



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

THALITA VITACHI CHRISTIANI

**ESTUDO MOLECULAR EM INDIVÍDUOS
SUBMETIDOS AO IMPLANTE COCLEAR**

Este exemplar corresponde à redação final
da tese defendida pelo(a) candidato (a)

THALITA VITACHI CHRISTIANI

e aprovada pela Comissão Julgadora.

Tese apresentada ao Instituto de
Biologia para obtenção do Título de
Mestre em Biologia Celular e Estrutural,
na área de Biologia Celular.

Orientadora: Profa. Dra. Edi Lúcia Sartorato

**BIBLIOTECA CENTRAL
DESENVOLVIMENTO
COLEÇÃO
UNICAMP**

UNIDADE	BC
Nº CHAMADA	T/VN/WM
	C 462e
V	EX
TOMBO BC/	66498
PROC.	14.p.00086-05
C	<input type="checkbox"/>
D	<input checked="" type="checkbox"/>
PREÇO	11,00
DATA	14/12/05
Nº CPD	

Bib Id 374261

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA – UNICAMP**

C462e

Christiani, Thalita Vitachi

Estudo molecular em indivíduos submetidos ao implante coclear / Thalita Vitachi Christiani. -- Campinas, SP: [s.n.], 2005.

Orientadora: Edi Lúcia Sartorato.

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

1. Surdez. 2. Implantes cocleares. 3. Testes de mutagenicidade. I. Sartorato, Edi Lúcia. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.

(rcdt/ib)

Título em inglês: Molecular study in cochlear implant recipients.

Palavras-chave em inglês: Deafness; Cochlear implants; Mutagenicity tests.

Área de concentração: Biologia Celular.

Titulação: Mestre em Biologia Celular e Estrutural.

Banca examinadora: Edi Lúcia Sartorato, Camila Andréa de Oliveira, Laura Maria Mariscal Ottoboni.

Data da defesa: 07/10/2005.

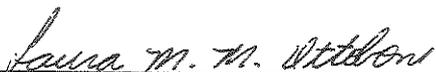
Campinas, 07 de outubro de 2005.

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Edi Lúcia Sartorato (Orientadora)


Assinatura

Profa. Dra. Laura Maria Mariscal Ottoboni


Assinatura

Profa. Dra. Camila Andréa de Oliveira


Assinatura

Profa. Dra. Maricilda Palandi de Mello

Assinatura

Profa. Dra. Fernanda de Castro Reis

Assinatura

016875002
200528960

“Ninguém vive mais q uma vez...
Deixa, diga sim pra não dizer talvez!”
(Thalita Vitachi Christiani)

Dedicatória

Ao meu pai, à minha mãe e à minha irmã.
Os amores da minha vida!

Agradecimentos

À Profa Dra Edi Lúcia Sartorato por todo apoio, todo incentivo e principalmente pela amizade que construímos ao longo desses anos.

Aos Professores Doutores Edison Pimentel, Odair Júnior e Maricilda Palandi de Mello, especialmente, por suas palavras sábias e doces; todos por terem gentilmente aceito o participar da minha banca de qualificação.

Às Professoras Doutoras Laura Maria Mariscal Ottoboni e Camila Andréa de Oliveira por terem gentilmente aceito participar da banca examinadora e contribuído para a finalização desse trabalho.

Aos funcionários do CBMEG.

À todos os amigos do laboratório de Genética Humana: Carlota, Jéssica, Paula, Priscilinha, Zélo, Luiz, Fabiana, Fernanda I, Fernanda II, Fernanda III, Roberta, Daniel, Lucy (João), Márcia, Cleide, Renata, Thammy, Tércio, Mariana, Éricka e Vanessa.

À Madá por toda força e incentivo.

Ao Dr Paulo Porto, um médico que faz a vida de muitas pessoas ser mais barulhenta e muito mais feliz, todo meu carinho, admiração e respeito por você e por seu trabalho.

E toda sua equipe do Ambulatório de Otorrinolaringologia do HC-Unicamp, Fga Luciane Calonga, Fga Sílvia Badur Curi, Fga Raquel Bernardes, Fga Renata Zanatello, Fga Elaine Soares, Fga Talita Franco, Fga Flávia Gomes, Fga Silvana Bortoncello, Fga Cristiane Onuki, Pga Daniela Rizzi, Ass. S. Mariele, pessoas lindas que engrandecem o sistema de saúde brasileiro. Aprendi demais com todas vocês.

Às agências financiadoras CAPES, CNPQ E FAPESP.

Aos meus pacientes e a todos os colaboradores responsáveis pelos centros de coleta, que com certeza sem eles este trabalho não poderia ser realizado.

