agrupamentos, assim como o formado pelos genes *GJB2*, *GJB6* e *GJA3*, no cromossomo 13. As principais β -conexinas conhecidas nos humanos são: Cx26, Cx30, Cx31 e Cx32 (Rabionet *et al.*, 2002). A tabela a seguir (Tabela 3) apresenta a nomenclatura dessas proteínas e de seus respectivos genes.

Tabela 3. Nomenclatura dos genes e das proteínas do grupo das β -conexinas.

Genes		Proteínas	
<i>GJB1</i>	<i>Gap junction beta 1</i>	Cx32	Conexina 32
<i>GJB2</i>	<i>Gap junction beta 2</i>	Cx26	Conexina 26
<i>GJB3</i>	<i>Gap junction beta 3</i>	Cx31	Conexina 31
<i>GJB6</i>	<i>Gap junction beta 6</i>	Cx30	Conexina 30

As Cx26 e Cx30 são as isoformas predominantemente expressas nas células de suporte cocleares, e estão presentes tanto nas redes de *gap junctions* do tecido epitelial quanto do tecido conjuntivo (Hilgert *et al.*, 2009b).

Mutações em diferentes genes que codificam proteínas conexinas podem causar perda auditiva de herança autossômica recessiva (*GJB2* e *GJB3*), autossômica dominante (*GJB2*, *GJB3* e *GJB6*) ou mesmo ligada ao cromossomo X (*GJB1*). Além disso, são responsáveis tanto por surdez síndrômica quanto não-síndrômica (Rabionet *et al.*, 2000).

1.3.1.1. Gene *GJB2*

O gene *GJB2* (GenBank 2706, OMIM #121011) codifica a proteína Cx26 e está localizado na região cromossômica 13q11-12, no loco DFNB1. Este loco foi mapeado em 1994, sendo o primeiro loco não mitocondrial relacionado à surdez de herança autossômica recessiva

(Guilford *et al.*, 1994). O gene *GJB2* foi clonado, em 1997, o que representou um marco importante nos estudos genéticos relacionados à surdez (Kelsell *et al.*, 1997). Este foi o primeiro gene nuclear associado à perda auditiva não-sindrômica (Guilford *et al.*, 1994; Kelsell *et al.*, 1997).

Inicialmente não se imaginava o seu grau de envolvimento na origem dos casos de perda auditiva hereditária, principalmente aqueles com padrão de herança autossômico recessivo. Hoje, porém, sabe-se que está envolvido em mais de 50% dos casos onde se observa esse padrão de herança, e que mutações nesse gene também podem determinar perda auditiva herdada de modo dominante (Denoyelle *et al.*, 1997; Smith *et al.*, 2010).

A proteína Cx26 se expressa na cóclea, e está associada à comunicação celular (*gap junctions*), formando canais que medeiam a passagem de pequenas moléculas e íons entre membranas celulares, permitindo, por exemplo, a reciclagem de íons potássio nos fluidos cocleares. Mutações nesse gene podem alterar a função da Cx26 ao acarretar deficiência no fluxo de íons potássio, o que pode levar à morte celular e consequentemente à surdez, uma vez que níveis elevados de potássio podem afetar a função e a sobrevivência das células de suporte necessárias à audição (Rabionet *et al.*, 2000; Finsterer & Fellingner, 2005).

O gene *GJB2* apresenta 5513 pb e possui dois éxons, porém somente o segundo éxon contém a região codificante, sendo o primeiro não-codificante (Rabionet *et al.*, 2002). A Figura 6 traz uma representação esquemática da estrutura do gene da Cx26.

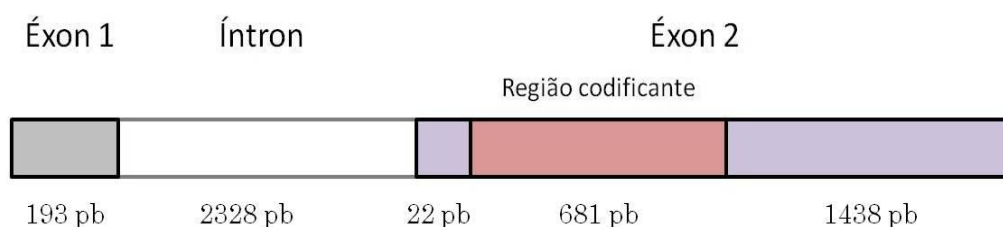


Figura 6. Representação esquemática da estrutura do gene *GJB2* (Baseado em: Benson, *et al.* GenBank. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>>).

Mutações no gene *GJB2* são as principais causas de perda auditiva autossômica recessiva ou esporádica. Elas estão envolvidas em 20% de todos os casos de surdez congênita (Lustig *et al.*,

2004; Finsterer & Fellingner, 2005). Além disso, o gene da Cx26 também apresenta outras mutações menos frequentes que determinam uma forma autossômica dominante (DFNA3) de perda auditiva (Denoyelle *et al.*, 1998; Morlé *et al.*, 2000; Löffler *et al.*, 2001).

Cerca de 310 mutações já foram descritas no gene *GJB2*, das quais algumas são bastante frequentes e outras são raras (Krawczak & Cooper. Human Gene Mutation Database. Disponível em: <www.hgmd.org>).

Uma mutação específica, a c.35delG, está envolvida em 70% dos casos com herança autossômica recessiva, na população caucasiana (Wilcox *et al.*, 2000). Esta mutação, que ocorre no primeiro domínio intracitoplasmático (IC1) da proteína Cx26, refere-se à 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*). Com isso, 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 (Cohn *et al.*, 1999; Zelante *et al.*, 1997; Denoyelle *et al.*, 1997; Carrasquillo *et al.*, 1997; Gasparini *et al.*, 2000; Sobe *et al.*, 2000).

A mutação c.35delG no gene da Cx26 não é rara, pelo contrário, sua presença em heterozigose pode ser encontrada em até 4% dos indivíduos em algumas populações (Gasparini *et al.*, 2000; Roux *et al.*, 2004). 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*” (Kelley *et al.*, 1998). Entretanto, estudos posteriores sugeriram que a mutação c.35delG ocorreu uma única vez em um cromossomo que carregava essa alteração, por meio de único evento mutacional em um cromossomo fundador. Neste caso, a alta frequência de indivíduos com essa mutação sugere efeito fundador e não “*hot spot*” (Van Laer *et al.*, 2001; Rothrock *et al.*, 2003).

A pesquisa dessa mutação em 620 recém-nascidos de uma cidade do interior do Estado de São Paulo revelou a presença de 6 heterozigotos, o que permitiu estimar uma frequência de aproximadamente 1:100 (Sartorato *et al.*, 2000). Outro estudo mostrou que a mutação c.35delG é a mais frequente entre os deficientes auditivos brasileiros, no qual em uma amostra de 36 pacientes com perda auditiva não esclarecida, 22% eram portadores dessa mutação (Oliveira *et al.*, 2002).

Em outro estudo, Oliveira e colaboradores (2004) determinaram a frequência da mutação c.35delG em uma amostra brasileira bem caracterizada, sendo encontrada em 1:100 afrobrasileiros, 1:50 brasileiros caucasianos e ausente em brasileiros com descendência asiática.

A frequência dos alelos mutados no gene *GJB2* que causam surdez autossômica recessiva na população geral é de aproximadamente 1 em 33, em alguns países europeus (Van Camp & Smith, 2009). Dependendo da população há o predomínio de diferentes mutações: a c.167delT é predominante na população de judeus Askenazitas (Morell *et al.*, 1998; Lerer *et al.*, 2000), a c.35delG em descendentes de caucasianos (Zelante *et al.*, 1997; Gasparini *et al.*, 2000; Roux *et al.*, 2004), a c.235delC na população asiática (Fuse *et al.*, 1999; Abe *et al.*, 2000; Liu *et al.*, 2002) e a p.R143W nos africanos (Brobby *et al.*, 1998; Hamelmann *et al.*, 2001).

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 (Snoeckx *et al.*, 2005).

Tendo em vista a importância e o envolvimento desse gene na deficiência auditiva, mutações no gene da Cx26 são alvo de intenso estudo molecular e constituem o primeiro passo na triagem de mutações relacionadas à perda auditiva.

1.3.1.2. Gene *GJB6*

O gene *GJB6* (GenBank 10804, OMIM #604418) codifica a proteína Cx30, e está localizado no loco DFNB1, a 35 kb do gene *GJB2* em direção ao telômero.

Dentre os indivíduos portadores de mutações no gene *GJB2*, aproximadamente 10 a 40% apresentam-nas em apenas um dos alelos (Wilcox *et al.*, 2000). Desta forma, pesquisadores espanhóis buscaram justificativas em outro gene, da Cx30 (*GJB6*), encontrando duas deleções situadas no cromossomo 13, que se estendiam da região proximal do gene *GJB2* ao gene *GJB6*. Essas deleções foram denominadas del(*GJB6*-D13S1830) e del(*GJB6*-D13S1854), e referem-se à perda de 342 kb e 232 kb, respectivamente (Del Castillo *et al.*, 2002; Del Castillo *et al.*, 2005).

Na Espanha, em indivíduos heterozigotos para mutações no gene da Cx26, 50% dos casos apresentam a del(*GJB6*-D13S1830) e 25% dos casos apresentam a del(*GJB6*-D13S1854). Ainda não está esclarecido se estes casos, que apresentam ambas as alterações, seriam um padrão

complexo de herança digênica ou se haveria inativação do gene *GJB2* pela deleção de elementos regulatórios próximos a este gene (Del Castillo *et al.*, 2002; Del Castillo *et al.*, 2005).

No Brasil, um estudo multicêntrico em colaboração com o grupo espanhol, revelou que a del(*GJB6*-D13S1830) foi encontrada em 25,5% dos pacientes heterozigotos para mutações no gene da Cx26, e a del(*GJB6*-D13S1854) em 6,3% (Del Castillo *et al.*, 2003; Del Castillo *et al.*, 2005).

Existe ainda um caso descrito de um paciente portador de uma grande deleção de pelo menos 920 kb que removeu os genes *GJB2* e *GJB6* (Feldmann *et al.*, 2009). Porém, uma porcentagem significativa de indivíduos heterozigotos para mutações no gene da Cx26 não possui nenhuma dessas grandes deleções, o que sugerem que devem existir outras mutações não identificadas presentes no loco DFNB1 (Hilgert *et al.*, 2009a).

Mais recentemente, foi descrita uma nova deleção, de 131,4 kb, no loco DFNB1, que evidencia a existência de uma região regulatória que controla a expressão dos genes *GJB2* e *GJB6*. A deleção cujo ponto de quebra dista mais de 100 kb dos genes *GJB2* e *GJB6*, foi encontrada em 4 indivíduos heterozigotos para a mutação c.35delG e que apresentavam expressão reduzida do RNAm de ambos os genes (Wilch *et al.*, 2010).

Outra deleção com tamanho em torno de 200 kb em DFNB1, que não envolve nem *GJB2* e nem *GJB6*, foi encontrada em pacientes heterozigotos para a mutação c.35delG, sugerindo que essas deleções estejam eliminando um elemento regulatório essencial à expressão de *GJB2* na orelha interna (Del Castillo *et al.*, 2009).

Portanto, a pesquisa das deleções em *GJB6* está indicada principalmente em pacientes com perda auditiva que apresentam uma única mutação no gene *GJB2*.

1.3.2. Genes mitocondriais

Mutações genéticas associadas à perda auditiva podem ocorrer tanto em genes nucleares quanto mitocondriais, localizados nas mitocôndrias.

As mitocôndrias são organelas citoplasmáticas encontradas em todas as células dos mamíferos, e que têm a função de transformar a energia química dos metabólitos em energia facilmente acessível à célula. Essa energia é acumulada, principalmente, em componentes como o

trifosfato de adenosina (ATP), que será utilizado quando a célula necessitar de energia para trabalho osmótico, mecânico, elétrico ou químico (Alberts *et al.*, 2002).

Há a hipótese de a mitocôndria ter se originado como um simbiote de células procariontes há aproximadamente 1,5 a 2 bilhões de anos (Wallace *et al.*, 1999), e consequentemente possuir a molécula de DNA diferente, autônoma e independente do DNA nuclear.

Essas organelas são partículas esféricas e alongadas, medindo de 0,5 a 1 micron de largura e até 10 micra do comprimento. Na microscopia eletrônica apresentam duas membranas – uma externa, lisa, e outra interna, com invaginações – formando as cristas mitocondriais. Cada célula contém de 2 a 100 mitocôndrias, que tendem a se acumular em locais do citoplasma onde existe intensa atividade metabólica, como por exemplo, o pólo apical das células ciliadas (Maillet, 2003).

Além de serem responsáveis pela síntese de ATP através da fosforilação oxidativa, também estão envolvidas em outras funções celulares como a apoptose e o controle do estresse oxidativo. Apresentam seu próprio DNA, o DNAm, responsável pela codificação de proteínas da cadeia respiratória mitocondrial e de componentes do complexo de síntese protéico (Xin Guan, 2004).

O DNAm foi descoberto em 1966 (Nass, 1966; Sinclair & Stevens, 1966; Van Breggen, 1966), sendo totalmente sequenciado em 1981 (Anderson *et al.*, 1981). Possui uma estrutura circular fechada, com 16.569 pb e 37 genes, sendo 13 genes de RNAm, 2 de RNAr e 22 de RNAt, específicos desta organela. O DNAm apresenta suas próprias características: é circular; semi-autônomo, isto é, possui sistema independente de replicação, transcrição e tradução do seu genoma, mas o mecanismo de reparo é dependente do DNA nuclear; e possui herança materna, porque as mitocôndrias presentes no espermatozóide estão localizadas na cauda deste, que não penetra no óvulo durante a fecundação (Howell *et al.*, 2000; Alberts *et al.*, 2002).

Ao contrário do DNA nuclear, o DNAm não interage com histonas, apresentando assim maior instabilidade devido à falta de proteção, função desempenhada por estas proteínas. Além disso, está constantemente exposto a radicais livres devido à proximidade com a cadeia respiratória, e não possui um sistema de reparo próprio. Acredita-se que seja em decorrência desses fatores que a taxa de mutação do DNAm é maior do que no DNA nuclear (Brianti, 2003).

Como as mitocôndrias têm a função de disponibilizar energia para as células sob a forma de ATP, os órgãos que requerem grande quantidade de energia são os mais comumente acometidos por mutações no DNAm, como as células nervosas, musculares, endócrinas, ópticas e auditivas. Essas mutações geralmente não ocasionam malformações, mas sim alterações funcionais nas células afetadas (Maillet, 2003).

Mutações em genes mitocondriais causam um amplo espectro de doenças genéticas, entretanto, um subconjunto de mutações só causa anormalidades na cóclea, podendo levar à perda auditiva não-sindrômica. Como a cóclea é um órgão com grande consumo de energia, mutações no DNAm das células ciliadas podem ocasionar deficiência auditiva do tipo neurossensorial progressiva bilateral, com variações no grau e na idade da manifestação (Wallace, 1992; Kokotas *et al.*, 2007).

A primeira alteração genética associada à perda auditiva hereditária não-sindrômica foi descrita em 1993 e era uma mutação mitocondrial (Fishel-Ghodsian *et al.*, 1993). Desde então várias alterações no DNAm foram identificadas, associadas tanto à surdez sindrômica quanto não-sindrômica (Finsterer & Fellingner, 2005).

Mutações mitocondriais podem ser herdadas ou adquiridas. O MITOMAP (<http://www.mitomap.org>) é uma base de dados do genoma mitocondrial humano, criada recentemente, que dá uma visão geral da maioria das mutações identificadas até o momento.

Algumas mutações são associadas à perda auditiva não-sindrômica, estando envolvidas em pelo menos 1% das crianças com surdez pré-lingual e em pelo menos 5% dos casos pós-linguais em caucasianos (Kokotas *et al.*, 2007).

O gene *MTRNR1*, que codifica a subunidade 12S do RNA ribossômico (RNAr), e o *MTTS1*, que codifica RNAs transportadores de serina (RNAtSer(UCN)), são os principais genes associados à perda auditiva não-sindrômica de herança mitocondrial. Ambos são importantes para a síntese de proteínas mitocondriais (Kokotas *et al.*, 2007).

A primeira mutação mitocondrial a ser associada à surdez não-sindrômica foi a m.1555A>G no gene *MTRNR1*, descrita em uma grande família árabe-israelense. Trata-se da substituição de uma adenina por uma guanina na posição 1555 do gene (Prezant *et al.*, 1993).

Essa mutação também está associada à susceptibilidade à perda auditiva induzida por aminoglicosídeos, devido à semelhança entre a subunidade 12S do RNAr humano que apresenta a mutação e seu homólogo, a subunidade 16S do RNAr bacteriano, o alvo destes antibióticos

(Prezant *et al.*, 1993; Lu *et al.*, 2010). A frequência da m.1555A>G foi estimada em 2% na população brasileira (Abreu-Silva *et al.*, 2006).

Outras mutações mitocondriais frequentes também estão associadas à perda auditiva não-sindrômica: m.961delTinsC(n), m.1095T>C, m.1494C>T no gene *MTRNR1*, e m.7445A>G, m.7472insC, m.7510T>C e m.7511T>C no gene *MTTS1* (Kokotas *et al.*, 2007).

Nos indivíduos que apresentam mutações em genes mitocondriais, os fenótipos clínicos podem variar consideravelmente, o que pode ocorrer de acordo com o número de mitocôndrias contendo mutações, que pode ser diferente dependendo do tecido do corpo (heteroplasmia) (Kobayashi *et al.*, 2005; Zu-jian *et al.*, 2009).

Estudos morfológicos, bioquímicos e moleculares demonstram que a fosforilação oxidativa normalmente declina com a idade. Além disso, deleções no DNAm têm sido encontradas em uma variedade de tecidos humanos, com idade avançada, e em tecidos de pacientes com doenças degenerativas. É fato que a perda auditiva, com o avançar da idade, está associada a mutações mitocondriais (Fishel-Ghodsian *et al.*, 1997; Pickles, 2004).

1.4. Diagnóstico das perdas auditivas

A triagem auditiva neonatal universal tem sido recomendada como principal estratégia para diminuir a idade em que o diagnóstico da perda auditiva é realizado (JCIH, 2000; Lima & Collela-Santos, 2009).

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 (Godinho *et al.*, 2006).

Além disso, o diagnóstico tardio da surdez dificulta ainda mais a determinação da sua etiologia.

Frente a um indivíduo com perda auditiva, há a necessidade de história e exame físico minuciosos, porém, o médico otorrinolaringologista nem sempre será capaz de identificar a causa

da perda auditiva, em especial em nosso meio, pela diversidade epidemiológica e falta de informação da população. Assim, deve-se dispor de um grande arsenal para o diagnóstico, abrangendo, além da avaliação clínica e audiológica, também exames laboratoriais, de imagem e genéticos. O quadro abaixo (Quadro 2) mostra as etapas que devem ser seguidas para investigação diagnóstica detalhada das perdas auditivas.

Quadro 2. Resumo das etapas para investigação diagnóstica detalhada das perdas auditivas.

I) Avaliação audiológica

- a) Audiometria tonal
- b) PEATE ou BERA (do inglês *brainstem evoked response audiometry*)
- c) Emissões otoacústicas
- d) Timpanometria

II) Investigação geral

- a) Exames laboratoriais e genéticos (conexina 26)
- b) Exame clínico/genético (síndromes)
- c) Exames de imagem (tomografia computadorizada e ressonância magnética)
- d) Exame oftalmológico
- e) Eletrocardiograma
- f) Ultrassom do sistema renal
- g) Urina

[Baseado em: “Audiometric Test and Diagnostic Workup”, capítulo do livro “Genetic Hearing Loss”, editado por Patrick J. Willems (2004)]

A avaliação audiológica visa estabelecer o tipo e o grau da perda auditiva. A audiometria tonal é o teste padrão utilizado na rotina clínica. Além disso, é dada atenção aos testes objetivos, como: potencial evocado auditivo de tronco encefálico (PEATE), emissões otoacústicas e timpanometria.

A avaliação da surdez deve incluir história clínica detalhada a fim de identificar fatores ambientais que possam estar relacionados, além de um exame físico minucioso.

É importante que todos os indivíduos sejam avaliados quanto a outras manifestações clínicas associadas à surdez, como anomalias craniofaciais, distúrbios de pigmentação da pele e cabelo, heterocromia de íris, telecanto, bócio, miopia severa, ritinite pigmentosa, fenda branquial, cistos ou fístulas, fenda pré-auricular, entre outras. Pelo fato das formas autossômicas dominantes de perda auditiva sindrômica normalmente apresentarem expressividade variável, o diagnóstico correto depende de exame físico minucioso do probando, bem como de outros membros da família.

Exames laboratoriais além de ajudarem a excluir patologias relacionadas, podem contribuir no diagnóstico da surdez. Tradicionalmente, incluem sorologia para detecção de anticorpos antivirais e bactérias, avaliação do perfil imunológico e metabólico.

Ressalta-se que a investigação de imagem é importante no diagnóstico etiológico da deficiência auditiva, assim como no planejamento de um tratamento cirúrgico como, por exemplo, o implante coclear (Robbins, 2000).

Já o uso de testes moleculares em conjunto com os audiológicos, laboratoriais e de imagem, na detecção precoce da surdez é particularmente importante no manejo dos casos de perda progressiva, pois a estimulação da linguagem em seu período crítico faz com que aprendam a se comunicar antes que a deficiência auditiva se torne mais grave. Além disso, é possível a detecção de indivíduos com mutações genéticas sem a manifestação da surdez no período neonatal, escapando assim à detecção pelos testes audiológicos. As consequências dessa predição, no âmbito social e familiar são enormes, seja em relação à possibilidade de reabilitação precoce, seja na redução dos custos da educação especial desses indivíduos, seu tratamento médico e decisão profissional (Sartorato *et al.*, 2000).

Tendo em vista a importância e o envolvimento do gene da Cx26 na deficiência auditiva, a pesquisa de mutações nesse gene constitui o primeiro passo na triagem de alterações genéticas relacionadas à perda auditiva.

O conhecimento da etiologia da surdez permite ainda aos profissionais da área a realização do aconselhamento genético apropriado, avaliando com precisão o risco de recorrência na família e permitindo o diagnóstico precoce de novos casos, assim como o tratamento adequado, proporcionando dessa forma maiores chances de desenvolvimento da fala e linguagem.

No entanto, a realização concomitante de todos os exames clínicos, audiológicos, de imagem, laboratoriais e genéticos, nem sempre é viável. Embora amplie a chance diagnóstica, onera o Sistema de Saúde, devido ao alto custo.

Dessa forma, estudos internacionais tentam avaliar a eficácia dos exames específicos solicitados e propõem protocolos e algoritmos para a solicitação dos mesmos (Mafong *et al.*, 2002; Preciado *et al.*, 2005).

Mafong e colaboradores (2002) avaliaram a eficácia dos exames laboratoriais e de imagem no diagnóstico de crianças com perda auditiva neurosensorial, e observaram que alterações laboratoriais estavam presentes em menos de 2% dos casos, propondo que estes exames sejam individualizados e solicitados somente quando necessários. Já as alterações radiológicas foram comuns e contribuíram significativamente para a identificação da etiologia, sugerindo que os exames de imagem façam parte integral da investigação diagnóstica da perda auditiva neurosensorial em crianças.

Preciado e colaboradores (2005) analisaram o rendimento dos exames de imagem, laboratoriais e genéticos e propuseram um protocolo diagnóstico sequencial, ao invés da abordagem simultânea, visando melhor custo-benefício no diagnóstico das perdas auditivas idiopáticas em crianças. Indicaram que, para os casos com surdez neurosensorial severa a profunda bilateral, a pesquisa de mutações no gene da Cx26 (*GJB2*) deve ser o primeiro exame solicitado. Já nos casos de deficiência auditiva unilateral ou bilateral leve a moderada, sugeriram que a investigação seja iniciada com exames de imagem. A Figura 7 ilustra o protocolo diagnóstico proposto por esses autores para indivíduos com perda auditiva neurosensorial.

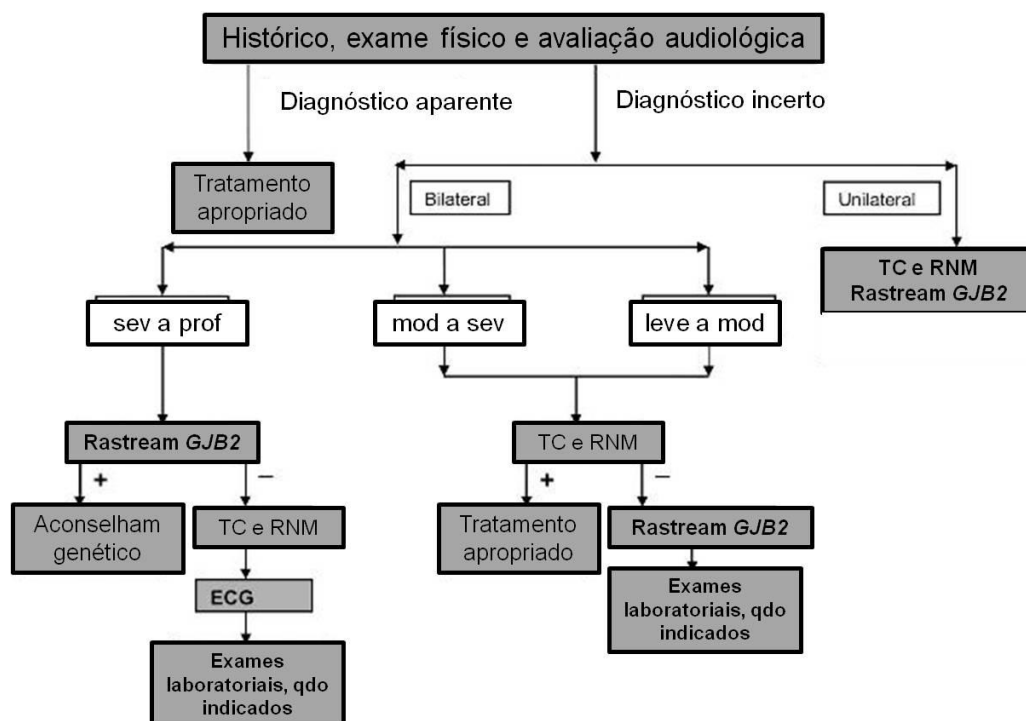


Figura 7. Algoritmo para a avaliação e manejo de crianças com perda auditiva neurossensorial (Modificado de Preciado *et al.*, 2005).

Assim, os dois autores, em seus respectivos estudos, propuseram a solicitação de exames laboratoriais em casos específicos e estabeleceram protocolos e algoritmos para a solicitação de exames de imagem, laboratoriais e genéticos.

Em termos de Saúde Pública, a perda auditiva tem impacto sócio-econômico importante, tanto no seu diagnóstico, quanto em seu tratamento, sendo de extrema relevância para as Políticas Públicas, a avaliação da eficácia dos testes laboratoriais, exames de imagem e pesquisa genética na determinação da etiologia da deficiência auditiva.

Além disso, a população brasileira é uma das mais heterogêneas do mundo, o que aponta para a necessidade de estudos como os citados acima, porém envolvendo indivíduos brasileiros, para que seja estabelecido o perfil etiológico das perdas auditivas e sejam elaborados protocolos de acordo com as características e necessidades da nossa população.

1.5. Implante coclear

A OMS recomenda o uso de aparelhos auditivos para preservar a capacidade de comunicação e integração social dos indivíduos com deficiência auditiva, porém os resultados obtidos nem sempre são positivos.

A partir da década de 1990, o implante coclear passou a ser uma indicação clínica valiosa, sendo cada vez mais utilizado na habilitação de crianças com perda auditiva pré-lingual, como também na reabilitação de crianças e adultos com perda auditiva pós-lingual.

Hoje mais de 180.000 pessoas no mundo receberam o implante coclear (US National Institute on Deafness and Other Communication Disorders. Disponível em <<http://www.nidcd.nih.gov/health/statistics/hearing.html>>).

O implante coclear é um recurso poderoso, que apresenta tecnologia sofisticada, sendo uma alternativa para os casos de perda auditiva neurossensorial que não se beneficiam pelo uso do aparelho de amplificação sonora individual (AASI). Trata-se de uma prótese que substitui funcionalmente o órgão espiral (cóclea) e não necessita das células ciliadas para transferir o sinal para o nervo auditivo, diferentemente da utilização do AASI, que requer a existência destas células. Sendo assim, os eletrodos colocados na cóclea estimulam diretamente as fibras nervosas e as células ganglionares do nervo auditivo, possibilitando ao indivíduo a sensação da audição e principalmente o reconhecimento dos sons da fala, mesmo aos que tenham surdez profunda (Wu *et al.*, 2008).

O sistema do implante coclear é composto por dispositivos internos, um feixe de eletrodos e um receptor estimulador, e por dispositivos externos, microfone, antena transmissora, fios, processador de fala e ímã. O dispositivo interno é implantado através do processo cirúrgico, sendo o feixe de eletrodos inseridos no interior da cóclea e o receptor estimulador colocado junto ao osso do crânio, abaixo da pele (Costa Filho *et al.*, 1996; Costa Filho *et al.*, 2002).

O dispositivo externo é responsável por captar o som através do microfone posicionado junto à orelha e transmiti-lo por um fio ao processador de fala. O processador envia a informação codificada para a antena transmissora colocada junto ao receptor estimulador. Os sinais codificados são transmitidos por rádio frequência para o receptor transmissor, que tem a função de estimular o feixe de eletrodos inserido no interior da cóclea. Os dispositivos internos e

externos são aderidos por um ímã e a transmissão elétrica ocorre transcutaneamente (Costa Filho *et al.*, 1996; Costa Filho *et al.*, 2002).

Com o desenvolvimento tecnológico dos últimos anos, o implante coclear vem se tornando uma opção para o tratamento de pacientes com perda auditiva neurosensorial bilateral profunda, demonstrando ser um recurso benéfico e efetivo na reabilitação desses pacientes, tanto nos casos de perda auditiva pré como pós-linguais (Calháu *et al.*, 2011).

O Ministério da Saúde Brasileiro apresenta a Portaria GM/MS nº 1278, de 20 de outubro de 1999, a qual segue os critérios de indicação e contra-indicação ao implante coclear (Anexo1). Os critérios atuais do Programa de Implante Coclear da UNICAMP seguem as instruções dessa Portaria.

Esses critérios, de um modo geral, são: perda auditiva neurosensorial severa a profunda bilateral, incapacidades de detectar a fala através do uso de AASI; motivação e adequação familiar relacionados ao compromisso nos seguimentos e expectativas para ouvir e melhorar a qualidade de vida.

O diagnóstico etiológico da surdez é um aspecto importante no prognóstico e nos resultados quanto à percepção e desenvolvimento da fala e linguagem do paciente implantado.

Trabalhos publicados recentemente sugerem que, após o implante coclear, indivíduos com perda auditiva de etiologia genética, relacionada a mutações no gene *GJB2*, obtém melhor ou igual discriminação de fala quando comparados com aqueles com surdez pré-lingual de etiologia não esclarecida ou decorrente de infecções. Nos casos com mutações no gene da *Cx26*, a cóclea não está comprometida como ocorre nos casos de causa traumática ou infecciosa, como a meningite ou a citomegalovirose, que lesam a estrutura física da cóclea, impedindo muitas vezes que um número maior de eletrodos seja introduzido, por problemas como calcificação da cóclea. As mutações no gene *GJB2* causam danos na estrutura dos conexons, dificultando a comunicação intercelular, o que não compromete as estruturas físicas da cóclea, podendo de fato favorecer o sucesso do implante coclear (Lustig *et al.*, 2004; Reinert *et al.*, 2010; Vivero *et al.*, 2010).

Adicionalmente, mutações encontradas em outro gene frequentemente associado à surdez, o *SLC26A4*, também podem representar um fator prognóstico positivo para candidatos ao implante coclear, já que alterações nesse gene não afetam a estrutura física da cóclea, o que garante o sucesso do implante (Wu *et al.*, 2008).

Como é um procedimento invasivo e caro, é de suma importância a identificação dos preditores cruciais para o implante coclear, uma vez que podem ajudar nos programas de reabilitação adequados e nas expectativas dos pacientes, familiares, médicos e outros profissionais.

Os testes genéticos e de imagem são dois fatores predominantes que determinam o desempenho a longo prazo da percepção e desenvolvimento da fala em crianças implantadas. Algumas malformações que podem ser diagnosticadas através de exames de imagem, geralmente estão associadas a um pior resultado, enquanto que crianças com mutações encontradas, por exemplo, nos genes *SLC26A4* ou *GJB2* sempre exibem excelente resultado (Wu *et al.*, 2008).

1.6. Justificativa do estudo

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 da eficácia dos exames de imagem e da pesquisa genética na avaliação da etiologia da deficiência auditiva. Deste modo, o presente estudo pretende avaliar a eficácia destes testes em uma amostra de indivíduos brasileiros com perda auditiva neurosensorial e estabelecer um protocolo diagnóstico, visando maior eficiência e redução de custos na determinação da etiologia da deficiência auditiva. Além disso, investigar os principais fatores etiológicos que levam à perda auditiva na população estudada é de grande relevância para o prognóstico do tratamento, no caso, do implante coclear, e serve como material para futuras ações de saúde pública.

Espera-se que os resultados obtidos ao final do trabalho possam auxiliar no diagnóstico etiológico, traçando o panorama da surdez na população estudada, bem como ajudem a estabelecer critérios e protocolos com a intenção de diminuir os custos na tarefa diagnóstica. Isso implicará na redução de custos com alto impacto em Saúde Pública, podendo-se, dessa maneira, estender o método à maioria da nossa população.

OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

1.7. Objetivo geral

O objetivo do presente estudo foi avaliar a eficácia dos exames de imagem e genéticos, e seu impacto em Saúde Pública, bem como estabelecer um protocolo diagnóstico, visando maior eficiência e redução de custos na determinação da etiologia das perdas auditivas.

1.8. Objetivos específicos

- Identificar a ocorrência dos diferentes tipos de perdas auditivas;
- Pesquisar alterações genéticas através: da detecção da mutação c.35delG no gene *GJB2*; do rastreamento de mutações no gene da conexina 26; da identificação das deleções del(*GJB6*-D13S1830) e del(*GJB6*-D13S1854) no gene *GJB6*; e da investigação da presença da mutação m.A1555G no gene mitocondrial *MTRNR1*;
- Correlacionar as alterações radiológicas e moleculares encontradas e avaliar o rendimento dos exames de imagem e genéticos no diagnóstico da perda auditiva;
- Identificar a etiologia das perdas auditivas;
- Avaliar os custos da realização de todos os exames específicos, concomitantemente;
- Estabelecer um protocolo diagnóstico visando otimizar o custo-benefício;
- Utilizar a plataforma TaqMan® OpenArray® para realizar a genotipagem e avaliar o rendimento e o potencial da técnica para o diagnóstico da perda auditiva.

METODOLOGIA

3. METODOLOGIA

3.1. Casuística

Fizeram parte deste estudo 100 indivíduos com perda auditiva neurosensorial, atendidos no Ambulatório de Otorrinolaringologia do Hospital de Clínicas da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), no período de 2002 a 2010, e que foram submetidos ao implante coclear.

Primeiramente, os pacientes passaram por avaliação clínica no Departamento de Otorrinolaringologia do HC – UNICAMP. Posteriormente, foram coletadas amostras de sangue de cada paciente e encaminhadas diretamente ao Laboratório de Genética Molecular Humana do Centro de Biologia Molecular e Engenharia Genética (CBMEG), da UNICAMP, onde foram realizados os exames genéticos.

Estabeleceu-se como critério de inclusão no presente estudo a presença de perda auditiva neurosensorial e investigação clínica detalhada, incluindo todos os exames audiológicos e exames de imagem (tomografia computadorizada e ressonância magnética). O critério de exclusão foi a ausência de qualquer exame audiológico ou de imagem.

Este projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP, sob Nº 396/2006 (Anexo 2). Todos os pacientes incluídos nesta amostra tiveram a sua participação previamente autorizada, mediante assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (Anexo 3), após terem recebido esclarecimento sobre o estudo a ser realizado.

3.2. Diagnóstico das perdas auditivas

Todas as etapas envolvidas no diagnóstico clínico das perdas auditivas foram realizadas no Departamento de Otorrinolaringologia do HC – UNICAMP, por profissionais da área de Otorrinolaringologia e Fonoaudiologia.

Primeiramente foi realizada avaliação médica, que incluiu história clínica detalhada, histórico familiar, exame clínico, identificação de fatores de risco para as perdas auditivas e avaliação de síndromes associadas.

O estudo compreendeu a investigação da etiologia das perdas auditivas, a avaliação das condições físicas, e a recomendação de tratamento médico clínico ou cirúrgico, bem como a indicação para outros serviços, quando necessário.

Os pacientes foram então encaminhados para a avaliação audiológica, e os seguintes exames foram realizados:

- Audiometria Tonal Limiar;
- Logaudiometria: limiar de reconhecimento de fala (LRF) e índice de reconhecimento de fala (IRF);
- Medidas de Imitância Acústica: timpanometria e pesquisa dos reflexos acústicos estapedianos;
- Emissões Otoacústicas Evocadas: transientes e produto de distorção;
- Potenciais Evocados Auditivos de Tronco Encefálico (PEATE).

Quanto ao grau, a perda auditiva foi avaliada pela média dos limiares tonais nas frequências de 500, 1000 e 2000 Hz, segundo a classificação proposta por Davis & Silvermann (1970). De 26 a 40 dB, foi considerada leve; de 41 a 70 dB, moderada; de 71 a 90 dB, severa; e acima de 90 dB, profunda. A avaliação foi baseada no exame audiológico mais recente.

Os indivíduos também foram submetidos a exames de imagem, sendo realizados tomografia computadorizada e ressonância magnética.

Exames laboratoriais foram solicitados em casos específicos, baseado na história clínica dos pacientes, sendo solicitados os seguintes exames:

- Hemograma completo;
- Dosagem de sódio e potássio;
- Uréia e creatinina;
- Função tireoidiana (TSH e T4 livre);
- Colesterol total e frações;
- Triglicerídeos;
- Sorologias para sífilis (FTABs);
- Citomegalovírus (IgG);

- Toxoplasmose (IgG);
- Rubéola (IgG);
- Caxumba (IgG).

Posteriormente, foram coletadas amostras de sangue dos pacientes e, quando possível, de seus familiares, sendo estas enviadas diretamente ao Laboratório de Genética Molecular Humana do CBMEG-UNICAMP, onde foi realizada a análise genética.

3.3. Estudo molecular

3.3.1. Extração do DNA genômico de sangue periférico

A extração de DNA genômico foi realizada a partir de leucócitos obtidos em 10 a 15mL de sangue periférico, coletado em tubos *Vacutainer* contendo 10% do anticoagulante EDTA (ácido etilenodiamino tetra-acético dissódico 2H₂O 0,5 M pH 8,0). Foi empregado o método de extração com fenol e clorofórmio, padronizado no Laboratório de Genética Molecular Humana do CBMEG.

Inicialmente, para a lise das hemácias, foi adicionada a Solução A (Triton-X 100 a 1%; MgCl₂ 5 mM; Sacarose 0,32 M; Tris-HCl 10 mM pH 8,0) ao sangue coletado, até atingir o volume de 50 mL. Após ser homogeneizado, o material foi mantido em gelo por 30 min. Posteriormente, foi centrifugado a 2000 rpm por 15 min a 4°C. O sobrenadante foi então descartado e o precipitado (*pellet*) foi ressuspenso em 35 mL de Solução A. Esta última operação foi repetida até a obtenção de um *pellet* branco, livre de hemácias. Posteriormente, foi adicionado 1 mL da solução B 1X (Na₂EDTA 20 mM; NaCl 20 mM; Tris-HCl 20 mM pH 8,0) e 250 µL de solução C (para 1 mL de solução C: 0,5mL de solução B 1X, 1 mg de Proteinase K [*Boehringer Mannheim GmbH, Mannheim, Alemanha*] e 0,5 mL de SDS 10%). O material foi incubado em banho-maria a 56 °C por aproximadamente 2 h, ou em alguns casos, a 37 °C por 18h.

Após a incubação, foi iniciada a etapa de purificação do DNA genômico com fenol-clorofórmio. Foi então adicionado 1 mL de TE 1X (Tris-HCl 10 mM, pH 8,0; EDTA 1 mM) e quantidade suficiente de fenol saturado com Tris-HCl 10 mM pH 8,0 até dobrar o volume da

amostra. Foi realizada a homogeneização por inversão lenta dos tubos durante 5 min, e para a separação e recuperação da fase aquosa (sobrenadante) o tubo foi centrifugado a 2.500 rpm por 15 min à temperatura ambiente. O precipitado foi descartado e o sobrenadante foi passado para outro tubo. O procedimento foi repetido por duas vezes, primeiro substituindo o fenol por uma solução de fenol:clorofórmio:álcool isoamílico (25:24:1; v:v:v) e por último com uma solução clorofórmio:álcool isoamílico (24:1; v:v).

Para a precipitação do DNA, foi acrescentado 0,1 do volume da amostra de acetato de sódio 3 M pH 5,5 e 2,5 volumes de etanol absoluto gelado. O DNA precipitado foi recuperado com auxílio de uma haste plástica esterilizada e lavado com etanol 70%, para a retirada do excesso de sal, antes de ser ressuspendido em um volume de 200 µL de TE 1X.

3.3.2. Detecção de mutações em genes nucleares

3.3.2.1. 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, utilizando ARMS *primers* (do inglês *Amplification Refractory Mutations System*) para a detecção de mutações de ponto (Scott *et al.*, 1998). Os *primers* normal (NOR) e mutante (MUT) foram utilizados, em reações diferentes, para amplificar os alelos sem e com a mutação, respectivamente. O *primer* comum (COM) foi usado como *primer* inverso. Com essas duas reações (NOR e MUT) é possível identificar cada indivíduo como sendo homozigoto normal, homozigoto mutante ou heterozigoto para a mutação c.35delG. Os *primers* A e B foram usados como controles internos de amplificação para as reações. Esta técnica foi desenvolvida no Laboratório de Genética Molecular Humana do CBMEG, a qual se encontra patenteada (Patente Nº P10005340-6; Método de teste para surdez de origem genética – UNICAMP, 2002).

3.3.2.2. Identificação das deleções del(*GJB6-D13S1830*) e del(*GJB6-D13S1854*) no gene *GJB6*

O rastreamento das deleções del(*GJB6-D13S1830*) e del(*GJB6-D13S1854*) foi realizado de acordo com os protocolos previamente descritos por Del Castillo *et al.*, 2005. A investigação das mutações foi realizada através de uma PCR *multiplex*, que investiga a presença de ambas as deleções em apenas uma reação. As sequências dos *primers* e o tamanho dos fragmentos resultantes são mostrados na Tabela 4. Os fragmentos de DNA resultantes da amplificação contêm os pontos de quebra de ambas as deleções, assim como um segmento do éxon 1 do gene *GJB6*, que é usado como controle para checar a eficiência da reação e distinguir os alelos heterozigotos e homozigotos para qualquer uma das duas deleções.

Tabela 4. Sequências dos *primers* utilizados na triagem das deleções del(*GJB6-D13S1830*) e del(*GJB6-D13S1854*) e tamanho dos fragmentos gerados.

Par	Posição	Primer 5'→3'	Tamanho (pb)
1	ponto de quebra da del(<i>GJB6-D13S1830</i>)	GJB6 – TTT AGG GCA TGA TTG GGG TGA TTT BKR1 – CAC CAT GCG TAG CCT TAA CCA TTT T	460
2	ponto de quebra da del(<i>GJB6-D13S1854</i>)	DelBK1 – TCA TAG TGA AGA ACT CGA TGC TGT TT DelBK2 – CAG CGG CTA CCC TAG TTG TGG T	564
3	éxon 1 do gene <i>GJB6</i>	Ex1A – CGT CTT TGG GGG TGT TGC TT Ex1B – CAT GAA GAG GGC GTA CAA GTT AGAA	333

Para um volume de 30 µL de reação, foram utilizados: 200 a 500 ng de DNA genômico, 200µM de cada desoxinucleotídeo trifosfato (dATP, dCTP, dGTP e dTTP), 20 pmol de cada *primer* (direto e inverso), 2,5 U de *Taq* DNA polimerase em de tampão de PCR 10X (Tris-HCl 10mM pH 8,8), 25 mM de MgCl₂, completando com água até o volume final.

As amplificações foram realizadas em aparelho termociclador Veriti® 96-Well Thermal Cycler (Applied Biosystems). Foram então realizados 35 ciclos de aquecimento a 95°C para a desnaturação do DNA, seguido da temperatura de 62°C para o anelamento dos *primers*, e então de 72°C para a extensão das novas fitas. As condições da PCR estão resumidas na Figura 8.

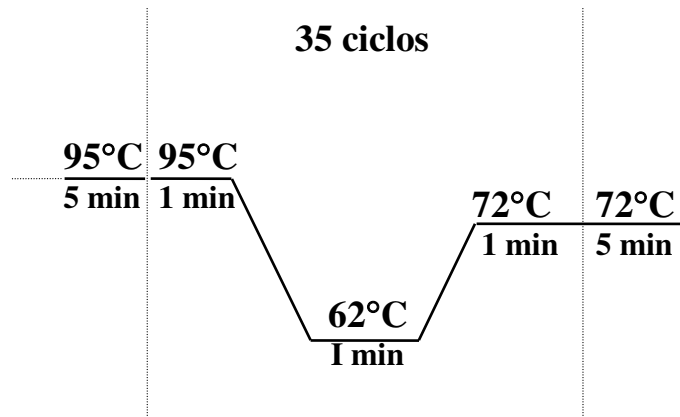


Figura 8. Ciclos de amplificação para o estudo das deleções del(*GJB6*-D13S1830) e del(*GJB6*-D13S1854).