Lista de figuras	11
Lista de tabelas e quadros	15
Abstract	17
Resumo	19
1- INTRODUÇÃO	21
1.1 Perda auditiva	22
1.1.1 Perda auditiva síndrômica	23
1.1.2 Perda auditiva não-síndrômica	25
1.2 Conexinas e suas funções	26
1.3 Gene GJB2	31
1.3.1 Mutação 35delG	32
1.3.2 Outras mutações no gene da conexina 26	34
1.4 Ototoxicidade e genes mitocondriais	36
1.4.1 Mutação A1555G	40
1.4.2 Mutação C1494T	41
1.4.3 Mutação A7445G	42
1.5 Tratamento e reabilitação da perda auditiva relacionada aos aspectos moleculares	43
1.6 Implante coclear	44
2- OBJETIVOS	51
2.1 Objetivo principal	52
2.2 Objetivos específicos	52
3- MATERIAL E MÉTODOS	54
3.1 Casuística	55
3.2 Exames realizados no HC, em pacientes candidatos e submetidos ao implante coclear	56

3.3 Métodos	60
3.3.1 Extração de DNA genômico de sangue periférico	60
3.3.2 Detecção da mutação 35delG no gene GJB2	60
3.3.3 Detecção das deleções Δ (GJB6-D13S1830) e Δ (GJB6-D13S1854)	61
3.3.4 Amplificação do gene GJB2	62
3.3.5 Sequenciamento automático do gene GJB2	64
3.3.5.1 Purificação dos produtos de PCR	64
3.3.5.2 Reação de sequenciamento automático para produto de PCR	64
3.3.5.3 Preparo do gel de acrilamida	66
3.3.5.4 Análise das seqüências obtidas	66
3.3.6 Detecção de mutações em genes mitocondriais	67
3.3.6.1 Mutação A1555G no gene 12SrRNA e mutações A7445G e C1494T no gene tRNASer(UCN)	67
4- RESULTADOS	71
4.1 Análise do gene GJB2	73
4.2 Identificação da mutação 35delG encontrada no gene GJB2	74
4.3 Identificação das deleções Δ (GJB6-D13S1830) e Δ (GJB6-D13S1854)	75
4.4 Identificação da mutação A1555G no gene mitocondrial 12S rRNA	77
4.5 Identificação da mutação A7445G no gene mitocondrial tRNA	79
4.6 Identificação da mutação C1494T no gene mitocondrial tRNA	81
4.7 Identificação de mutações no gene GJB2	82
4.7.1 Em pacientes submetidos ao implante coclear	82
4.7.1.1 Alteração G>A na posição 79	83
4.7.1.2 Alteração T>C na posição 101	84
4.7.1.3 Alteração G>A na posição 109	85

Sumário

4.7.1.4 Alteração C>T na posição 116 _____	86
4.7.1.5 Alteração A>G na posição 503 _____	87
4.7.1.6 Alteração G>A na posição 516 _____	88
5- DISCUSSÃO _____	99
5.1 Avaliação geral de alguns pacientes implantados com mutação_	102
6- CONCLUSÕES _____	113
7- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS _____	115
8- ANEXOS _____	131
ANEXO 1 _____	132
ANEXO 2 _____	143
ANEXO 3 _____	145

- Figura 1- Representação esquemática da organização das *gap junctions*. Estas são caracterizadas pelos conexons (hexâmero de uma molécula protéica, a conexina). Cada canal intercelular faz a conexão entre o citoplasma de duas células adjacentes. Modificado de www.personalpages.umist.ac.uk _____ 27
- Figura 2- Esquema de *gap junctions*, junções comunicantes. Modificado de www.orengostat.edu _____ 29
- Figura 3- Esquema representando as duas deleções Δ (GJB6-D13S1830) e Δ (GJB6-D13S1854) _____ 61
- Figura 4- Ciclo utilizado na amplificação do gene GJB2 _____ 63
- Figura 5- Ciclo utilizado no seqüenciamento do gene GJB2 _____ 65
- Figura 6- Ciclo utilizado na amplificação da região mitocondrial contendo as mutações A1555G, A7445G e C1494T _____ 68
- Figura 7- Gene GJB2 amplificado na reação de PCR. M- marcador de peso molecular (100pb – Gibco BRL[®]); A e B – fragmentos do gene denominados Cx1 e Cx2, respectivamente; C – gene GJB2 em sua totalidade _____ 73
- Figura 8 - Técnica de AS-PCR para detecção da mutação 35delG _____ 74
- Figura 9 - Resultado da técnica de PCR para detecção das mutações del(GJB6-D13S1830) e del(GJB6-D13S1854) M = marcador *ladder* 100pb Gibco BRL[®]; A – indivíduo normal; B- del(GJB6-D13S1830)/N; C- del(GJB6-D13S1830) homozigoto; D e E - del(GJB6-D13S1854)/N _____ 75
- Figura 10- Heredograma da família 4A _____ 76
- Figura 11- Fragmento do gene 12S rRNA amplificado pela reação de PCR em gel de agarose 1%, corado com brometo de etídeo. (a) *ladder* de 1Kb Gibco BRL[®]; e (b) fragmento de 2060bp _____ 77
- Figura 12- Fragmento da digestão do gene 12S rRNA com a enzima *BsmA I*, em gel de agarose 1%, corado com brometo de etídeo. (a) *ladder* de 1Kb Gibco BRL[®]; e (b) fragmentos de 1100 bp, 516bp e 444bp no paciente 51A _____ 78
- Figura 13- Fragmento da digestão do gene 12S rRNA com a enzima *BsmA I*, em gel de agarose 1%, corado com brometo de etídeo. (a) *ladder* de 1Kb Gibco BRL[®]; e N fragmentos de 1616 bp e 444bp, de um indivíduo normal _____ 78