Os produtos de amplificação foram visualizados em gel de agarose 1,5%, após coloração com brometo de etídio (Sigma). Indivíduos que não são portadores das deleções exibem a banda controle de 333 pb referente ao éxon 1 do gene *GJB6*. Indivíduos com a del(*GJB6*-D13S1830) em heterozigose apresentam, além da banda controle, uma banda de 460 pb. Já a del(*GJB6*-D13S1854) em heterozigose gera um fragmento de 564 pb, além da banda controle.

3.3.2.3. Amplificação do gene *GJB2*

O éxon codificante do gene *GJB2*, com 681 pb, foi dividido para a amplificação pela técnica de PCR, de acordo com as condições previamente descritas por Kelsell *et al.* (1997) e Denoyelle *et al.* (1997). As sequências dos *primers* e o tamanho dos fragmentos resultantes são mostrados na Tabela 5.

Tabela 5. Sequências dos *primers* utilizados para a amplificação do gene *GJB2* e tamanho dos fragmentos gerados.

Par	Primers 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: 200 a 500 ng de DNA genômico, 200µM de cada desoxinucleotídeo trifosfato (dATP, dCTP, dGTP e dTTP), 20 pmol de cada *primer* (direto e inverso), 2,5 U da enzima *Taq* DNA polimerase em tampão de PCR 10X (Tris-HCl 10mM pH 8,8), 25 mM 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. As condições da PCR estão resumidas na Figura 9.

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

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

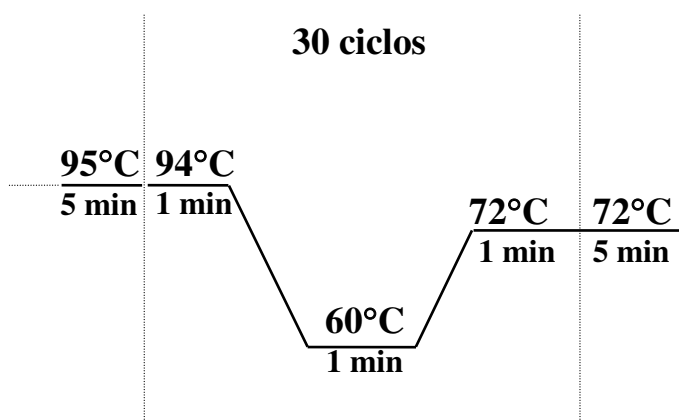


Figura 9. Ciclos utilizados para a amplificação do gene *GJB2*.

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

3.3.2.4.1. Purificação dos produtos de PCR

Primeiramente, os fragmentos amplificados pela técnica de PCR foram purificados utilizando-se o kit *Wizard SV Gel and PCR Clean-UP System* (Promega Corporation, EUA). Após a purificação, a quantidade e a pureza das amostras de DNA foram determinadas por densidade óptica em espectrofotômetro NanoDrop® ND-8000 (Thermo Scientific).

3.3.2.4.2. Reação para 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: 40 a 80 ng 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 10.

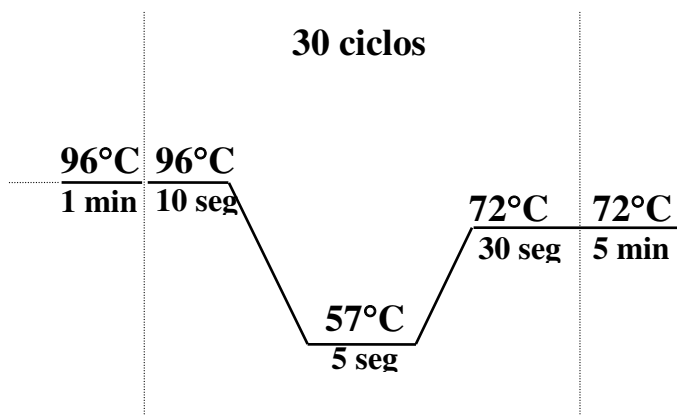


Figura 10. Ciclos de amplificação para posterior sequenciamento do gene *GJB2*.

Após a amplificação, as reações de sequenciamento foram purificadas. Primeiramente foram adicionados 80 µL de etanol 80%, sendo a placa centrifugada por 45 min a 3.700 rpm. O etanol foi descartado e, posteriormente, foram adicionados 150 µL de etanol 70%. Foi realizada uma nova centrifugação, por 10 min a 3.700 rpm, sendo o etanol novamente descartado.

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.

3.3.2.4.3. 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), *Gene Runner*® 3.01 (<http://www.generunner.net>) e *CLC Sequence Viewer* 6.1 (CLC bio A/S).

3.3.3. Triagem da mutação m.1555A>G no gene mitocondrial *MTRNR1*

Para o rastreamento da mutação m.1555A>G foram utilizadas as condições previamente descritas por Friedman *et al.* (1999) e Iwasaki *et al.* (2000), com o par de *primers* MIT-F (5' – GTC GAA GGT GGA TTT AGC AGT – 3') e MIT-R (5' – CAG AAG GTA TAG GGG TTA GTC – 3').

Para um volume de 50 µL de reação, foram utilizados: 200 a 500 ng de DNA genômico, 200µM de cada desoxinucleotídeos trifosfato (dATP, dCTP, dGTP e dTTP), 20 pmol de cada *primer* (direto e inverso), 2,5 U de *Taq* DNA polimerase em tampão de PCR 10X (Tris-HCl 10mM pH 8,8), 25 mM de MgCl₂, completando com água até o volume final.

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

desnaturação do DNA, seguido da temperatura de 54°C para o anelamento dos *primers*, e então de 65°C para a extensão das novas fitas. As condições da PCR estão resumidas na Figura 11.

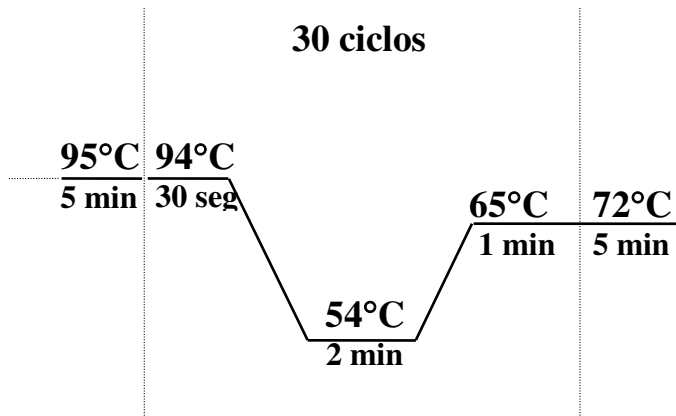


Figura 11. Ciclos de amplificação para o estudo da mutação mitocondrial m.1555A>G.

Após a amplificação pela técnica de PCR, foram gerados fragmentos de DNAm de 2060pb. Posteriormente, os produtos de amplificação foram submetidos à análise de restrição utilizando a enzima *BsmAI* (Invitrogen), por 2 h a 55°C. Para o preparo da reação de digestão foram utilizados: 17,5 µl do produto de PCR, 2,0 µL do tampão da enzima e 0,5 µL da enzima *BsmAI* (5000U/µL).

A análise dos produtos gerados foi realizada em gel de agarose 1,5%, após coloração com brometo de etídio (Sigma). Em indivíduos que não são portadores da mutação m.1555A>G são gerados 3 fragmentos: de 1100, 516 e 444 pb. E em indivíduos portadores da mutação, um dos sítios de restrição é abolido, sendo gerados apenas 2 fragmentos: de 1616 e 444 bp.

3.3.4. Genotipagem utilizando a plataforma TaqMan® OpenArray®

A plataforma TaqMan® OpenArray®, da Biotrove, Inc., é um método de alto rendimento (“*high throughput*”) baseado em PCR em tempo real, que permite verificar até 3072 SNPs (do inglês *single nucleotide polymorphisms*) em uma única lâmina de genotipagem, ou realizar 2688 ensaios de expressão gênica por placa de expressão, ambas devendo obedecer um *layout* padrão

de ensaio. Baseado nas sondas de hidrólise, a técnica TaqMan® OpenArray® Genotyping necessita de um par de *primers* comum tanto para a sequência normal quanto para a mutante, além de duas sondas MGB diferentes por ensaio, sendo uma sonda para a sequência normal, contendo o fluoróforo VIC®, e uma sonda para a sequência mutante, com o fluoróforo FAM®.

A lâmina de OpenArray® é composta por 48 *subarrays* de 64 *through-hole* (Figura 12). A sua superfície apresenta propriedades hidrofóbicas, enquanto o interior dos *through-hole* (local onde estão as sondas e os *primers* necessários para as reações) é hidrofílico, engenharia que permite a distribuição dos pequenos volumes das amostras com grande acurácia.

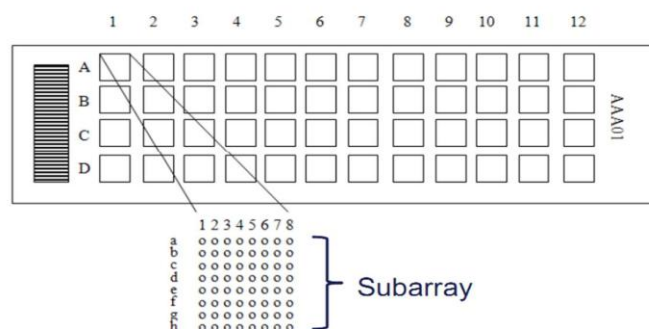


Figura 12. Ilustração esquemática da lâmina de OpenArray® (Retirado de: TaqMan® OpenArray® Genotyping System Manual. Disponível em: Life Technologies website <<http://products.invitrogen.com/ivgn/product/4459283>>).

A plataforma é composta por um robo pipetador, o OpenArray® AccuFill® System (Applied Biosystems), ligado a um computador para comandar toda a operação. Além deste, a plataforma conta com o termociclador Dual Flat Block GeneAmp® PCR System 9700 da Applied Biosystems, próprio para a termociclagem das placas de OpenArray®, uma estação de selagem e o OpenArray NT Cyclers®, o equipamento responsável pela captura da fluorescência emitida pela lâmina (Figura 13).

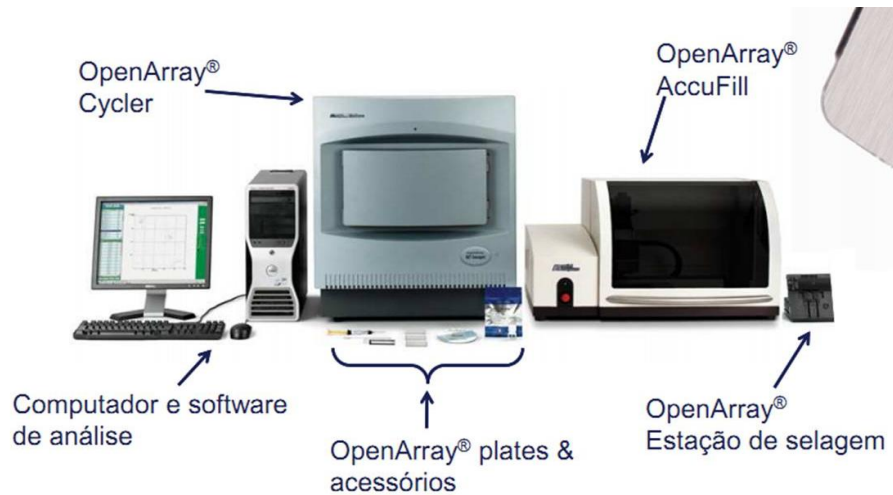


Figura 13. Ilustração da plataforma TaqMan® OpenArray® (Retirado de: Life Technologies website. Products & Services. Disponível em: <<http://products.invitrogen.com/ivgn/product/4459283>>).

3.3.4.1. Desenho dos ensaios

O *layout* escolhido para as placas de OpenArray® foi o de 32 ensaios para 96 amostras, contendo 2 ensaios por *subarray*. As alterações, mutações e SNPs selecionados foram procurados no site da Applied Biosystems (<https://products.appliedbiosystems.com/ab/en/US/direct/ab?cmd=ABGTKeywordSearch&catID=600769>), verificando se a empresa já continha os ensaios com as sondas e *primers*. Em caso positivo, foi copiado o ID referente ao ensaio, senão, foram customizados novos ensaios, sendo enviada para a empresa a sequência mascarada de aproximadamente 250 nucleotídeos, contendo a variação entre colchetes.

Para o encaminhamento dos 32 ensaios customizados, foi utilizado o software Custom TaqMan® Genomic Assays - File Builder Version 3.1 (Applied Biosystems), gerando um arquivo ‘.txt’ contendo todos os dados do ensaio, que foi enviado para a Applied BioSystems por e-mail com as demais descrições do ensaio.

3.3.4.2. Análise qualitativa e quantitativa das amostras

A reprodutibilidade, acurácia e precisão da técnica TaqMan® OpenArray® está intimamente relacionada à quantificação correta e à pureza das amostras. Sendo assim, as amostras devem estar uniformemente quantificadas (50 ng/μL) e com a razão $A_{260/280}$ entre 1,8 e 2,0. Para isso, foi utilizado o NanoDrop® 8000 (Thermo Scientific) para a verificação da pureza. Amostras que apresentaram valores inferiores a 1,8 foram purificadas. Quanto à quantificação, foi utilizado o Qubit® 2.0 Fluorometer devido a sua precisão em conjunto com o Qubit® Assay Kit dsDNA BR Assay (Invitrogen), uniformizando as amostras na concentração de 50 ng/μL através de simples diluições. A Figura 14 mostra os aparelhos NanoDrop® 8000 (Thermo Scientific) e Qubit® 2.0 Fluorometer (Invitrogen) utilizados para a verificação da pureza e quantificação das amostras, respectivamente.

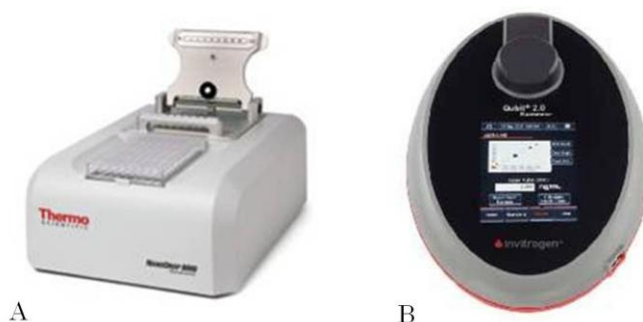


Figura 14. Aparelhos utilizados para a análise qualitativa e quantitativa das amostras. A= NanoDrop® 8000 (Thermo Scientific), usado para a verificação da pureza (Retirado de Thermo Scientific website. NanoDrop products. Disponível em: <www.nanodrop.com/Productnd8000overview.aspx?AspxAutoDetectCookieSupport=1>); B= Qubit® 2.0 Fluorometer (Invitrogen), utilizado para a quantificação das amostras (Retirado de: Life Technologies website. Products & Services. Disponível em: <www.invitrogen.com/site/us/en/home/brands/Product-Brand/Qubit/qubitfluorometer.html>).

3.3.4.3. Preparo das amostras

Em uma placa de 384 poços, foram misturados 2 μ L da amostra devidamente quantificada e 2 μ L do TaqMan® OpenArray® Master Mix em cada poço previamente identificado. Como o *layout* escolhido para o presente estudo permite a análise de 96 amostras por reação, só foram utilizados 96 dos 384 poços. Em seguida, a placa foi selada com o adesivo de selagem da Thermo Scientific para evitar a evaporação da mistura.

3.3.4.4. Pipetagem e distribuição das amostras

Foi utilizado o OpenArray® AccuFill® System (Applied Biosystems) para a distribuição das amostras contidas na placa de 384 poços nas lâminas de OpenArray® e o Software OpenArray® AccuFill® para a configuração do ensaio e comando do aparelho. A Figura 15 mostra o esquema de distribuição das amostras das placas de 384 poços para a lâmina de OpenArray®.

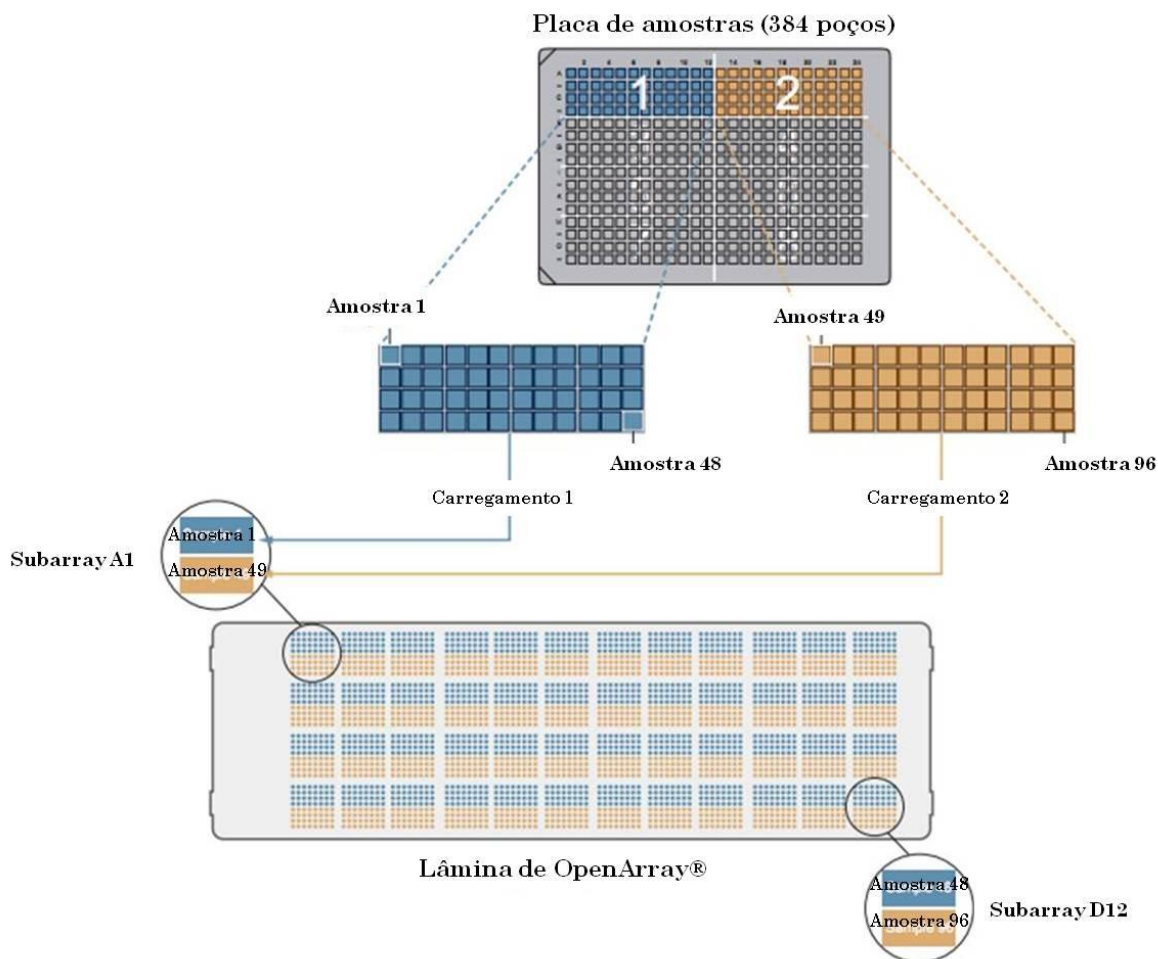


Figura 15. Ilustração esquemática da distribuição das amostras na lâmina de OpenArray® (Modificado de: TaqMan® OpenArray® Genotyping System Manual. Disponível em: Life Technologies website <<http://products.invitrogen.com/ivgn/product/4459283>>).

3.3.4.5. Selagem das lâminas

Após o carregamento da lâmina de OpenArray® com as amostras e o TaqMan® OpenArray® Master Mix, esta foi colocada dentro de uma *case* contendo um líquido de imersão, ambos presentes no TaqMan® OpenArray® Genotyping Kit, e então foi adicionada uma goma fotossensível na extremidade da *case*, para vedação. A lâmina foi levada para a estação de selagem, onde ficou por 2 min sobre a ação de luz ultravioleta, até a solidificação da goma.

3.3.4.6. Termociclagem

A termociclagem foi realizada na máquina Dual Flat Block GeneAmp® PCR System 9700 da Applied Biosystems (Figura 16), onde o ciclo foi de aproximadamente 4 horas.



Figura 16. Termociclador Dual Flat Block GeneAmp® PCR System 9700 da Applied Biosystems, utilizado para a etapa de termociclagem (Retirado de: TaqMan® OpenArray® Genotyping System Manual. Disponível em: Life Technologies website <<http://products.invitrogen.com/ivgn/product/4459283>>).

3.3.4.7. Captura e análise dos resultados

Para a captura da fluorescência e a obtenção dos resultados, foi utilizado o OpenArray® NT Cyclor (Biotrove, Inc.), e o software OpenArray® SNP Genotyping Analysis (Applied BioSystems), respectivamente. Os arquivos foram importados para o software TaqMan® OpenArray® Genotyper (Applied BioSystems), que contém mais ferramentas e opções para a análise.

RESULTADOS

4. RESULTADOS

4.1. Coleta de dados

Dos 100 indivíduos analisados, 48 eram do sexo masculino e 52 do sexo feminino. Os dados clínicos obtidos dos prontuários dos pacientes, como: nome, sexo, data de nascimento, história clínica, histórico familiar de perda auditiva, morbidades gestacionais e perinatais, uso de medicação ototóxica, AASI, síndromes associadas, histórico do implante coclear, entre outros, foram coletados para correlações posteriores. Os dados obtidos dos pacientes, tais como sexo, idade, data do implante coclear estão relacionados na Tabela 6.

Também foram anotados os resultados dos exames audiológicos, de imagem, laboratoriais (quando disponíveis), além da etiologia das perdas auditivas, nos casos em que foi possível concluir o diagnóstico.

Tabela 6. Dados referentes ao sexo, idade na época em que foi realizado o implante coclear e data da cirurgia dos pacientes analisados.

Paciente	Sexo	Idade (anos)	Data do implante coclear
1	M	6	07/04/2007
2	M	4	22/09/2004
3	F	4	18/05/2004
4	F	3	09/03/2005
5	F	3	29/09/2009
6	F	3	27/10/2004
7	M	3	14/11/2007
8	M	5	03/10/2010
9	F	3	31/05/2006
10	F	4	02/06/2004
11	M	2	27/07/2005
12	F	3	20/05/2005
13	F	4	13/04/2005
14	F	2	23/06/2009
15	M	3	24/11/2004
16	M	5	03/03/2010
17	M	3	17/03/2004
18	M	4	20/10/2004
19	F	7	07/01/2009
20	F	3	11/08/2004
21	M	3	04/08/2004

Paciente	Sexo	Idade (anos)	Data do implante coclear
22	F	14	24/03/2010
23	F	3	18/02/2004
24	M	7	13/10/2009
25	M	3	22/06/2005
26	M	2	19/01/2004
27	F	4	01/12/2005
28	M	3	11/03/2004
29	M	5	19/07/2006
30	M	3	17/08/2005
31	F	5	31/03/2010
32	M	8	27/07/2005
33	M	2	24/11/2004
34	M	6	13/07/2005
35	F	7	07/07/2004
36	M	5	31/01/2007
37	M	3	27/10/2009
38	M	4	14/09/2005
39	M	4	09/11/2004
40	F	5	19/01/2005
41	F	10	23/03/2005
42	M	3	08/11/2004
43	F	5	04/09/2008
44	F	4	02/03/2005
45	M	2	17/05/2006
46	M	5	26/01/2010
47	M	4	18/11/2008
48	M	3	21/07/2009
49	F	29	21/09/2005
50	F	27	30/01/2002
51	M	56	27/08/2003
52	M	63	24/08/2005
53	M	61	30/06/2004
54	F	19	11/01/2005
55	F	37	22/08/2007
56	F	56	15/06/2005
57	M	42	27/06/2007
58	F	59	14/08/2002
59	F	56	19/01/2004
60	M	28	16/03/2010
61	F	35	29/06/2002
62	M	23	13/10/2004
63	M	16	05/07/2006
64	F	63	18/05/2005
65	F	61	22/03/2006
66	F	26	17/12/2003
67	F	65	01/10/2003
68	F	58	30/06/2009
69	F	18	25/03/2009
70	M	42	05/12/2009
71	F	32	02/03/2010
72	M	26	25/09/2002
73	F	41	14/10/2009
74	M	57	17/11/2009
75	F	58	23/07/2003
76	F	74	19/01/2005
77	F	52	19/04/2006

Paciente	Sexo	Idade (anos)	Data do implante coclear
78	F	37	28/08/2002
79	F	55	27/07/2009
80	M	62	16/02/2005
81	F	53	19/02/2003
82	M	76	27/08/2003
83	F	36	23/06/2004
84	F	68	28/01/2009
85	F	52	28/06/2006
86	F	56	11/05/2003
87	F	48	13/08/2003
88	M	59	02/10/2010
89	F	34	04/04/2007
90	F	36	01/09/2005
91	M	55	30/03/2005
92	F	58	31/05/2006
93	M	40	06/01/2005
94	M	19	16/03/2005
95	M	46	21/10/2009
96	F	50	01/09/2009
97	F	40	03/08/2009
98	M	46	29/10/2003
99	M	35	16/11/2005
100	M	22	16/03/2010

4.2. Ocorrência dos diferentes tipos de perda auditiva

Todos os 100 pacientes estudados apresentavam perda auditiva neurossensorial severa a profunda bilateral.

De acordo com o início da deficiência auditiva, esta pôde ser classificada como congênita em 38 (38%) indivíduos, e adquirida em 62 (62%). A ocorrência das perdas adquiridas foi de forma progressiva em 44 (44%) pacientes, e abrupta em 18 (18%) (Figura 17).

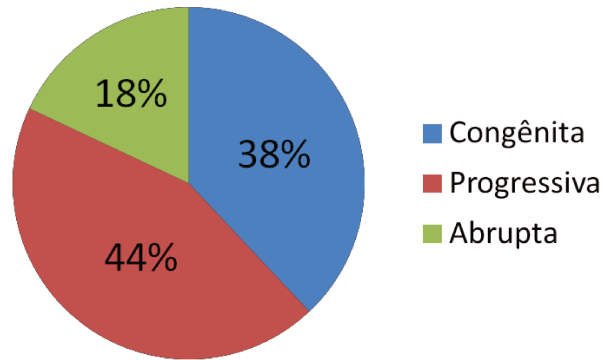


Figura 17. Representação gráfica da incidência das perdas auditivas congênitas, progressivas e abruptas.

Ainda de acordo com o início da manifestação, em 47 (47%) indivíduos a surdez foi pré-lingual e em 53 (53%), pós-lingual (Figura 18).

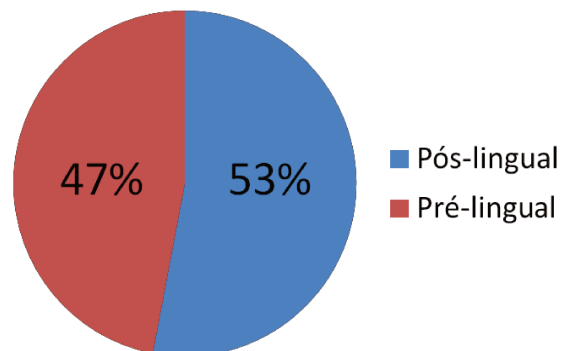


Figura 18. Representação gráfica da incidência das perdas auditivas pós-linguais e pré-linguais.

4.3. Alterações radiológicas

Anormalidades radiológicas foram identificadas em 29 (29%) do total de casos analisados, e estão relacionadas na Tabela 7. Neste estudo, o achado mais frequente nos exames de imagem foi a otosclerose, presente em 6 indivíduos, seguida pelo o aqueduto vestibular alargado e

fibrose/ossificação, cada um sendo identificado em 4 pacientes. Em 3 casos foi encontrada fratura do osso temporal, e em 2, displasia coclear. Outras alterações estavam presentes em 10 dos indivíduos analisados.

Tabela 7. Alterações encontradas nos exames de imagem dos pacientes analisados.

Alteração	Número de pacientes
Otosclerose coclear	6
Aqueduto vestibular alargado	4
Fibrose / Ossificação	4
Fratura do osso temporal	3
Displasia coclear / Mondini	2
Outras	10

Os exames radiológicos foram importantes para confirmar e/ou estabelecer o diagnóstico etiológico da perda auditiva em 20 pacientes, o que representa 20% do total de casos estudados.

Dentre os 38 indivíduos com surdez congênita, 4 apresentaram alterações nos exames de imagem que puderam confirmar e/ou explicar a surdez. Já nos pacientes com deficiência auditiva progressiva, alterações foram identificadas em 8 dos 44. A maior proporção de casos com exames alterados foi encontrada nos indivíduos com perda abrupta, 8 dentre os 18. Dessa forma, o rendimento diagnóstico da tomografia computadorizada e da ressonância magnética foi de 10% para as perdas auditivas congênitas, 18% para as progressivas, e 44,5% para as perdas abruptas.

4.4. Alterações genéticas

Foram rastreadas alterações moleculares em todos os 100 pacientes que fizeram parte deste estudo e em 19 parentais.

4.4.1. Rastreamento da mutação c.35delG no gene *GJB2*

A mutação c.35delG foi encontrada em 19 pacientes, sendo detectada em homozigose em 14 pacientes e em heterozigose em 5. A figura abaixo (Figura 19) mostra os resultados obtidos após a realização das reações NOR e MUT, pela técnica de PCR alelo específico, para a identificação da mutação c.35delG.

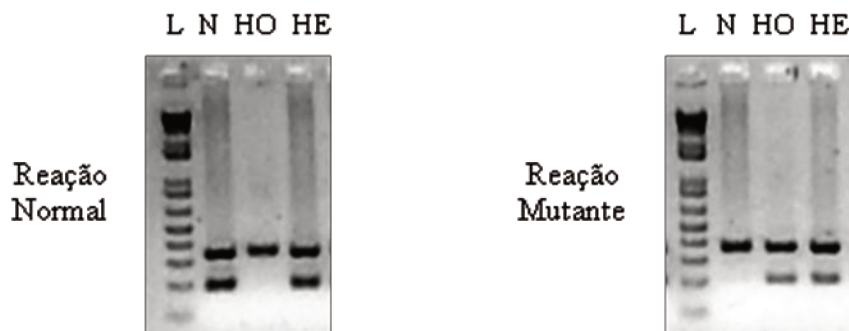


Figura 19. Gel de agarose mostrando os fragmentos gerados pela técnica de PCR alelo-específico para a análise da mutação c.35delG. L= Marcador de peso molecular 1Kb *Plus DNA Ladder* (Invitrogen); N= Controle homozigoto normal (N/N); HO= Controle homozigoto mutante (35delG/35delG); HE= Controle heterozigoto mutante (35delG/N).

4.4.2. Detecção das deleções del(*GJB6*-D13S1830) e del(*GJB6*-D13S1854) no gene *GJB6*

A deleção del(*GJB6*-D13S1830) foi encontrada em heterozigose em 2 pacientes, no 28 e no 29. Porém, a deleção del(*GJB6*-D13S1854) não foi identificada em nenhum dos indivíduos analisados. A figura abaixo (Figura 20) ilustra o resultado obtido após a realização da técnica de PCR-*multiplex* para detecção das deleções no gene *GJB6*. Além da del(*GJB6*-D13S1830), também foi encontrada no paciente 28 a mutação c.35delG em heterozigose no gene *GJB2*, sendo desta forma um heterozigoto composto que apresenta o genótipo 35delG/del(*GJB6*-D13S1830).

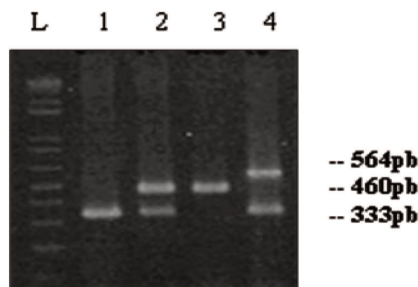


Figura 20. Gel de agarose mostrando os fragmentos gerados pela técnica de PCR-*multiplex* para a análise das deleções no gene *GJB6*. L= Marcador de peso molecular 1Kb *Plus DNA Ladder* (Invitrogen); 1= Controle normal; 2= Controle heterozigoto *del(GJB6-D13S1830)*; 3= Controle homozigoto *del(GJB6-D13S1830)*; 4= Controle heterozigoto para a *del(GJB6-D13S1854)*.

4.4.3. Análise de outras mutações no gene *GJB2*

Após o sequenciamento do gene *GJB2* foi possível encontrar outras alterações genéticas em 11 pacientes, além de confirmar a presença da mutação c.35delG em 19 indivíduos.

4.4.3.1. Alteração G>A na posição 79

Essa alteração foi encontrada em heterozigose nos indivíduos 37 e 56. Esta se refere 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, e é considerada polimorfismo. A Figura 21 mostra o resultado do sequenciamento.



Figura 21. Eletroferograma mostrando em destaque a alteração G>A na posição 79 em heterozigose.

4.4.3.2. Alteração T>C na posição 101

A alteração c.101T>C foi detectada em heterozigose (Figura 22) nos pacientes 36 e 70, sendo previamente descrita por Kelsell *et al.* em 1997. Ela se caracteriza pela troca da base T para C na posição 101 do gene da Cx26, levando à substituição do aminoácido metionina por treonina no códon 34 (p.M34T), situado no primeiro domínio transmembrânico da proteína.

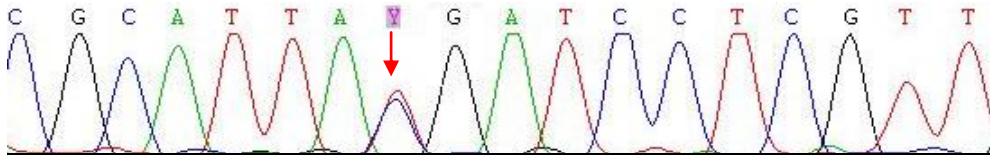


Figura 22. Eletroferograma mostrando em destaque a alteração T>C na posição 101 em heterozigose.

4.4.3.3. Alteração G>A na posição 109

A mutação c.109G>A foi identificada em heterozigose no indivíduo 69. Ela se trata da troca do aminoácido valina por isoleucina no códon 37 (p.V37I), situado no primeiro domínio transmembrânico da proteína. A variação da base G para A na posição 109 do gene *GJB2* foi previamente descrita por Kelley *et al.* em 1998. Além da mutação p.V37I, o paciente 69 também apresentava a alteração p.V95M em heterozigose, sendo desta forma um heterozigoto composto que apresenta o genótipo V37I/V95M. A Figura 23 mostra o resultado do sequenciamento.



Figura 23. Eletroferograma mostrando em destaque a alteração G>A na posição 109 em heterozigose.

4.4.3.4. Alteração G>T na posição 139

A mutação c.139G>T foi detectada em heterozigose (Figura 24) no paciente 28, sendo previamente descrita por Kelsell *et al.* em 1997. Ela se refere à troca da base G para T na posição 139 do gene da Cx26, levando à substituição do aminoácido glutamato, situado no primeiro domínio extracitoplasmático da proteína, para um códon de terminação prematura, no códon 47 (p.E47X), fazendo com que a transcrição do gene seja interrompida. Além da mutação p.E47X, o paciente 28 também apresentava a del(*GJB6*-D13S1830) em heterozigose, sendo desta forma um heterozigoto composto que apresenta o genótipo E47X/del(*GJB6*-D13S1830).



Figura 24. Eletroferograma mostrando em destaque a alteração G>T na posição 139 em heterozigose.

4.4.3.5. Alteração T>C na posição 269

A mutação c.269T>C foi encontrada em heterozigose (Figura 25) no paciente 51, sendo previamente descrita por Murgia *et al.* em 1999. A variação da base T para C na posição 269 do gene *GJB2*, provoca a substituição do aminoácido leucina por prolina no códon 90 (p.L90P), situado no segundo domínio transmembrânico da Cx26.



Figura 25. Eletroferograma mostrando em destaque a alteração T>C na posição 269 em heterozigose.

4.4.3.6. Alteração G>A na posição 283

A mutação c.283G>A foi identificada em heterozigose (Figura 26) no indivíduo 69. Ela se caracteriza pela troca do aminoácido valina por metionina no códon 95 (p.V95M), situado no segundo domínio intracitoplasmático da Cx26. A variação da base G para A na posição 283 do gene *GJB2* foi previamente descrita por Kelley *et al.* em 1998. Além da mutação p.V95M, o paciente 69 também apresentava a alteração p.V37I em heterozigose, sendo desta forma um heterozigoto composto que apresenta o genótipo V37I/V95M.

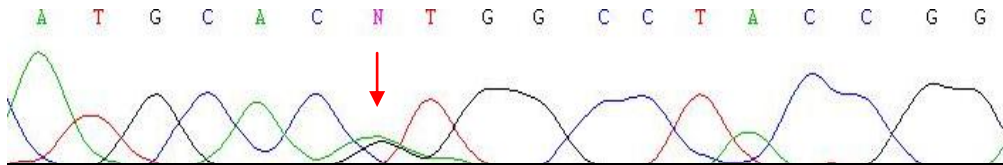


Figura 26. Eletroferograma mostrando em destaque a alteração G>A na posição 283 em heterozigose.

4.4.3.7. Alteração G>A na posição 457

Esta alteração foi detectada em heterozigose (Figura 27) nos pacientes 8 e 25, sendo previamente descrita por Hilbert *et al.* em 1998. Ela se trata da substituição do aminoácido valina por isoleucina no códon 153 (p.V153I), situado no terceiro domínio transmembrânico da Cx26. A variação da base G para A na posição 457 (c.457G>A) do gene *GJB2* é considerada polimorfismo.

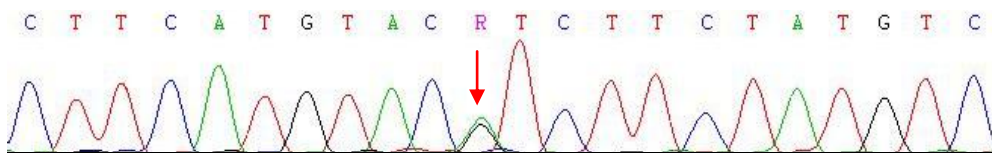


Figura 27. Eletroferograma mostrando em destaque a alteração G>A na posição 457 em heterozigose.

4.4.3.8. Alteração A>G na posição 503

A mutação c.503A>G foi encontrada em heterozigose nos indivíduos 52 e 74. Ela provoca a mudança da base A para G na posição 503 do gene da Cx26, acarretando a troca do aminoácido lisina para arginina no códon 168 (p.K168R). A Figura 28 mostra o resultado do sequenciamento.



Figura 28. Eletroferograma mostrando em destaque a alteração A>G na posição 503 em heterozigose.

4.4.3.9. Alteração G>A na posição 516

Essa mutação foi previamente descrita por Sartorato *et al.* em 2004, sendo identificada em heterozigose (Figura 29) no paciente 23. Ela se refere à mudança da base G para A na posição 516 (c.516G>A) do gene da Cx26. Esta alteração acarreta a troca do aminoácido triptofano, situado no segundo domínio extracitoplasmático da proteína, para um códon de parada prematura, no códon 172 (p.W172X), fazendo com que a transcrição do gene seja interrompida. Além da alteração p.W172X, o paciente 23 também apresentava a mutação c.35delG em heterozigose, sendo desta forma um heterozigoto composto que apresenta o genótipo 35delG/W172X.



Figura 29. Eletroferograma mostrando em destaque a alteração G>A na posição 516 em heterozigose.

4.4.3.10. Mutação c.35delG

Esta se trata da deleção de uma guanina na posição 35 do gene da Cx26, o que provoca uma alteração no quadro de leitura do gene. Ela foi detectada em homozigose em 14 pacientes e em heterozigose em 5, sendo previamente descrita por Zelante *et al.* em 1997. A figura abaixo (Figura 30) mostra os resultados do sequenciamento.

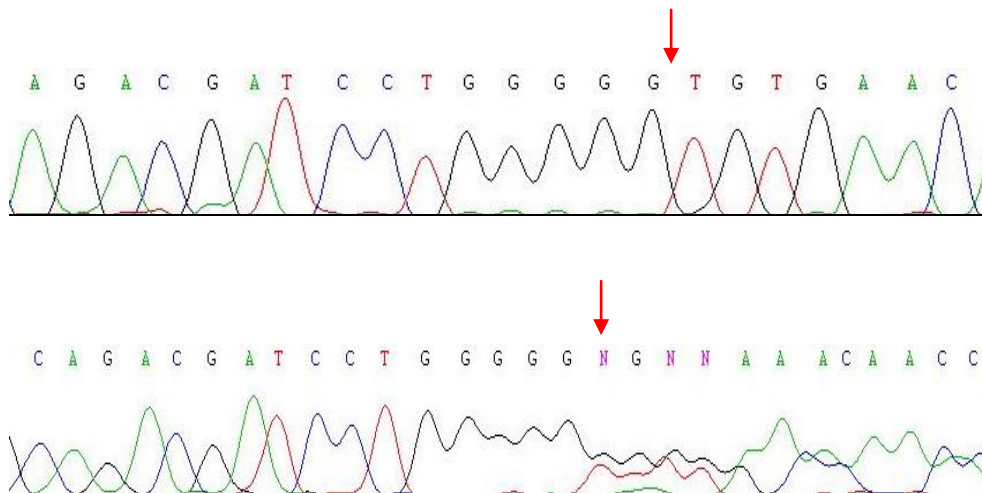


Figura 30. Eletroferogramas mostrando em destaque a presença da mutação c.35delG em homozigose (acima) e em heterozigose (abaixo).

4.4.4. Identificação da mutação m.1555A>G no gene mitocondrial *MTRNR1*

A mutação mitocondrial m.1555A>G foi detectada em apenas um dos indivíduos analisados, o paciente 80. A figura a seguir (Figura 31) ilustra o resultado obtido após a análise de restrição com a endonuclease *BsmAI*.

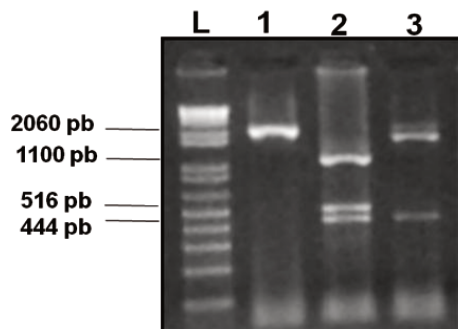


Figura 31. Gel de agarose mostrando os fragmentos gerados após a restrição enzimática para análise da mutação m.1555A>G. L= Marcador de peso molecular 1Kb *Plus DNA Ladder* (Invitrogen); 1= Controle sem digerir; 2= Controle sem a mutação; 3= Controle com a mutação.

Alterações genéticas foram encontradas em 31 pacientes (31%). Os resultados da análise molecular dos pacientes e parentais estão apresentados abaixo (Tabela 8).

Tabela 8. Resultados dos testes moleculares realizados nos pacientes e nos parentais. Em destaque estão as alterações genéticas encontradas.

Indivíduo	AS-PCR 35delG	Sequenciamento <i>GJB2</i> alelo1/alelo2	Deleções no gene <i>GJB6</i>		Gene <i>MTRNR1</i> A1555G
			del(<i>GJB6</i> - D13S1830)	del(<i>GJB6</i> - D13S1854)	
1	35delG / N	35delG / N	N / N	N / N	N
2	35delG / 35delG	35delG / 35delG	N / N	N / N	N
2 P	35delG / N	35delG / N	N / N	N / N	NR
2 M	35delG / N	35delG / N	N / N	N / N	NR
2 i	35delG / N	35delG / N	N / N	N / N	NR
3	35delG / 35delG	35delG / 35delG	N / N	N / N	N
4	N / N	N / N	N / N	N / N	N
5	N / N	N / N	N / N	N / N	N
6	N / N	N / N	N / N	N / N	N
7	35delG / 35delG	35delG / 35delG	N / N	N / N	N
8	N / N	*V153I / N	N / N	N / N	N
9	N / N	N / N	N / N	N / N	N
9 i	N / N	N / N	N / N	N / N	N
10	N / N	N / N	N / N	N / N	N
11	35delG / 35delG	35delG / 35delG	N / N	N / N	N
12	N / N	N / N	N / N	N / N	N
13	N / N	N / N	N / N	N / N	N
14	N / N	N / N	N / N	N / N	N
15	N / N	N / N	N / N	N / N	N
16	N / N	N / N	N / N	N / N	N
17	35delG / 35delG	35delG / 35delG	N / N	N / N	N
17 P	35delG / N	35delG / N	N / N	N / N	NR
17 M	35delG / N	35delG / N	N / N	N / N	NR
18	35delG / 35delG	35delG / 35delG	N / N	N / N	N
19	N / N	N / N	N / N	N / N	N

Indivíduo	AS-PCR 35delG	Sequenciamento <i>GJB2</i> alelo1/alelo2	Deleções no gene <i>GJB6</i>		Gene <i>MTRNR1</i> A1555G
			del(<i>GJB6</i> - D13S1830)	del(<i>GJB6</i> - D13S1854)	
20	N / N	N / N	N / N	N / N	N
21	N / N	N / N	N / N	N / N	N
22	35delG / 35delG	35delG / 35delG	N / N	N / N	N
23	35delG / N	35delG / W172X	N / N	N / N	N
23 P	N / N	W172X / N	N / N	N / N	NR
23 M	35delG / N	35delG / N	N / N	N / N	NR
23 i1	N / N	W172X / N	N / N	N / N	NR
23 i2	N / N	W172X / N	N / N	N / N	NR
24	35delG / N	35delG / N	N / N	N / N	N
25	N / N	*V153I / N	N / N	N / N	N
26	N / N	N / N	N / N	N / N	N
27	N / N	N / N	N / N	N / N	N
28	N / N	E47X / N	Hetero	N / N	N
29	35delG / N	35delG / N	Hetero	N / N	N
30	35delG / 35delG	35delG / 35delG	N / N	N / N	N
30 P	35delG / N	35delG / N	N / N	N / N	NR
30 M	35delG / N	35delG / N	N / N	N / N	N
31	N / N	N / N	N / N	N / N	N
32	35delG / 35delG	35delG / 35delG	N / N	N / N	N
32 M	35delG / N	35delG / N	N / N	N / N	N
33	N / N	N / N	N / N	N / N	N
34	N / N	N / N	N / N	N / N	N
35	N / N	N / N	N / N	N / N	N
36	N / N	*M34T / N	N / N	N / N	N
37	N / N	*V27I / N	N / N	N / N	N
38	35delG / 35delG	35delG / 35delG	N / N	N / N	N
39	N / N	N / N	N / N	N / N	N
40	35delG / 35delG	35delG / 35delG	N / N	N / N	N
41	35delG / 35delG	35delG / 35delG	N / N	N / N	N
42	N / N	N / N	N / N	N / N	N
43	N / N	N / N	N / N	N / N	N
44	35delG / 35delG	35delG / 35delG	N / N	N / N	N
45	N / N	N / N	N / N	N / N	N
46	N / N	N / N	N / N	N / N	N
47	35delG / 35delG	35delG / 35delG	N / N	N / N	N
48	N / N	N / N	N / N	N / N	N
49	N / N	N / N	N / N	N / N	N
50	N / N	N / N	N / N	N / N	N
51	N / N	L90P / N	N / N	N / N	N
52	N / N	K168R / N	N / N	N / N	N
53	N / N	N / N	N / N	N / N	N
54	N / N	N / N	N / N	N / N	N
55	N / N	N / N	N / N	N / N	N
56	N / N	*V27I / N	N / N	N / N	N
57	N / N	N / N	N / N	N / N	N
58	N / N	N / N	N / N	N / N	N
59	N / N	N / N	N / N	N / N	N
60	N / N	N / N	N / N	N / N	N
61	N / N	N / N	N / N	N / N	N
62	N / N	N / N	N / N	N / N	N
63	N / N	N / N	N / N	N / N	N
64	N / N	N / N	N / N	N / N	N
65	35delG / N	35delG / N	N / N	N / N	N
66	N / N	N / N	N / N	N / N	N
67	N / N	N / N	N / N	N / N	N
68	N / N	N / N	N / N	N / N	N

Indivíduo	AS-PCR 35delG	Sequenciamento <i>GJB2</i> alelo1/alelo2	Deleções no gene <i>GJB6</i>		Gene <i>MTRNR1</i> A1555G
			del(<i>GJB6</i> - D13S1830)	del(<i>GJB6</i> - D13S1854)	
69	N / N	V37I / V95M	N / N	N / N	N
69 P	N / N	V95M/N	N / N	N / N	N
69 M	N / N	V37I/N	N / N	N / N	N
69 i	N / N	V37I / V95M	N / N	N / N	N
70	N / N	*M34T / N	N / N	N / N	N
71	N / N	N / N	N / N	N / N	N
72	N / N	N / N	N / N	N / N	N
73	N / N	N / N	N / N	N / N	N
74	N / N	K168R / N	N / N	N / N	N
75	N / N	N / N	N / N	N / N	N
76	N / N	N / N	N / N	N / N	N
77	N / N	N / N	N / N	N / N	N
78	N / N	N / N	N / N	N / N	N
79	N / N	N / N	N / N	N / N	N
80	N / N	N / N	N / N	N / N	MUT
81	N / N	N / N	N / N	N / N	N
82	N / N	N / N	N / N	N / N	N
83	N / N	N / N	N / N	N / N	N
84	N / N	N / N	N / N	N / N	N
85	N / N	N / N	N / N	N / N	N
86	N / N	N / N	N / N	N / N	N
87	N / N	N / N	N / N	N / N	N
88	N / N	N / N	N / N	N / N	N
89	N / N	N / N	N / N	N / N	N
90	N / N	N / N	N / N	N / N	N
91	N / N	N / N	N / N	N / N	N
91 i1	N / N	N / N	N / N	N / N	N
91 i2	N / N	N / N	N / N	N / N	N
92	N / N	N / N	N / N	N / N	N
93	N / N	N / N	N / N	N / N	N
94	N / N	N / N	N / N	N / N	N
95	N / N	N / N	N / N	N / N	N
96	N / N	N / N	N / N	N / N	N
97	N / N	N / N	N / N	N / N	N
98	N / N	N / N	N / N	N / N	N
99	N / N	N / N	N / N	N / N	N
100	N / N	N / N	N / N	N / N	N
100 i	N / N	NR	N / N	N / N	N

NR: Não realizado; *: Polimorfismo.

As variações genéticas detectadas nos indivíduos estudados estão resumidas na Tabela 9. Em relação às alterações identificadas em genes nucleares, no caso os genes *GJB2* e *GJB6*, a mutação c.35delG foi encontrada em homozigose em 14 indivíduos e em heterozigose em 5, sendo 2 heterozigotos compostos, um deles no qual a mutação c.35delG estava presente juntamente com a p.W172X e outro no qual a mutação c.35delG estava presente juntamente com a del(*GJB6*-D13S1830). As alterações p.V27I, p.M34T e p.V153I foram detectadas em

heterozigose cada uma em 2 indivíduos, sendo estas polimorfismos já descritos. A variante p.K168R foi encontrada em heterozigose em 2 pacientes. As mutações p.V37I e p.V95M foram identificadas em heterozigose em 1 indivíduo. A alteração p.L90P foi detectada em heterozigose em 1 paciente. Em 1 indivíduo a mutação p.E47X foi encontrada em heterozigose juntamente com a del(*GJB6*-D13S1830). A del(*GJB6*-D13S1854) no gene *GJB6* não foi identificada em nenhum dos casos estudados.

Já a respeito de alterações em genes mitocondriais, a mutação m.1555A>G no gene *MTRNR1* foi detectada em 1 paciente.

A análise dos parentais auxiliou na confirmação e na visualização da segregação das alterações moleculares encontradas.

Tabela 9. Alterações moleculares identificadas nos pacientes estudados.

Alteração	Número de pacientes	Gene
35delG/35delG	14	<i>GJB2</i>
35delG/N	3	<i>GJB2</i>
*V27I/N	2	<i>GJB2</i>
*M34T/N	2	<i>GJB2</i>
*V153I/N	2	<i>GJB2</i>
K168R/N	2	<i>GJB2</i>
V37I/V95M	1	<i>GJB2</i>
L90P/N	1	<i>GJB2</i>
35delG/W172X	1	<i>GJB2</i>
35delG/ Δ (<i>GJB6</i> -D13S1830)	1	<i>GJB2/GJB6</i>
E47X/ Δ (<i>GJB6</i> -D13S1830)	1	<i>GJB2/GJB6</i>
A1555G	1	<i>MTRNR1</i>

*: Polimorfismo.

O número de casos nos quais as mutações genéticas explicaram a causa da perda auditiva, em relação ao total de pacientes em que foram encontradas alterações moleculares, para cada grupo, está listado a seguir (Tabela 10). Quanto aos indivíduos com perda auditiva congênita, foram encontradas alterações genéticas em 18 deles, sendo que em 16 puderam explicar a causa da surdez. Dentre os pacientes com perda progressiva, foram identificadas alterações em 8, sendo

que somente em 3 casos o diagnóstico pôde ser fechado. Já nos indivíduos com perda abrupta, foram identificadas alterações moleculares em 5 deles, porém estas não explicaram a causa da surdez em nenhum dos casos.

Tabela 10. Número de pacientes nos quais as alterações moleculares explicaram a causa da perda auditiva, para cada grupo.

	Congênita	Progressiva	Abrupta
Explicaram a perda auditiva	16	3	0
Total	18	8	5

Os exames genéticos foram importantes para estabelecer o diagnóstico etiológico da perda auditiva em 19 pacientes, o que representa 19% do total de casos analisados.

Dentre os 38 indivíduos com surdez congênita, 16 apresentaram mutações que puderam explicar o fenótipo. Já nos pacientes com deficiência auditiva progressiva, alterações foram identificadas em apenas 3 dos 44. E nos casos com perda abrupta não foi encontrada nenhuma variação genética que explicasse a perda auditiva. Dessa forma, o rendimento diagnóstico do rastreamento genético foi de 42% para as perdas auditivas congênitas, 7% para as progressivas, não tendo contribuição para as perdas abruptas.

Dentre os 100 pacientes analisados, 40 (40%) apresentavam histórico familiar de perda auditiva (Tabela 11). No entanto, somente em 10 casos foram identificadas alterações genéticas que puderam explicar a causa da surdez, sendo os outros 9 indivíduos em que foram encontradas mutações, casos esporádicos.

Tabela 11. Número de pacientes com histórico familiar de perda auditiva, para cada grupo.

	Nº de pacientes
Congênita	17
Progressiva	20
Abrupta	3
Total	40

4.5. Genotipagem utilizando a plataforma TaqMan® OpenArray®

Foi realizada a genotipagem utilizando a plataforma TaqMan® OpenArray® em todos os 100 indivíduos que fizeram parte do estudo. O *layout* escolhido para a análise foi o de 32 ensaios para 96 amostras, porém a técnica ainda está em fase de desenvolvimento e padronização e só foi possível analisar 18 alterações genéticas (Tabela 12). Dentre estas, estavam a mutação mitocondrial m.1555A>G no gene *MTRNR1* e 17 alterações no gene *GJB2*, que são as mais comuns na população brasileira. No entanto, não estava disponível o ensaio para a mutação c.35delG, que é uma das mais frequente associada à perda auditiva, e dessa forma, não foi possível analisá-la pela técnica TaqMan® OpenArray®.

Tabela 12. Alterações genéticas analisadas pela técnica TaqMan® OpenArray® Genotyping.

Gene	Alteração	
<i>GJB2</i>	p.V95M	c.283G>A
	p.S113R	c.339T>G
	p.M93I	c.279G>A
	p.W24X	c. 286G>A
	p.E147K	c.439G>A
	p.N206S	c.617A>G
	p.E129K	c.385G>A
	p.V37I	c.109G>A
	p.V27I	c.79G>A
	p.L90P	c.269T>C
	p.R184W	c.550C>G
	p.R184P	c.551G>C
	p.W172X	c.516G>A
	p.R75Q	c.224G>A
	p.M34T	c.101T>C
	p.V153I	c.457G>A
	p.K168R	c.503A>G
<i>MTRNR1</i>	m.A1555G	m.1555A>G

Como é desenhado um par de *primers* comum, além de duas sondas diferentes por ensaio, uma para a sequência normal, contendo o fluoróforo VIC®, e uma para a sequência mutante,

contendo o fluoróforo FAM®, o seguinte padrão é obtido: nos pacientes homozigotos normais somente o fluoróforo VIC® é detectado, nos homozigotos mutantes somente o FAM® é identificado, e nos heterozigotos ambos os fluoróforos são detectados.

A leitura da placa de OpenArray® gera um arquivo com o mesmo número do código de barras da lâmina na extensão .spd contendo todos os dados do ensaio. Além deste, o OpenArray NT Cyclor® gera várias imagens que servem como comprovação de que o ensaio foi depositado pela empresa na placa e para mostrar se houve algum erro de pipetagem, tanto do operador, quanto do AccuFill®. As imagens geradas são:

- TSpotFind.tif: imagem que mostra o posicionamento da lâmina dentro do OpenArray NT Cyclor®, para a verificação se a mesma está no local correto para a captura da imagem;
- DarkImage.tif: imagem da câmera onde a lâmina se encontra, para a verificação se há a entrada de algum tipo de luminosidade externa no interior do OpenArray NT Cyclor®;
- TROX.tif: imagem para a confirmação de que os ensaios foram depositados na lâmina de OpenArray® pela empresa;
- TVIC.tif: imagem que mostra a fluorescência VIC® capturada pela leitura;
- TFAM.tif: imagem que mostra a fluorescência FAM® capturada pela leitura.

A figura abaixo (Figura 32) mostra as imagens geradas após a leitura do ensaio.

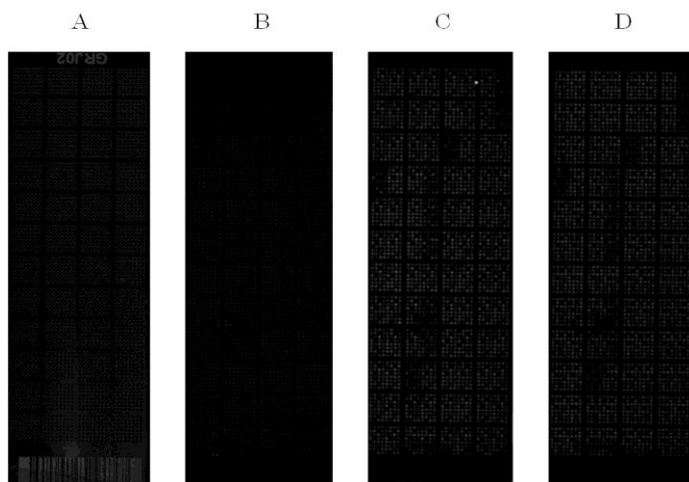


Figura 32. Imagens geradas após o ensaio de OpenArray®. A= Imagem que mostra o posicionamento da lâmina dentro do OpenArray NT Cyclor®; B= Imagem para a confirmação de que os ensaios foram depositados na lâmina; C= Imagem que mostra a fluorescência VIC® capturada pela leitura; D= Imagem que mostra a fluorescência FAM® capturada pela leitura.

O arquivo com extensão .spd é importado para a leitura no software TaqMan® OpenArray® Genotyper, disponível no site da Applied Biosystems (<https://www.lifetechnologies.com>). Já os arquivos de extensão podem ser abertos em qualquer software de visualização de imagem que suporte esta extensão.

Após a captura da fluorescência emitida nas reações o resultado foi analisado no software TaqMan® OpenArray® Genotyper, onde é gerado um gráfico diferente para cada ensaio (Figura 33).

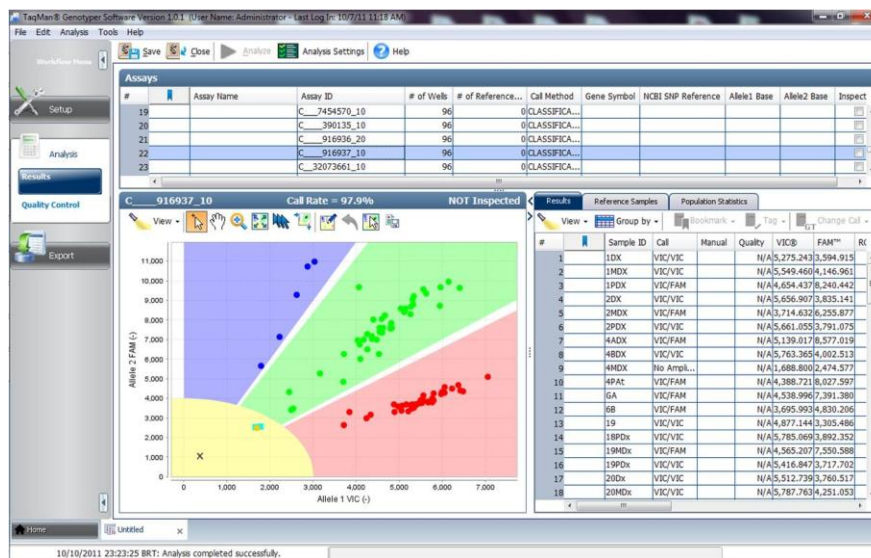


Figura 33. Resultado gerado no software TaqMan® OpenArray® Genotyper após a realização dos ensaios. Em azul estão representados os pacientes homozigotos mutantes, nos quais somente fluoróforo o FAM® foi detectado; em vermelho os homozigotos normais, nos quais só o VIC® foi identificado; e em verde os heterozigotos, nos quais ambos os fluoróforos foram detectados.

Após a análise dos resultados, foi confirmada a maioria das alterações genéticas encontradas no estudo molecular prévio dos pacientes. No entanto, em 7 pacientes não foi possível obter resultados e, em outros 7, o resultado de um ou dois ensaios não foi válido. Dessa forma o rendimento apresentado pela técnica de OpenArray® foi de 86%. Esse número poderia ter sido maior, porém algumas amostras eram antigas e, a qualidade estava ruim, ou não

apresentavam a concentração mínima necessária para a realização dos ensaios, o que invalidou alguns resultados.

Apesar da técnica ainda estar em fase de desenvolvimento e padronização, já se mostrou uma ferramenta eficaz na detecção de alterações genéticas em larga escala, o que significa que apresenta um grande potencial para o diagnóstico molecular da perda auditiva.

4.6. Etiologia das perdas auditivas

Inicialmente, dos 100 pacientes analisados, 72% (72) apresentavam a etiologia desconhecida, e em apenas 28% (28) a origem foi presumida ou identificada na anamnese e/ou avaliação clínica. Após a realização dos exames de imagem e genéticos, o número de indivíduos com a etiologia da perda auditiva não esclarecida foi reduzido de 72 para 42, o que representou uma redução de quase 42%. Dos 100 indivíduos, 42% (42) permaneceram com a etiologia desconhecida, enquanto a origem foi identificada em 58 pacientes (58%) (Figura 34).

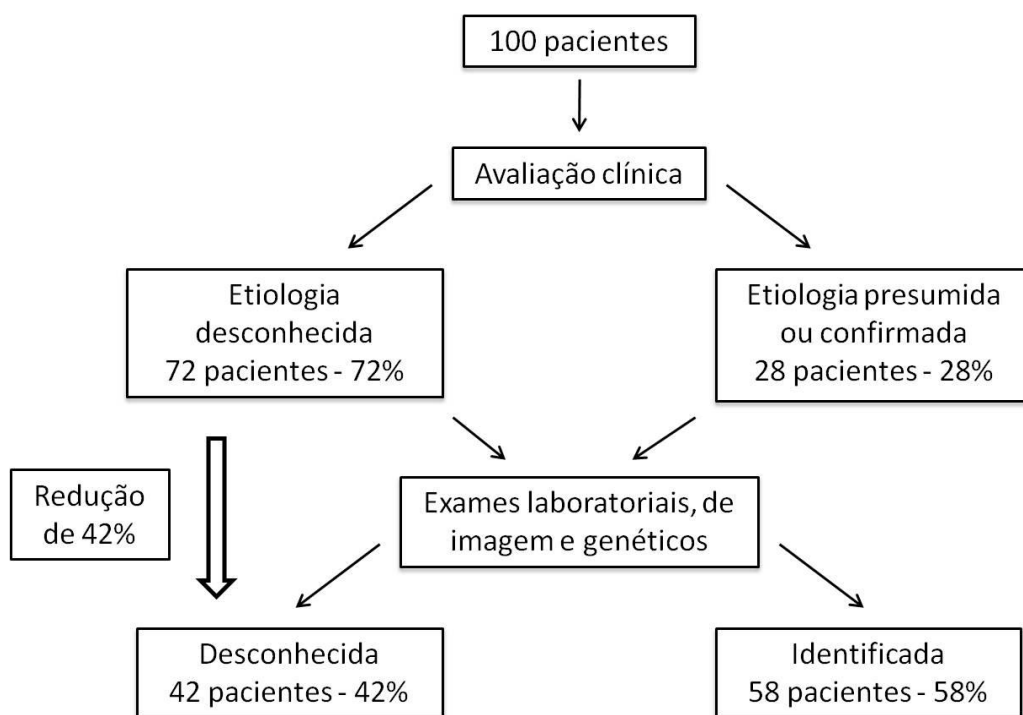


Figura 34. Esquema ilustrando a investigação da etiologia e diagnóstico das perdas auditivas nos pacientes envolvidos no estudo.

Em resumo, quanto à etiologia, esta não foi esclarecida em 42% dos casos, em 25% foi de origem ambiental, 19% genética e em 14% malformações ou outros problemas na orelha interna. O perfil etiológico das perdas auditivas encontrado nos indivíduos estudados está relacionado a seguir (Tabela 13).

Tabela 13. Perfil etiológico das perdas auditivas.

Etiologia	Número de pacientes
Desconhecida	42 (42%)
Genética	19 (19%)
Infecção pré-natal (rubéola e CMV)	8 (8%)
Otosclerose	6 (6%)
Medicação ototóxica	5 (5%)
Infecção pós-natal (meningite)	4 (4%)
Aqueduto vestibular alargado	4 (4%)
Outras manifestações (Osteogênese imperfeita, S. Usher e Ménière)	3 (3%)
Prematuridade/UTI neonatal	3 (3%)
Trauma	3 (3%)
Mondini	1 (1%)
Anóxia	1 (1%)
Agente teratogênico	1 (1%)

Agrupando os casos em perdas auditivas do tipo congênita, progressiva ou abrupta, podemos obter um perfil etiológico mais individualizado para cada grupo (Figura 35).

Dentre os 38 pacientes com surdez congênita, a principal etiologia encontrada foi a genética, presente em 42% (16) dos casos, seguida pela ambiental em 29% (11), desconhecida em 26% (10), e malformações ou outros problemas na orelha interna em 3% (1) dos indivíduos.

Já em relação aos 44 pacientes com deficiência auditiva progressiva, em 68% (30) a etiologia não foi esclarecida, em 20,5% (9) foi decorrente de malformações ou outros problemas na orelha interna, em 7% (3) genética e em 4,5% (2) ambiental.

E dentre os 18 indivíduos com perda auditiva abrupta, os fatores ambientais foram os principais envolvidos, sendo identificados em 67% (12) dos casos, seguidos pelas malformações

ou outros problemas na orelha interna, em 22% (4). A etiologia não foi esclarecida em 11% (2) dos indivíduos e não foram encontradas alterações genéticas em nenhum dos pacientes.

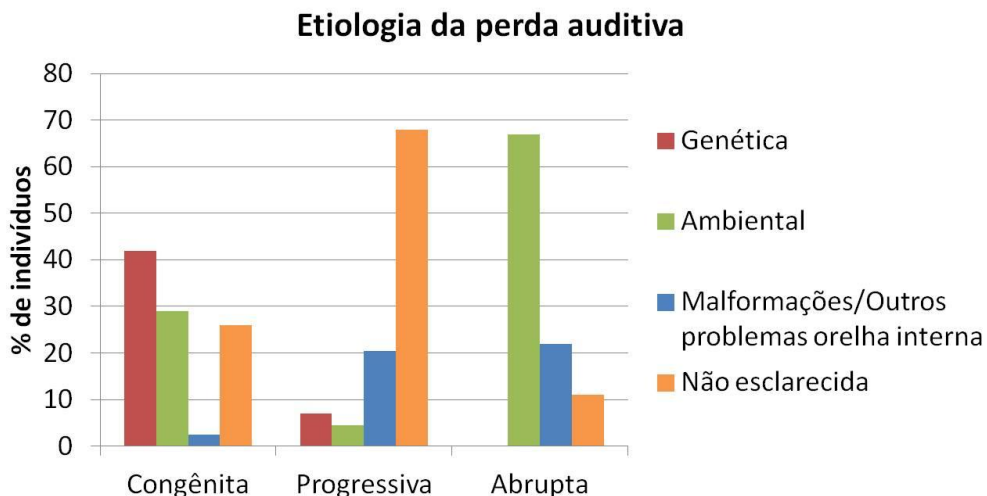


Figura 35. Representação gráfica do perfil etiológico das perdas auditivas congênitas, progressivas e abrupas.

4.7. Custo dos exames específicos

O custo para a realização dos exames de imagem, tomografia computadorizada e ressonância magnética, é de cerca de R\$1.100,00 na rede privada. Já na rede pública (Sistema Único de Saúde – SUS) os mesmos exames são realizados por R\$ 400,00.

Para a realização completa dos exames laboratoriais é estimado um valor de aproximadamente R\$300,00. Já na rede pública (Sistema Único de Saúde – SUS), o custo para a realização dos exames laboratoriais é de R\$ 150,00.

E para o rastreamento das principais mutações associadas à perda auditiva o custo é de aproximadamente R\$1.000,00, sendo que para a detecção somente da mutação c.35delG o valor é de R\$ 84,00.

Dessa forma, para a realização concomitante de todos estes exames específicos é estimado um gasto de R\$ 2.400,00, na rede privada, e de R\$ 1.550,00, na rede pública. Os valores dos exames específicos na rede privada foram estimados com base na média dos custos encontrados

no mercado. Já o cálculo para a realização desses exames na rede pública foi baseado na tabela de procedimentos do SUS (SIGTAP – Sistema de gerenciamento da tabela de procedimentos, medicamentos e OPM do SUS. Disponível em: <www.datasus.gov.br>).

4.8. Rendimento dos exames de imagem e genéticos

Como referido anteriormente, o rendimento diagnóstico do rastreamento genético foi de 42% para as perdas auditivas congênicas, 7% para as progressivas, não tendo contribuição para as perdas abruptas. Já a contribuição diagnóstica da tomografia computadorizada e da ressonância magnética foi de 10% para as perdas auditivas congênicas, 18% para as progressivas, e 44,5% para as perdas abruptas.

A relação entre o rendimento diagnóstico do rastreamento genético e dos exames de imagem está representada abaixo (Figura 36), para as perdas auditivas congênicas, progressivas e abruptas. Como pode ser visto, os testes moleculares contribuíram principalmente para o diagnóstico dos pacientes com perda auditiva congênita, enquanto os exames radiológicos tiveram maior contribuição para os casos com perda progressiva ou abrupta.

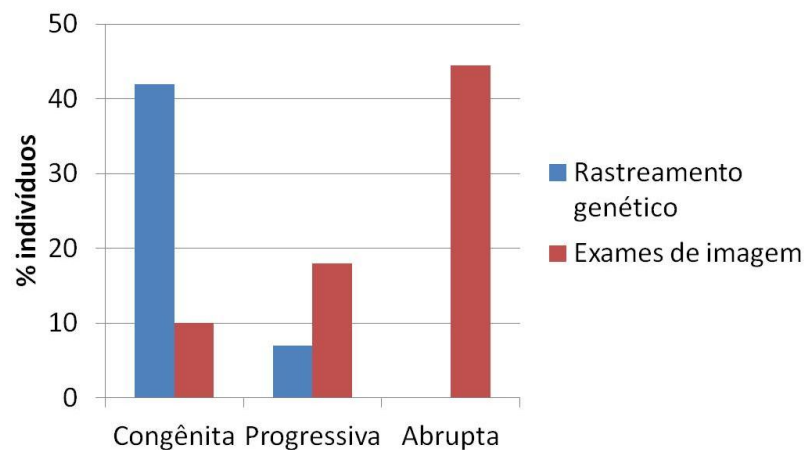


Figura 36. Representação gráfica do rendimento diagnóstico do rastreamento genético e dos exames de imagem.

Especificamente em relação ao rendimento dos exames genéticos, nos pacientes com surdez congênita, a mutação c.35delG em homozigose (35delG/35delG) foi a principal responsável pela perda auditiva (34% dos casos). Em seguida, estavam as mutações nos genes *GJB2* e *GJB6* (5,2%) (heterozigotos compostos), e por último, outras mutações bialélicas no gene *GJB2* (2,6%). Já nos pacientes com perda progressiva, a mutação c.35delG em homozigose (35delG/35delG), outras mutações no gene *GJB2* e a mutação mitocondrial m.1555A>G estavam envolvidas em 2% dos casos, e nos pacientes com perda abrupta os testes moleculares não tiveram contribuição (Figura 37).

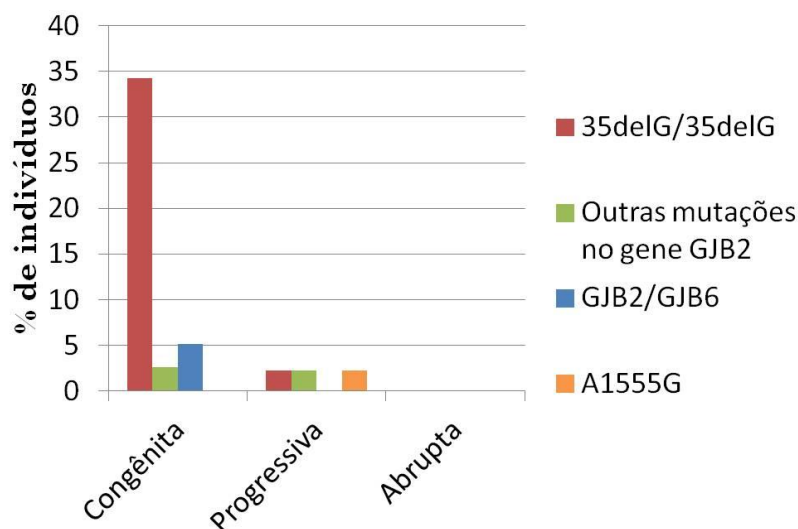


Figura 37. Representação gráfica do rendimento diagnóstico do rastreamento genético.

Para a amostra estudada, após a realização dos exames de imagem e genéticos, foi encontrado um perfil etiológico diferente para cada grupo. Se forem desconsiderados os casos com etiologia não esclarecida, é possível delinear e iniciar a fundamentação de um protocolo diagnóstico.

Dentre os indivíduos com surdez congênita, a principal etiologia encontrada foi a genética, seguida pela ambiental, e por último, as malformações ou outros problemas da orelha interna. Já em relação aos pacientes com perda auditiva progressiva, as malformações ou outros problemas na orelha interna foram os principais fatores envolvidos, seguidos pelos genéticos, e

por último, os ambientais. E dentre os casos com perda abrupta, as principais causas identificadas foram ambientais, seguidas pelas malformações ou outros defeitos da orelha interna. Não foram encontradas alterações genéticas nesses pacientes.

4.9. Protocolo diagnóstico

Com base na contribuição dos exames de imagem e genéticos, e nos achados etiológicos para cada grupo (congenita, progressiva e abrupta), foi elaborado um protocolo diagnóstico sequencial para indivíduos com perda auditiva neurosensorial severa a profunda bilateral (Figura 38).

Inicialmente, deve ser feita uma anamnese detalhada a fim de se excluir todos os possíveis fatores ambientais, para só então, prosseguir com os exames específicos.

Frente a um indivíduo com deficiência auditiva congênita, primeiramente deve ser feito o rastreamento da mutação c.35delG. Se essa alteração estiver presente em homozigose, o diagnóstico já será fechado. Se estiver ausente ou for encontrada em heterozigose, as deleções no gene *GJB6*, outras mutações no gene *GJB2* e a mutação mitocondrial m.1555A>G deverão ser pesquisadas. Os pacientes que apresentarem alterações moleculares devem ser encaminhados para o aconselhamento genético. Os exames de imagem devem ser solicitados por último, nos casos em que não forem encontradas causas genéticas.

Já no caso de pacientes com perda auditiva progressiva ou abrupta, os exames de imagem devem ser os primeiros a serem solicitados. Nos que forem identificadas alterações radiológicas, o tratamento apropriado deve ser seguido, e somente nos indivíduos que não apresentarem alterações, o rastreamento genético deve ser realizado. Os casos positivos para alterações moleculares devem ser encaminhados para o aconselhamento genético.

Exames laboratoriais devem ser solicitados em casos específicos, com base na história clínica do paciente.

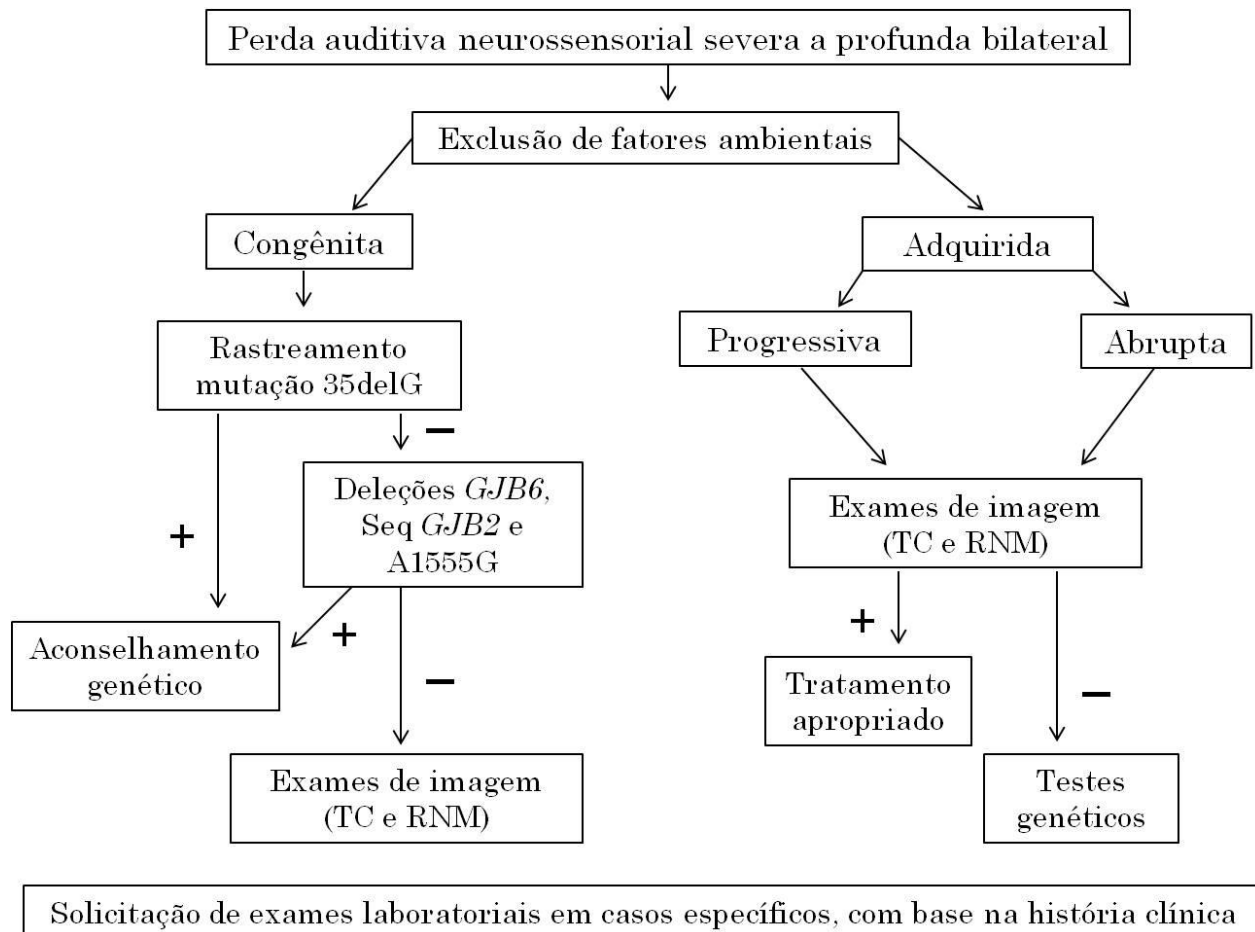


Figura 38. Protocolo diagnóstico para a avaliação de indivíduos com perda auditiva neurossensorial severa a profunda bilateral.

DISCUSSÃO

5. DISCUSSÃO

Este estudo realizado com pacientes submetidos ao implante coclear no Ambulatório de Otorrinolaringologia do HC da UNICAMP, com o objetivo de avaliar a eficácia dos exames de imagem e genéticos, e seu impacto em Saúde Pública, bem como estabelecer um protocolo diagnóstico, visando maior eficiência e redução de custos na determinação da etiologia das perdas auditivas, tem caráter inédito.

Identificar a causa da perda auditiva, em especial em nosso meio, pela diversidade epidemiológica e falta de informação da população, nem sempre é uma tarefa simples. Assim, é interessante dispor de um grande arsenal para diagnóstico, abrangendo, além da avaliação clínica e audiológica, também exames laboratoriais, de imagem e genéticos.

Entretanto, a realização concomitante de exames específicos, embora amplie a chance diagnóstica, onera o Sistema de Saúde, devido ao alto custo. Deste modo, é de extrema relevância para as Políticas Públicas, a avaliação da eficácia destes testes na determinação da etiologia da deficiência auditiva.

Para isso, estudos internacionais propuseram a solicitação de exames laboratoriais em casos específicos e estabeleceram protocolos e algoritmos para a solicitação de exames de imagem e genéticos, com o intuito de otimizar o diagnóstico e diminuir o stress da família e/ou do paciente com deficiência auditiva (Mafong *et al.*, 2002; Preciado *et al.*, 2005).

Dessa forma, o presente trabalho pretendeu propor um protocolo diagnóstico, com base em uma amostra de indivíduos brasileiros nos quais uma metodologia completa e uniforme foi seguida, com o intuito de aumentar a eficiência e reduzir os custos na determinação da etiologia da deficiência auditiva.

Inicialmente, dos 100 pacientes analisados, 72% apresentavam a etiologia desconhecida, e em apenas 28% a origem foi presumida ou identificada na anamnese e/ou avaliação clínica. Após a realização dos exames de imagem e genéticos, esse resultado foi alterado, o número de indivíduos com a etiologia da perda auditiva não esclarecida foi reduzido de 72 para 42, o que representou redução de quase 42%. Em resumo, quanto à etiologia, esta não foi esclarecida em 42% dos casos, em 25% foi de origem ambiental, 19% genética e 14% malformações ou outros problemas na orelha interna.

No Brasil, os fatores ambientais estão entre as principais causas de perda auditiva, incluindo, entre outros, infecções congênitas, fatores perinatais e pós-natais (Simões & Maciel-Guerra, 1992; Collela-Santos *et al.*, 2011). Como era de se esperar, nos pacientes analisados os fatores ambientais foram os principais envolvidos (25%), superando os de origem genética (19%). Nos países desenvolvidos é estimado que aproximadamente 60% dos casos sejam causados por fatores genéticos, porém nos países em desenvolvimento ainda há maior prevalência dos fatores ambientais como causa das perdas auditivas (Finsterer & Fellingner, 2005; Hilgert *et al.*, 2009a; Smith *et al.*, 2010).

À medida que vêm sendo implantadas melhorias no setor de saúde, e com o avanço e o aprofundamento nos estudos genéticos relacionados às perdas auditivas, a proporção de causas genéticas tende a aumentar.

Dentre os indivíduos com surdez congênita, a principal etiologia encontrada foi a genética, seguida pela ambiental, e por último, as malformações ou outros problemas da orelha interna. Já em relação aos pacientes com perda auditiva progressiva, as malformações ou outros problemas na orelha interna foram os principais fatores envolvidos, seguidos pelos genéticos, e por último, os ambientais. E dentre os casos com perda abrupta, as principais causas identificadas foram ambientais, seguidas pelas malformações ou outros defeitos da orelha interna, não sendo encontradas alterações genéticas nesses pacientes.

A forma mais comum de surdez neurosensorial congênita é decorrente de alterações no gene que codifica a proteína Cx26 (Smith *et al.*, 2010; Richardson *et al.*, 2011). 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 (Denoyelle *et al.*, 1997; Hilgert *et al.*, 2009a). A mutação mais frequente é a c.35delG, que corresponde a 70% das alterações encontradas nesse gene, na população caucasiana (Wilcox *et al.*, 2000). Neste trabalho, foi confirmada a alta prevalência de mutações no gene *GJB2*, especialmente da mutação c.35delG, nos casos de perda auditiva neurosensorial severa a profunda bilateral.

De acordo com a literatura, as análises do gene *GJB2* em pacientes com perda auditiva, demonstram heterozigose em aproximadamente 10 a 42% dos casos, a despeito de que a maioria das mutações são recessivas (Wilcox *et al.*, 2000). No presente estudo, 14% (14) dos indivíduos analisados apresentavam alterações no gene da Cx26 em heterozigose. Quanto a esses pacientes,

muitos ficaram sem explicações considerando que apenas poucos genes foram rastreados, do total de mais de 100 genes relacionados à surdez. Entretanto, em alguns desses indivíduos heterozigotos foi possível diagnosticar a causa da surdez devido à presença de outra alteração encontrada no próprio gene *GJB2* ou no gene *GJB6*.

A pesquisa das deleções no gene *GJB6* está indicada principalmente em pacientes com perda auditiva que apresentam uma única mutação no gene da Cx26. A del(*GJB6*-D13S1830), foi encontrada em 2 pacientes que apresentavam também as mutações c.35delG e p.E47X em heterozigose no gene *GJB2*. Porém, a deleção del(*GJB6*-D13S1854) não foi identificada em nenhum dos indivíduos analisados.

A mutação mitocondrial m.1555A>G foi detectada em apenas 1% (1) dos pacientes estudados, no entanto, é sempre interessante o seu rastreamento já que essa alteração está associada à susceptibilidade a perda auditiva induzida por aminoglicosídeos, especialmente em países nos quais há maior uso desses antibióticos, como é o caso do Brasil.

Foi verificado que os testes moleculares contribuíram principalmente para o diagnóstico dos pacientes com perda auditiva congênita, enquanto os exames radiológicos tiveram maior contribuição para os casos com perda progressiva ou abrupta.

De acordo com dados da literatura, a maioria dos casos de perda auditiva pré-lingual apresenta padrão de herança autossômico recessivo, enquanto a maioria dos casos pós-linguais segue padrão de herança autossômico dominante (Finsterer & Fellingner, 2005). Como a maioria dos genes pesquisados neste trabalho está associada ao padrão de herança autossômico recessivo, a maior parte dos casos de perda pré-lingual congênita pôde ser explicada, sendo dessa forma, decorrente de fatores genéticos. Já nos casos com perda progressiva ou abrupta, geralmente pós-linguais, a pesquisa genética não teve grande contribuição. Talvez se outros genes fossem analisados, a base genética desses casos poderia ser explicada. No entanto, há especial dificuldade em se estudar genes envolvidos com o padrão de herança autossômico dominante pelo fato de não existir um forte candidato que esteja mais frequentemente associado. E ainda, os casos com esse padrão de herança normalmente apresentam expressividade variável, o que dificulta a sua identificação.

Além disso, a surdez pré-lingual é normalmente severa a profunda e não está associada com exames de imagem alterados (Bitner-Glindzicz, 2002), enquanto a perda auditiva abrupta ou rapidamente progressiva pode ser observada em associação com alterações no osso temporal

(como na síndrome de Pendred e na síndrome brânquio-oto-renal), neoplasmas, trauma, infecções, distúrbios metabólicos, neurológicos ou circulatórios (Smith *et al.*, 2010). Dessa forma, isso explica o porquê dos exames de imagem apresentarem maior contribuição no diagnóstico dos casos com perda progressiva ou abrupta.

Em relação às alterações radiológicas, o aqueduto vestibular alargado foi a malformação mais comum da orelha interna associada à perda auditiva, o que corrobora com os dados da literatura (Pinto *et al.*, 2005; Preciado *et al.*, 2005; Silva *et al.*, 2008; Wu *et al.*, 2008).

Além disso, no presente trabalho, mesmo com uma investigação detalhada, um grande número de casos foi tido como idiopático (42%). Estudos mostram que a etiologia não é esclarecida em 32 a 40% dos indivíduos brasileiros com perda auditiva (Pupo *et al.*, 2008; Calháu *et al.*, 2011). A alta prevalência da etiologia desconhecida aponta para a necessidade de um aprofundamento no diagnóstico molecular, na tentativa de esclarecer a real etiologia.

O protocolo sequencial permite a otimização do diagnóstico etiológico e redução dos custos, ao contrário da realização concomitante de exames de imagem, laboratoriais e genéticos. A realização de todos os exames específicos, simultaneamente, implicaria em um gasto de R\$ 1.550,00 (rede pública) a R\$ 2.400,00 (rede privada), sendo que, por exemplo, nos casos de surdez congênita a maioria pode ser resolvida através da detecção da mutação c.35delG, ao custo de R\$84,00. Já para os pacientes com perdas adquiridas, como os testes genéticos não se mostram muitos eficazes, a investigação deve ser iniciada com os exames de imagem. E ainda, os exames laboratoriais, como sugerem vários estudos, apresentam um baixo rendimento diagnóstico, devendo ser solicitados somente em casos específicos, de acordo com a história clínica.

Apesar da técnica de genotipagem TaqMan® OpenArray® ainda estar em fase de desenvolvimento e padronização, já se mostrou eficaz na detecção de alterações genéticas em larga escala, o que sugere grande potencial para o diagnóstico molecular da perda auditiva. Ela 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.

Além disso, investigar os principais fatores etiológicos que levam à perda auditiva na população estudada é de grande relevância para o prognóstico do tratamento, no caso, do implante coclear, e serve como material para futuras ações de saúde pública.

O resultado de desempenho com o implante coclear pode variar significativamente de indivíduo para indivíduo. Dessa forma, uma série de fatores tem sido proposta como tendo

influência nesses resultados, incluindo idade do implante, duração do uso do implante, quantidade de audição residual, principal modo de comunicação antes da operação, presença de certas malformações na orelha interna, entre outros (Wu *et al.*, 2008).

Os testes genéticos e de imagem são dois fatores predominantes que determinam o desempenho a longo prazo da percepção e desenvolvimento da fala em crianças implantadas. Algumas malformações que podem ser diagnosticadas através de exames de imagem, geralmente estão associadas a um pior resultado, enquanto que crianças com perda auditiva decorrente de mutações genéticas, como por exemplo, nos genes *GJB2*, *GJB6* ou *SLC26A4*, no geral, exibem excelente resultado (Bauer *et al.*, 2003; Wu *et al.*, 2008; Reinert *et al.*, 2010; Vivero *et al.*, 2010).

Dessa forma, o diagnóstico genético pode contribuir consideravelmente para o prognóstico desses pacientes. A identificação precoce de mutações específicas através do diagnóstico molecular diminui a necessidade de outros testes clínicos. Além disso, facilita as previsões quanto à progressão da perda auditiva e de outras alterações, no caso da surdez síndrômica. Esses achados reforçam a importância do diagnóstico genético, que pode propiciar um tratamento precoce para crianças, como por exemplo, o implante coclear, e aconselhamento genético para as famílias dos afetados (Raviv *et al.*, 2010).

Espera-se que os resultados obtidos com este trabalho, após ter traçado o panorama da surdez na população estudada, possam auxiliar no diagnóstico etiológico e ajudar a estabelecer critérios e protocolos com a intenção de diminuir os custos na tarefa diagnóstica. Isso implicará na redução de custos com alto impacto em Saúde Pública, podendo-se, dessa maneira, estender o método à maioria da nossa população.

CONCLUSÕES

6. CONCLUSÕES

Tanto os exames de imagem quanto os genéticos foram importantes para a identificação da etiologia das perdas auditivas. No entanto, os testes moleculares contribuíram principalmente para o diagnóstico dos pacientes com surdez congênita, enquanto os exames radiológicos tiveram maior contribuição para os casos com perda progressiva ou abrupta.

Dentre os indivíduos com surdez congênita, a principal etiologia encontrada foi a genética. Já nos pacientes com perda progressiva, as malformações ou outros problemas na orelha interna foram os principais fatores envolvidos. E dentre os casos com perda abrupta, as principais causas identificadas foram ambientais, seguidas pelas malformações ou outros problemas na orelha interna.

Foi confirmada a alta prevalência de mutações no gene *GJB2*, especialmente da mutação c.35delG, nos casos de perda auditiva neurossensorial severa a profunda bilateral.

A pesquisa molecular teve importante contribuição no diagnóstico etiológico da surdez, além de possibilitar o aconselhamento genético e sugerir melhor prognóstico para o implante coclear, como observado em estudos prévios.

A técnica de genotipagem TaqMan® OpenArray® 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.

O protocolo sequencial permite a otimização do diagnóstico etiológico e redução dos custos, ao contrário da realização concomitante de exames de imagem, laboratoriais e genéticos. Para os casos com surdez neurossensorial severa a profunda bilateral congênita a pesquisa de mutações no gene da Cx26 (*GJB2*) deve ser o primeiro exame solicitado. Já nos casos de perda auditiva progressiva ou abrupta a investigação deve ser iniciada com exames de imagem.

Mesmo com uma investigação detalhada, a etiologia desconhecida continuou prevalecendo, o que aponta para a necessidade de estudos moleculares mais aprofundados, para que a real causa possa ser esclarecida.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abe, S; Usami, S; Shinkawa, H; Kelley, PM; Kimberling, WJ. Prevalent connexin 26 gene (GJB2) mutations in Japan. *J Med Genet*, 37: 41-43, 2000.
- Abreu-Silva, RS; Lezirovitz, K; Braga, MC; Spinelli, M; Pirana, S; Della-Rosa, VA; Otto, PA; Mingroni-Netto, RC. Prevalence of the A1555G (12S rRNA) and tRNA^{Ser}(UCN) mitochondrial mutations in hearing impaired Brazilian patients. *Braz J Med Biol Res*, 39(2): 219-226, 2006.
- Alberts, B; Johnson, A; Lewis, J; Raff, M; Roberts, K; Walter, P. *Molecular Biology of the Cell*, New York: Garland Science, 2002.
- Ammar-Khodja, F; Faugère, V; Baux, D; Giannesini, C; Léonard, S; Makrelouf, M; Malek, R; Djennaoui, D; Zenati, A; Claustres, M; Roux, AF. Molecular screening of deafness in Algeria: High genetic heterogeneity involving DFNB1 and the Usher loci, DFNB2/USH1B, DFNB12/USH1D and DFNB23/USH1F. *European Journal of Medical Genetics*, 52: 174–179, 2009.
- Anderson, S; Bankier, AT; Barrel, BG; Bruijn, MHL; Coulson, AR; Drouin, J; Eperon, IC; Nierlich, DP; Roe, BA; Sanger, F; Schreier, PH; Smith, AJ; Staden, R; Young, IG. Sequence and organization of the human mitochondrial genome. *Nature*, 290: 457-65, 1981.
- Ardle, BM & Bitner-Glindzicz, M. Investigation of the child with permanent hearing impairment. *Arch Dis Child Educ Pract Ed*, 95: 14-23, 2010.
- Audiometric Test and Diagnostic Workup. In: Willems, PJ (Ed.). *Genetic Hearing Loss*. New York: Marcel Dekker, Inc, 2004.

- Bauer, PW; Geers, AE; Brenner, C; Moog, JS; Smith, RJH. The effect of GJB2 allele variants on performance after cochlear implantation. *Laryngoscope*, 113: 2135-2141, 2003.
- 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.
- Beltramello, M; Piazza, V; Bukauskas, FF; Pozzan, T; Mammano, F. *Nat Cell Biol*, 7: 63-69, 2005.
- 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/>>. Acesso em: Novembro/2011.
- Béria, JU; Raymann, BCW; Gigante, LP; Figueiredo, ACL; Jotz, G; Roithman, R; *et al.* Hearing impairment and socioeconomic factors: a population based survey of an urban locality in southern Brazil. *Rev Panam Salud Publica*, 21: 381-7, 2007.
- Beyer, EC. Gap junctions. *International Review of Cytology*, 137: 1-37, 1993.
- Beyer, EC; Lipkind, GM; Kyle, JW; Berthoud, VM. Structural organization of intercellular channels II. Amino terminal domain of the connexins: sequence, functional roles, and structure. *Biochimica et Biophysica Acta*, 2011, doi: 10.1016/j.bbamem.2011.10.011.
- Beyer, EC; Paul, DL; Goodnough, DA. Connexin 43: a protein from rat heart homologous to a gap junction protein from liver. *The Journal of Cell Biology*, 105: 2621-2629, 1987.
- Bitner-Glindzicz, M. Hereditary deafness and phenotyping in humans. *Br Med Bull*, 63: 73-94, 2002.

- Brianti, MT. Estudo da frequência de mutações mitocondriais em brasileiros portadores de deficiência auditiva neurossensorial não-sindrômica de etiologia não esclarecida. Campinas, SP: [s.n.], 2003.
- Brobby, GW; Muller-Myhsok, B; Horstmann, RD. Connexin 26 R143W mutation associated with recessive nonsyndromic sensorineural deafness in Africa. *N Engl J Med*, 338: 548-550, 1998.
- Calháu, CMDF; Lima-Júnior, LRP; Reis, AMCS; Capistrano, AKB; Lima, DVSP; Calháu, ACDF; Rodrigues-Júnior, FA. Etiology profile of the patients implanted in the cochlear implant program. *Braz J Otorhinolaryngol*, 77(1): 13-8, 2011.
- Castiquini, EAT; Silveira, TS; Shayeb, DR; Meyer, ASA. Audiologic Evaluation in Individuals with Ear Abnormalities. *Intl Arch Otorhinolaryngol*, 10(2), p. 98-103, 2006.
- Collela-Santos, MF; Françoço, MFC; Couto, CM; Lima, MCMP; Tazinazzio, TG; Castilho, AM; Sartorato, EL. Estudo audiológico e genético de lactentes de alto risco. *Revista Brasileira de Otorrinolaringologia*, 77(6): 784-791, 2011.
- Costa Filho, OA; Bevilacqua, MC; Moreti, ALM. Critérios de seleção de crianças candidatas ao implante coclear do Hospital de Pesquisa e Reabilitação de Lesões Lábio Palatais – USP. *Rev Bras Otorrinolaring*, v. 62, n. 4, p. 306-313, 1996.
- Costa Filho, OA; Bevilacqua, MC; Amantini, RCB; Lamônica Neto, D. Implante coclear em adultos. In: Campos, CAH; Costa, HOO. *Tratado de otorrinolaringologia*. São Paulo: Roca, p. 278-289, 2002.
- Couloigner, V; Sterkers, O; Ferrary, E. What's new in ion transports in the cochlea? *Pflugers Arch*, 453: 11-22, 2006.

- Coyle, B; Coffey, R; Armour, JA; Gausden, E; Hochberg, Z; Grossman, A; Britton, K; Pembrey, M; Reardon, W; Trembath, R. Pendred syndrome (goitre and sensorineural hearing loss) maps to chromosome 7 in the region containing the nonsyndromic deafness gene DFNB4. *Nature Genetics*, 12(4): 421-423, 1996.
- Cruz, MS; Oliveira, LR; Carandina, L; Lima, MCP; César, CLG; Barros, MBA; Alves, MCGP; Goldbaum, M. Prevalence of self-reported hearing loss and attributed causes: a population-based study. *Cad. Saúde Pública*, v. 25, n. 5, p. 1123-1131, 2009.
- Davis, RR; Kozel, P; Erway, LC. Genetic influences in individual susceptibility to noise : A review. *Noise Health*, 5(20): 19-28, 2003.
- Davis, H & Silverman, SR. Auditory Test Hearing Aids. In: Davis H, Silvermann SR, (Ed.). *Hearing and deafness*, New York, Holt: Rinehart and Winston, 83-139, 1970.
- Del Castillo, FJ; Aguirre, LA; Rodríguez-Ballasteros, M; Villamar, M; Moreno-Pelayo, MA; Moreno, F; Del Castillo, I. A novel 200-kb deletion involving the GJB6 (connexin-30) gene at the DFNB1 locus is found in the compound heterozygous state with a GJB2 (connexin-26) mutation in subjects with autosomal recessive hearing impairment. In: 7th Molecular Biology of Hearing and Deafness, 2009, Boston. Livro de Resumos. Boston: Harvard Medical School, 85, 2009.
- Del Castillo, FJ; Rodríguez-Ballasteros, M; Alvares, A; Hutchin, T; Leonardi, E; de Oliveira, CA; Azaiez, H; Brownstein, Z; Avenarius, MR; Marlin, S; Pandya, A; Shahin, H; Siemering, KR; Weil, D; Wuyts, W; Aguirre, LA; Martín, Y; Moreno-Pelayo, MA; Villamar, M; Avraham, KB; Dahl, HH; Kanann, M; Nance, WE; Petit, C; Smith, RJ; Van Camp, G; Sartorato, EL; Murgia, A; Moreno, F; Del Castillo, I. A novel deletion involving the connexin 30 gene del(GJB6-D13S1854) , found in trans with mutations in the GJB2 gene (connexin 26) in subjects with DFNB1 nonsyndromic hearing impairment. *J Med Genet*, 42(7): 588-94, 2005.

- Del Castillo, I; Moreno-Pelayo, MA; Del Castillo, FJ; Brownstein, Z; Marlin, S; Adina, Q; Cockburn, DJ; Pandya, A; Siemering, KR; Chamberlin, GP; Ballana, E; Wuyts, W; Maciel-Guerra, AT; Alvarez, A; Villamar, M; Shohat, M; Abeliovich, D; Dahl, HH; Estivill, X; Gasparini, P; Hutchin, T; Nance, WE; Sartorato, EL; Smith, RJ; Van Camp, G; Avraham, KB; Petit, C; Moreno, F. Prevalence and evolutionary origins of the del(GJB6-D13S1830) mutation in the DFNB1 locus in hearing impairment subjects: a multicenter study. *Am J Hum Genet*, 73(6): 1452-8, 2003.
- Del Castillo, I; Villamar, M; Moreno-Pelayo, MA; Del Castillo, FJ; Alvarez, A; Tellería, D; Menéndes, I; Moreno, F. A deletion involving the connexin 30 gene in nonsyndromic hearing impairment. *N Engl J Med*, 346(4): 243-249, 2002.
- Denoyelle, F; Lina-Granade, G; Plauchu, H; Bruzzone, R; Chaïb, H; Lévi-Acobas, F; Weil, D; Petit, C. Connexin 26 gene linked to a dominant deafness. *Nature*, 393(6683): 319-20, 1998.
- 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. *Hum Molec Genet*, 6: 2173-7, 1997.
- Dror, AA & Avraham, KB. Hearing Loss: Mechanisms Revealed by Genetics and Cell Biology. *Annual Review of Genetics*, 43: 411-437, 2009.
- Everett, LA; Glaser, B; Beck, JC; Idol, JR; Buchs, A; Heyman, M; Adawi, F; Hazani, E; Nassir, E; Baxevanis, AD; Sheffield, VC; Green, ED. Pendred syndrome is caused by mutations in a putative sulphate transporter gene (*PDS*). *Nature Genetics*, 17: 411-422, 1997.
- Feldmann, D; Le Maréchal, C; Jonard, L; Thierry, P; Czajka, C; Couderc, R; Ferec, C; Denoyelle, F; Marlin, S; Feldmann, F. A new large deletion in the DFNB1 locus causes nonsyndromic hearing loss. *Eur J Med Genet*, 52(4): 195-200, 2009.

- Finsterer, J; Fellingner, J. Nuclear and mitochondrial genes mutated in nonsyndromic impaired hearing. *Int J Pediat Otorhinolaryngol*, 69: 621-649, 2005.
- Fishel-Ghodsian, N; Bykhovskaya Y, Taylor K, Kahen T, Cantor R, Ehrenman K, Smith R, Keithley E. Temporal bone analysis of patients with presbycusis reveals high frequency of mitochondrial mutations. *Hear Res*, 110(1-2): 147-154, 1997.
- Fishel-Ghodsian, N; Prezant, TR; Bu, X; Oztas, S. Mitochondrial ribosomal RNA gene mutation in a patient with sporadic aminoglycoside ototoxicity. *Am J Otolaryngol*, 14: 339-403, 1993.
- FORL. Fundação Otorrinolaringologia. Disponível em <<http://www.forl.org.br>>. Acesso em Outubro/2011.
- Friedman, RA; Bykhovskaya, Y; Sue, CM; DiMauro, S; Bradley, R; Fallis-Cunningham, R; Paradise, N; Pensak, M; Smith, R; Gordon, J; Li, X; Fischel-Ghodsian, N. Maternally inherited nonsyndromic hearing loss. *American Journal of Medical Genetics*, 84(4): 369–372, 1999.
- Friedman, LM; Dror, AA; Avraham, KB. Mouse models to study inner ear development and hereditary hearing loss. *Int J Dev Biol*, 51: 609-631, 2007.
- Fuse, Y; Doi, K; Hasegawa, T; Sugil, A; Hibino, H; Kudo, T. Three novel connexin 26 gene mutations in autosomal recessive non syndromic deafness. *Neuroreport*, 10(9): 1853-1857, 1999.
- Gasparini, P; Rabionet, R; Barbujani, G; Melchionda, S; Petersen, M; Brondum-Nielsen, K; Metspalu, A; Oitmaa, E; Pisano, M; Fortina, P; Zelante, L; Estivill, X. High carrier frequency of the 35delG deafness mutation in European populations. Genetic Analysis Consortium of GJB2 35delG. *Eur J Hum Genet*, 8: 19-23, 2000.

- Godinho, R; Keogh, I; Eavey, R. Perda Auditiva Genética. *Rev Bras Otorrinolaringol*, 69(1): 100-4, 2003.
- 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.
- Guilford, P; Ben, AS; Blanchard, S; Levilliers, J; Weissenbach, J; Belkahia, A; Petit, C. A non-syndrome form of neurosensory, recessive deafness maps to the pericentromeric region of chromosome 13q. *Nat Genet*, 6(1), 24-28, 1994.
- Hamelmann, C; Amedofu, GK; Albrecht, K; Muntau, B; Gelhaus, A; Brobby, GW; Horstmann, RD. Pattern of connexin 26 (GJB2) mutations causing sensorineural hearing impairment in Ghana. *Hum Mutat*, 18: 84-85, 2001.
- Hilgert, N; Smith, RJH; Van Camp, G. Forty-six genes causing nonsyndromic hearing impairment: which ones should be analyzed in DNA diagnostics? *Mutat Res*, 681(2-3): 189-196, 2009a.
- Hilgert, N; Smith, RJH; Van Camp, G. Function and expression pattern of nonsyndromic deafness genes. *Curr Mol Med*, 9(5): 546-564, 2009b.
- Heller, S; Sheane, CA; Javed, Z; Hudspeth, AJ. Molecular markers for cell types of the inner ear and candidate genes for hearing disorders. *Proc Natl Acad Sci USA*, 95(19): 11400-11405, 1998.
- Howell, N; Chinnery, PF; Ghosh, SS; Fahy, E; Turnbull, DM. Transmission of human mitochondrial genome. *Hum Reprod*, 15(2): 235-245, 2000.
- Ito, T; Noguchi, Y; Yashima, T; Ohno, k; Kitamura, K. Hereditary Hearing Loss and Deafness Genes in Japan. *J Med Dent Sci*, 57: 1-10, 2010.

- Iwasaki, S; Tamagawa, Y; Ocho, S; Hoshino, T, Kitamura, K. Hereditary sensorineural hearing loss of unknown cause involving mitochondrial DNA A1555G mutation. *ORL*, 62: 100–103, 2000.
- Joint Committee of Infant Hearing – JCIH. Position Statement-2000. *Am Acad Audiol*, 9:1-40, 2000.
- Kelley, PM; Harris, DJ; Comer, BC; Askew, JW; Fowler, T; Smith, SD; Kimberling, WJ. Novel mutations in the connexin 26 gene (GJB2) that cause autosomal recessive (DFNB1) hearing loss. *Am J Hum Genet*, 62(4): 792-799, 1998.
- Kelssell, DP; Dunlop, J; Stevens, HP; Lench, NJ; Liang, JN; Parry, G; Mueller, RF; Leigh, I. Connexin 26 mutations in hereditary non-syndromic sensorineural deafness. *Nature*, 387: 80-83, 1997.
- Kikuchi, T; Kimura, RS; Paul, DL; Adams, JC. Gap junctions in the rat cochlea: immunohistochemical and ultrastructural analysis. *Anat Embryol*, 191(2) :101-18, 1995.
- Kobayashi, K; Oguchi, T; Asamura, K; Miyagawa, M; Horai, S; Abe, S; Usami, S. Genetic features, clinical phenotypes, and prevalence of sensorineural hearing loss associated with the 961delT mitochondrial mutation. *Auris Nasus Larynx*, 32(2): 119-124, 2005.
- Kokotas, H; Petersen, MB; Willems; PJ. Mitochondrial deafness. *Clin Genet*, 71: 379–91, 2007.
- Konings, A; Van Laer, L; Wiktorek-Smagur, A; Rajkowska, E; Pawelczyk, M; et al. Candidate gene association study for noise-induced hearing loss in two independent noise-exposed populations. *Ann Hum Genet*, 73: 215–24, 2009.
- Krawczak, M & Cooper, DN. Human Gene Mutation Database. *Trends Genet*, 13: 121-122, 1997. Disponível em: <www.hgmd.org>. Acesso em: Novembro/2011.

- Kumar, NM & Gilula, NB. Cloning and characterization of human and rat liver cDNAs coding for a gap junction protein. *J Cell Biol*, 103: 767-776, 1986.
- Lerer, I; Sagi, M; Malamud, E; Levi, H; Raas-Rothschild, A; Abeliovich, D. Contribution of connexin 26 mutation to nonsyndromic deafness in Ashkenazi patients and the variable phenotypic effect of the mutation 167delT. *Am J Med Genet*, 95: 53-56, 2000.
- Life Technologies website. Disponível em: <<https://www.lifetechnologies.com>>. Acesso em: Novembro/2011.
- 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.
- Liu, Y; Ke, X; Qi, Y; Li, W; Zhu, P. Connexin 26 gene (GJB2): prevalence of mutations in the Chinese population. *J Hum Genet*, 47(12): 688-690, 2002.
- Löffler, J; Nekahm, D; Hirst-Stadlmann, A; Günther, B; Menzel, HJ; Utermann, G; Janecke, AR. Sensorineural hearing loss and the incidence of Cx26 mutations in Austria. *Eur J Hum Genet*, 9(3): 226-230, 2001.
- Lu, J; Qian, Y; Li, Z; Yang, A; Zhu, Y; Li, R; Yang, L; Tang, X; Chen, B; Ding, Y; Li, Y; You, J; Zheng, J; Tao, Z; Zhao, F; Wang, J; Sun, D; Zhao, J; Meng, Y; Guan, M. Mitochondrial haplotypes may modulate the phenotypic manifestation of the deafness-associated 12S rRNA 1555A>G mutation. *Mitochondrion*, 10: 69-81, 2010.
- Lustig, LR; Lin, D; Venick, H; Larky, J; Yeagle, J; Chinnici, J; Polite, C; Mhatre, AN; Niparko, JK; Lalwani, AK. *GJB2* gene mutations in cochlear implant recipients: prevalence and impact in outcome. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg*, 130: 541-546, 2004.

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

Maillet, M. *Biologia Celular*. São Paulo: Santos Editora, 279-302, 2003.

MITOMAP: A Human Mitochondrial Genome Database. Disponível em: <<http://www.mitomap.org>, 2011>. Acesso em: Outubro/2011.

Morell, RJ; KIM, HJ; Goforth, L; Frederici, K; Fisher, R; Van Camp, G; Berlin, CI; Oddoux, C; Ostrer, H; Keats, B; Friedman, TB. Mutation in the connexin 26 gene (GJB2) among Askenazi Jews with nonsyndromic recessive deafness. *N Engl J Med*, 339(21): 1500-1505, 1998.

Morlé, L; Bozon, M; Alloisio, N; Latour, P; Vandenberghe, A; Plauchu, H; Collet, L; Edery, P; Godet, J; Lina-Granade, G. A novel C202F mutation in the connexin26 gene (GJB2) associated with autosomal dominant isolated hearing loss. *J Med Genet*, 37(5): 368-370, 2000.

Murgia, A; Orzan, E; Polli, R; Martella, M; Vinanzi, C; Leonardi, E; Arslan, E; Zacchello, F. Cx26 deafness: mutation analysis and clinical variability. *J Med Genet*, 36(11): 829-832, 1999.

Nass, MM. The circularity of mitochondrial DNA. *Proc Natl Acad Sci USA*, 56(4): 1215-1222, 1966.

Oliveira, CA; Alexandrino, F; Abes-Sandes, K; Silva Júnior, WA; Magna, LA; Maciel-Guerra, AT; Sartorato, EL. Frequency of 35delG mutation in the GJB2 gene in samples of Caucasian, Asian, and African Brazilians. *Hum Biol*, 76: 313-316, 2004.

Oliveira, CA; Maciel-Guerra, AT; Sartorato, EL. Deafness resulting from mutations in the GJB2 (connexin 26) gene in Brazilian patients. *Clin Genet*, 61: 354-8, 2002.

OMIM. Online Mendelian Inheritance in Man. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/omim>>. Acesso em: Maio/2011.

Organização Mundial de Saúde. Deafness and Hearing Impairment. 2009. Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs300/en/index.html>>. Acesso em: Abril/2010.

Pascolini, D & Smith, A. Hearing impairment in 2008: A compilation of available epidemiological studies. *International Journal of Audiology*, 48: 473-485, 2009.

Paul, DL. Molecular cloning of cDNA for rat liver gap junction protein. *J Cell Biol*, 103: 123-134, 1986.

Pendred, V. Deaf autism and goitre. *Lancet*, 2: 523, 1896.

Piatto, VB & Maniglia, JV. Importância do Gene Conexina 26 na etiologia da deficiência auditiva sensorineural não-sindrômica. *Acta Awho*, 20(2): 106-112, 2001.

Pickles JO. Mutation in mitochondrial DNA as a cause of presbycusis. *Audiol Neurotol*, 9(1): 23-33, 2004.

Pinto, JA; Mello Junior, CF; Marqui, ACS; Perfeito, DJ; Ferreira, RDP; Silva, RH. Enlarged vestibular aqueduct syndrome: report of 3 cases and literature review. *Rev Bras Otorrinolaringol*, 71(3): 386-391, 2005.

Preciado, DA; Lawson, L; Madden, C; Myer, D; Ngo, C; Bradshaw, JK; Choo, DI; Greinwald Jr, JH. Improved diagnostic effectiveness with a sequential diagnostic paradigm in idiopathic pediatric sensorineural hearing loss. *Otology & Neurotology*, 26: 610-615, 2005.

- Prezant, TR; Agopian, JV; Bohlman, MC; Bu, X; Oztas, S; Qiu, WQ; Arnos, KS; Cortopassi, GA; Jaber, L; Rotter, JI *et al.* Mitochondrial ribosomal RNA mutation associated with both antibiotic-induced and non-syndromic deafness. *Nat Genet*, 4: 289-294, 1993.
- Pupo, AC; Balieiro, CR; Figueiredo, RSL. Retrospective study of hearing impaired children and teenager: characterizing the etiologies and audiology aspects. *Rev CEFAC*, 10(1):84-91, 2008.
- Rabionet, R; Gasparini, P; Estivill, X. Molecular genetics of hearing impairment due to mutations in gap junction genes encoding beta connexins. *Hum Mutat*, 16(3): 190-202, 2000.
- Rabionet, R; Lopes-Bigas, N; Arbonès, ML; Estivill, X. Connexin mutations in hearing loss, dermatological and neurological disorders. *TRENDS in Molecular Medicine*, 8(5): 205-212, 2002.
- Raviv, D; Dror, AA; Avraham, KB. Hearing loss: a common disorder caused by many rare alleles. *Ann N Y Acad Sci*, 1214: 168-179, 2010.
- Reinert, J; Honegger, F; Gürtler, N. High homogeneity in auditory outcome of pediatric CI-patients with mutations in Gap-Junction-Protein Beta2. *International Journal of Pediatric Otorhinolaryngology*, 74: 791–795, 2010.
- Ribeiro, EM & Pinheiro, S. A prevalência de portadores de deficiências na população do parque Antônio Vieira – Juazeiro do Norte – CE. *Revista Brasileira em Promoção da Saúde*, 17: 3-7, 2004.
- Richardson, GP; de Monvel, JB; Petit, C. How the genetics of deafness illuminates auditory physiology. *Annu Rev Physiol*, 73(3): 11-34, 2011.
- Robbins, A.M. Language development. In: Waltzman, S & Cohen, N (Ed.). *Cochlear Implants*. New York, NY: Thieme Medical Publishers, 269-283, 2000.

- Robertson, NG; Khetarpal, U; Gutierrez-Espeleta, GA; Bieber, FR; Morton, CC. Isolation of novel and known genes from a human fetal cochlear cDNA library using subtractive hybridization and differential screening. *Genomics*, 23(1): 42-50, 1994.
- Roux, AF; Pallares-Ruiz, N; Vielle, A; Faugère, V; Templin, C; Leprevost, D; Artières, F; Lina, G; Molinari, N; Blanchet, P; Mondain, M; Claustres, M. Molecular epidemiology of DFNB1 deafness in France. *BMC Med Genet*, 5(5): 1-10, 2004.
- Russo, ICP. Overview of audiology in Brazil: state of the art. *Audiology*, 39(4): 202-206, 2000.
- Sartorato, EL; Gottardi, E; de Oliveira, CA; Magna, LA; Annichino-Bizzacchi, JM; Seixas, CA; Maciel-Guerra, AT. Determination of the frequency of the 35delG allele in Brazilian neonates. *Clin Genet*, 58(4): 339-40, 2000.
- Schrijver, I. Hereditary nonsyndromic sensorineural hearing loss: transforming silence to sound. *J Mol Diagn*, 6: 275–84, 2004.
- Scott, DA; Kraft, ML; Carmi, R; Ramesh, A; Elbedour, K; Yairi, Y; Srisailapathy, CR; Rosengren, SS; Markham, AF; Mueller, RF; Lench, NJ; Van Camp, G; Smith, RJ; Sheffield, VC. Identification of mutations in the connexin 26 gene that cause autosomal recessive nonsyndromic hearing loss. *Hum Mutat*, 11(5): 387-94, 1998.
- Shaukat, S; Fatima, Z; Zehra, U; Waqar, AB. Syndromic and non-syndromic deafness, molecular aspects of Pendred syndrome and its reported mutations. *J Ayub Med Coll Abbottabad*, 15(3): 59-64, 2003.
- Sheffield, VC; Kraiem, Z; Beck, JC; Nishimura, D; Stone, EM; Salameh, M; Sadeh, O; Glaser, B. Pendred syndrome maps to chromosome 7q21-34 and is caused by an intrinsic defect in thyroid iodine organification. *Nature Genetics*, 12(4): 424-426, 1996.

SIGTAP – Sistema de gerenciamento da tabela de procedimentos, medicamentos e OPM do SUS.
Disponível em: <www.datasus.gov.br>. Acesso em: Dezembro/2011.

Silva, DPC; Montovani, JC; Oliveira, DT; Fioravanti, MP; Tamashiro, IA. The large vestibular aqueduct syndrome: a cause of neurosensory dysacusia (original title: Síndrome do aqueduto vestibular alargado: uma causa de disacusia neurosensorial). *Pró-Fono Revista de Atualização Científica*, 20(2): 133-135, 2008.

Simões, AM & Maciel-Guerra, AT. A surdez evitável: predominância de fatores ambientais na etiologia da surdez neurosensorial profunda. *Jornal de Pediatria*, 68: 254-257, 1992.

Sinclair, JH & Stevens, BJ. Circular DNA filaments from mouse mitochondria. *Proc Natl Acad Sci USA*, 56(2): 508-514, 1966.

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/>>, Acesso em: Novembro/2011.

Snoeckx, RL; Huygen, PL; Feldmann, D; Marlin, S; Denoyelle, F; Waligora, J; Mueller-Malesinska, M; Pollak, A; Ploski, R; Murgia, A; Orzan, E; Castorina, P; Ambrosetti, U; Nowakowska-Szyrwinska, E; Bal, J; Wiszniewski, W; Janecke, AR; Nekahm-Heis, D; Seeman, P; Bendova, O; Kenna, MA; Frangulov, A; Rehm, HL; Tekin, M; Incesulu, A; Dahl, HH; du Sart, D; Jenkins, L; Lucas, D; Bitner-Glindzicz, M; Avraham, KB; Brownstein, Z; Del Castillo, I; Moreno, F; Blin, N; Pfister, M; Sziklai, I; Toth, T; Kelley, PM; Cohn, ES; Van Maldergem, L; Hilbert, P; Roux, AF; Mondain, M; Hoefsloot, LH; Cremers, CW; Lopponen, T; Lopponen, H; Parving, A; Gronskov, K; Schrijver, I; Roberson, J; Gualandi, F; Martini, A; Lina-Granade, G; Pallares-Ruiz, N; Correia, C; Fialho, G; Cryns, K; Hilgert, N; Van de Heyning, P; Nishimura, CJ; Smith, RJ; Van Camp, G. GJB2 mutations and degree of hearing loss: a multicenter study. *Am J Hum Genet*, 77: 945–957, 2005.

- Stover, T & Diensthuber, M. Molecular biology of hearing. *Laryngohinootologie*, 90(1): 22-34, 2011.
- Tekin, M; Arnos, KS; Pandya, A. Advances in hereditary deafness. *Lancet*, 358: 1082-90, 2001.
- The auditory system. In: Puerves, D; Augustine, GJ; Fitzpatrick, D; Katz, LC; LaMantia, AS; McNamara, JO; Williams, SM (Ed.). *Neuroscience*. Sunderland: Sinauer Associates, 2001. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/bookshelf/br.fcgi?book=neurosci>>. Acesso em: Setembro/2011.
- Thermo Scientific website. Disponível em: <<http://www.thermoscientific.com>>. Acesso em: Novembro/2011.
- US National Institute on Deafness and Other Communication Disorders. Disponível em <<http://www.nidcd.nih.gov/health/statistics/hearing.html>>. Acesso em Novembro/2011.
- Valvassori, G & Clemis, J. The large vestibular aqueduct syndrome. *Laryngoscope*, 88: 723-8, 1978.
- Van Bruggen, EF; Borst, P; Ruttenberg, GJ; Gruber, M; Kroon, AM. Circular mitochondrial DNA. *Biochim Biophys Acta*, 119(2): 437-439, 1966.
- Van Camp, G & Smith, RJH. Hereditary Hearing Loss Homepage. Disponível em <<http://hereditaryhearingloss.org>>. Acesso em: Maio/2010.
- Vivero, R.J; Fan, K; Angeli, S; Balkany, TJ; Liu, XZ. Cochlear implantation in common forms of genetic deafness. *International Journal of Pediatric Otorhinolaryngology*, 74: 1107–1112, 2010.
- Xin Guan, M. Molecular Pathogenetic mechanism of maternally inherited deafness. *Ann N Y Acad Sci*, 1011: 259-71, 2004.

Wallace, DC. Diseases of the mitochondrial DNA. *Annu Rev Biochem*, 61: 1175-1212, 1992.

Wallace, DC; Brown, MD; Lott, MT. Mitochondrial DNA variation in human evolution and disease. *Gene*, 238(1): 211-230, 1999.

Weil, D; Blanchard, S; Kaplan, J; Guilford, P; Gibson, F; Walsh, J; Mburu, P; Varela, A; Levilliers, J; Weston, MD; et al. Defective myosin VIIA gene responsible for Usher syndrome type 1B. *Nature*, 374(6517): 60-61, 1995.

Wilch, E; Azaiez, H; Fisher, RA; Elfebein, J; Murgia, A; Birkenhäger, R; Bolz, H; da Silva-Costa, SM; Del Castilho, I; Haaf, T; Hoefsloot, L; Kremer, H; Kubisch, C; Le Marechal, C; Pandya, A; Sartorato, EL; Schneider, E; Van Camp, G; Wuyts, W; Smith, RJ; Friderici, KH. A novel DFNB1 deletion allele supports the existence of a distant cis-regulatory region that controls GJB2 and GJB6 expression. *Clin Genet*, 78(3): 267-274, 2010.

Wilcox, ER & Fex, J. Construction of a cDNA library from microdissected guinea pig organ of Corti. *Hear Res*, 62(1): 124-126, 1992.

Wilcox, SA; Saunders, K; Osborn, AH; Arnold, A; Wunderlich, J; Kelly, T; Collins, V; Wilcox, LJ; McKinlay Gardner, RJ; Kamarinos, M; Cone-Wesson, B; Williamson, R; Dahl, HH. High frequency hearing loss correlated with mutations in the GJB2 gene. *Hum Genet*, 106(4): 399-405, 2000.

Wu, CC; Lee, YC; Chen, PJ; Hsu, CJ. Predominance of genetic diagnosis and imaging results as predictors in determining the speech perception performance outcome after cochlear implantation in children. *Arch Pediatr Adolesc Med*, 162(3): 269-276, 2008.

Yang, J; Liu, X; Zhao, Y; Adamian, M; Pawlyk, B et al. Ablation of whirlin long isoform disrupts the USH2 protein complex and causes vision and hearing loss. *PLoS Genet*, 6(5): e1000955, 2010.

Zelante, L; Gasparini, P; Estivill, X; Melchionda, S; D'Agruma, L; Govea, N; Milá, M; Monica, MD; Lutfi, J; Shohat, M; Mansfield, E; Delgrosso, K; Rappaport, E; Surrey, S; Fortina P. Connexin 26 mutations associated with the most common form of non-syndromic neurosensory autosomal recessive deafness (DFNB1) in Mediterraneans. *Hum Mol Genet*, 6(9): 1605-1609, 1997.

Zu-jian, C; Bin, Y; Qi-cai, L; Lin, J; Jing, C; Qi-shui, O. Quantification of mitochondrial DNA with the A1555G mutation in deaf patients using real-time amplification refractory mutation system-quantitative PCR. *JMD*, 12(1): 1-6, 2009.

MINISTÉRIO DA SAÚDE

Portaria GM/MS nº 1278, de 20 de outubro de 1999

ANEXO I

IMPLANTE COCLEAR

CRITÉRIOS DE INDICAÇÃO E CONTRA-INDICAÇÃO

1 – CRITÉRIOS DE INDICAÇÃO

1.1. – IMPLANTE EM ADULTOS

O Implante Coclear em adultos deverá seguir os seguintes critérios de indicação:

- a - pessoas com surdez neuro-sensorial profunda bilateral com código lingüístico estabelecido (casos de surdez pós-lingual ou de surdez pré-lingual, adequadamente reabilitados);
- b - ausência de benefício com prótese auditiva (menos de 30% de discriminação vocal em teste com sentenças);
- c - adequação psicológica e motivação para o uso de implante coclear.

1.2. – IMPLANTE EM CRIANÇAS

O Implante Coclear em crianças, menores de 18 anos com surdez pré e póslingual, deverá seguir os seguintes critérios de indicação: a) experiência com prótese auditiva, durante pelo menos três meses;

- b) incapacidade de reconhecimento de palavras em conjunto fechado;
- c) família adequada e motivada para o uso do implante coclear;

d) condições adequadas de reabilitação na cidade de origem.

2 - CRITÉRIOS DE CONTRA-INDICAÇÃO

Está contra-indicado o Implante Coclear nos seguintes casos:

- a - surdez pré-lingual em adolescentes e adultos não reabilitados por método oral;
- b - pacientes com agenesia coclear ou do nervo coclear;
- c - contra-indicações clínicas.

ANEXO 2



CEP, 27/09/11.
(PARECER CEP: Nº 396/2006)

FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

www.fcm.unicamp.br/fcm/pesquisa

PARECER

I-IDENTIFICAÇÃO:

PROJETO: “ESTUDO MOLECULAR DA PERDA AUDITIVA”.

PESQUISADOR RESPONSÁVEL: Edil Lúcia Sartoro

II – PARECER DO CEP.

O Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP tomou ciência e aprovou o adendo que inclui o projeto “**ESTUDO DE ETIOLOGIA DA PERDA AUDITIVA EM AMOSTRA DE INDIVÍDUOS BRASILEIROS: DIRETRIZES PARA PROTOCOLO DE CONDUTA CLÍNICA**”, com a finalidade de mestrado da aluna Priscila Zonzini Ramos, 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 IX Reunião Ordinária do CEP/FCM, em 27 de setembro de 2011.

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

**FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA**www.fcm.unicamp.br/pesquisa/etica/index.html

CEP, 19/10/06.
(Grupo II)

PARECER PROJETO: N° 396/2006 (Este n° deve ser citado nas correspondências referente a este projeto)
CAAE: 0.0.146.000-06

I-IDENTIFICAÇÃO:

PROJETO: “ESTUDO MOLECULAR DA PERDA AUDITIVA”

PESQUISADOR RESPONSÁVEL: Edi Lúcia Sartoro

INSTITUIÇÃO: CEPRE/UNICAMP

APRESENTAÇÃO AO CEP: 07/08/06

II - OBJETIVOS

Estudo da prevalência e da etiologia genética da deficiência auditiva.

III - SUMÁRIO

O estudo terá 50 indivíduos com surdez sensorioneural não síndrômica provenientes do Centro de Estudos e Pesquisas em Reabilitação “Professor Dr. Gabriel Porto” (CEPRE), selecionados pela geneticista Prof. Dra. Andréa Trevas Maciel Guerra. Será retirada amostra de sangue periférico dos indivíduos (10-15ml). Será feita a extração do DNA genômico a partir de leucócitos do sangue. Será feita a detecção da mutação 35deLG, das deleições, amplificações do gene GJB2 e rastreamento de mutações, rastreamento de mutações no gene SLC26A4 (PDS), detecção de mutações em mitocondriais, sequenciamentos dos genes e rastreamento de mutações pela técnica de SSCP (Single-Strand Conformation Polymorphisms).

IV - COMENTÁRIOS DOS RELATORES

O estudo está adequado. Não está descrito a idade dos sujeitos selecionados. Oferece risco ao sujeito quanto a retirada de amostra sanguínea periférica. O risco está descrito no TCLE. O resultado do estudo trará informações importantes a respeito da genética das perdas auditivas, incluindo o estudo de genes de suscetibilidade, com enorme aplicação nas políticas públicas da surdez. Haverá facilidade no diagnóstico, prognóstico e aconselhamento genético.

Recomendação: Incluir no TCLE assinatura do pesquisador e a informação que forneceu cópia do TCLE.

V - PARECER DO CEP

O Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP, após acatar os pareceres dos membros-relatores previamente designados para o presente caso e

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

FONE (019) 3788-8936
FAX (019) 3788-7187
cep@fcm.unicamp.br

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

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

atendendo todos os dispositivos das Resoluções 196/96 e complementares, resolve aprovar **com recomendação** o Protocolo de Pesquisa, bem como ter aprovado o Termo do Consentimento Livre e Esclarecido, assim como todos os anexos incluídos na Pesquisa supracitada.

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.

VI - INFORMAÇÕES COMPLEMENTARES

O sujeito da pesquisa tem a liberdade de recusar-se a participar ou de retirar seu consentimento em qualquer fase da pesquisa, sem penalização alguma e sem prejuízo ao seu cuidado (Res. CNS 196/96 – Item IV.1.f) e deve receber uma cópia do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, na íntegra, por ele assinado (Item IV.2.d).

Pesquisador deve desenvolver a pesquisa conforme delineada no protocolo aprovado e descontinuar o estudo somente após análise das razões da descontinuidade pelo CEP que o aprovou (Res. CNS Item III.1.z), exceto quando perceber risco ou dano não previsto ao sujeito participante ou quando constatar a superioridade do regime oferecido a um dos grupos de pesquisa (Item V.3.).

O CEP deve ser informado de todos os efeitos adversos ou fatos relevantes que alterem o curso normal do estudo (Res. CNS Item V.4.). É papel do pesquisador assegurar medidas imediatas adequadas frente a evento adverso grave ocorrido (mesmo que tenha sido em outro centro) e enviar notificação ao CEP e à Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA – junto com seu posicionamento.

Eventuais modificações ou emendas ao protocolo devem ser apresentadas ao CEP de forma clara e sucinta, identificando a parte do protocolo a ser modificada e suas justificativas. Em caso de projeto do Grupo I ou II apresentados anteriormente à ANVISA, o pesquisador ou patrocinador deve enviá-las também à mesma junto com o parecer aprovatório do CEP, para serem juntadas ao protocolo inicial (Res. 251/97, Item III.2.e)

Relatórios parciais e final devem ser apresentados ao CEP, de acordo com os prazos estabelecidos na Resolução CNS-MS 196/96.

VII - DATA DA REUNIÃO

Homologado na VIII Reunião Ordinária do CEP/FCM, em 22 de agosto de 2006.


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

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Projeto: Estudo da etiologia da perda auditiva em amostra de indivíduos brasileiros: diretrizes para protocolo de conduta clínica

Nome do Paciente: _____
Registro Hospitalar: _____
Endereço: _____
Telefone: _____
Responsável: _____
RG: _____ Grau de parentesco: _____

Justificativa e objetivos do estudo:

Poucos estudos existem em países em desenvolvimento, especialmente, no Brasil, em relação à etiologia e prevalência da deficiência auditiva. Este projeto tem por objetivo o estudo de indivíduos com perdas auditivas para avaliar a eficácia dos testes laboratoriais, exames de imagem e pesquisa genética na determinação da etiologia das perdas auditivas, visando maior eficiência e redução de custos. Serão analisados pacientes provenientes do Ambulatório de Otorrinolaringologia do HC – UNICAMP, quanto à presença de alterações laboratoriais, de imagem e mutações em diferentes genes relacionados às perdas auditivas.

Procedimentos a que serão submetidos os pacientes:

Os exames complementares serão realizados, após indicação do otorrinolaringologista responsável, consistindo das investigações descritas a seguir:

- Avaliação comportamental da audição: Audiometria;
- Logaudiometria: Limiar de Reconhecimento de Fala (LRF) e Índice de Reconhecimento de Fala (IRF);
- Medidas de Imitância Acústica: timpanometria e pesquisa dos reflexos acústicos estapedianos;
- Emissões Otoacústicas Evocadas: Transientes e Produto de Distorção;
- Potenciais Evocados Auditivos de Tronco Encefálico (PEATE);
- Avaliação laboratorial;
- Avaliação cardíaca;
- Avaliação oftalmológica;
- Avaliação tomográfica;
- Análise molecular genética.

Risco e desconforto:

As amostras de sangue periférico serão obtidas por punção venosa, ou punção na polpa digital, que é um procedimento médico comum, 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 pela veia intermédia do cotovelo, 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 tomografia computadorizada e a avaliação de potenciais auditivos evocados de tronco encefálico não apresentam risco ao paciente, exceto às crianças que necessitem de sedação com hidrato de cloral para realização do exame. Contudo, a sedação é de baixo risco e realizada em meio hospitalar, 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 métodos que elucidem a etiologia das perdas auditivas (avaliação otorrinolaringológica, exames laboratoriais, de imagem e genético), como propor um algoritmo para a realização de exames, visando a excelência diagnóstica e redução de custos.

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 apenas benefícios à população surda e a seus familiares, pois a precocidade do diagnóstico e reabilitação gera grandes reduções no orçamento público.

Nos casos em que forem detectadas alterações auditivas de qualquer natureza, será instituída a reabilitação auditiva, através da colocação de prótese auditiva e do atendimento de equipe multidisciplinar na própria instituição. Diante da necessidade de implante coclear ou de procedimentos não contemplados no serviço, os indivíduos serão encaminhados para serviços de referência.

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.

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.

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.

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, 13083-887, Campinas/SP, fone (19) 3521-8936, 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