- Figura 14- Fragmento do gene tRNASer (UCN) amplificado pela técnica de PCR, em gel de agarose 1%, corado com brometo de etídeo. (a) *ladder* de 1Kb Gibco BRL[®]; e (b) fragmento de 1821bp _____ 79
- Figura 15- Fragmento da digestão do gene tRNASer (UCN) com a enzima *Xba* I de um controle positivo para a mutação A7445G, em gel de agarose 1%, corado com brometo de etídeo. (a) *ladder* de 1Kb Gibco BRL[®]; e (b) fragmentos de 1386 bp e 435bp _____ 80
- Figura 16- Fragmento da digestão do gene tRNASer (UCN) com a enzima *Xba* I de um indivíduo normal para a mutação A7445G, em gel de agarose 1%, corado com brometo de etídeo. (a) *ladder* de 1Kb Gibco BRL[®]; e (b) fragmentos de 846 bp, 540bp e 435bp _____ 80
- Figura 17- (a) *Ladder* de 1Kb Gibco BRL[®], (b) fragmento da digestão do gene tRNASer (UCN) com a enzima *Hph* I de um indivíduo normal para a mutação com 370pb e (c) fragmento da digestão do gene tRNASer (UCN) com a enzima *Hph* I de um controle positivo para a mutação A7445G com 441pb em gel de agarose 1%, corado com brometo de etídeo _____ 81
- Figura 18- Eletroferograma mostrando a Alteração G>A na posição 79 em alelos diferentes. As duas fitas estão apresentadas na direção *sense* do *primer* _____ 83
- Figura 19 - Eletroferograma mostrando a Alteração T>C na posição 101 em alelos diferentes. As duas fitas estão apresentadas na direção *sense* do *primer* _____ 84
- Figura 20- Eletroferograma mostrando a Alteração G>A na posição 109 nas fitas estão apresentadas na direção *sense* do *primer* _____ 85
- Figura 21- Eletroferograma mostrando a Alteração C>T na posição 116 em alelos diferentes. As duas fitas estão apresentadas na direção *sense* do *primer* _____ 86
- Figura 22- Eletroferograma mostrando a Alteração A>G na posição 503 em alelos diferentes. As duas fitas estão apresentadas na direção *antisense* do *primer* _____ 87

Figura 23- Eletroferograma mostrando a Alteração G>A na posição 516 em alelos diferentes. As duas fitas estão apresentadas na direção *sense* do *primer* _____

Tabela 1- Distribuição de amostras do grupo I, de indivíduos candidatos ao implante coclear _____	57
Tabela 2- Distribuição de amostras do grupo I, de indivíduos submetidos ao implante coclear _____	59
Tabela 3- Seqüência de <i>primers</i> para amplificação das deleções Δ (GJB6-D13S1830) e Δ (GJB6-D13S1854) no gene GJB6 _____	62
Tabela 4- Seqüência de <i>primers</i> para a amplificação do gene GJB2 _____	62
Tabela 5- Posições de anelamento e seqüência dos <i>primers</i> utilizados na amplificação dos fragmentos mitocondriais e tamanho dos fragmentos gerados _____	67
Tabela 6- Produtos da digestão com enzimas de restrição _____	70
Tabela 7- Genótipos das famílias e indivíduos provenientes do HC- Unicamp (Grupo A) _____	89
Tabela 8- Genótipos das famílias e indivíduos provenientes do HRACF (Grupo B) _____	92
Tabela 9- Resultados dos exames moleculares realizados nos pacientes (Grupo A e Grupo B) submetidos ao implante coclear _____	94
Quadro 1- Resultados encontrados nos pacientes submetidos ao implante coclear, com análises completas do gene GJB2, deleções Δ (GJB6-D13S1830) e Δ (GJB6-D13S1854) e genes mitocondriais (12s rRNA e tRNASer(UCN)) _____	96
Quadro 2- Resultados encontrados nos pacientes candidatos ao implante coclear, com análises completas do gene GJB2, deleções Δ (GJB6-D13S1830) e Δ (GJB6-D13S1854) e genes mitocondriais (12s rRNA e tRNASer(UCN)) _____	97

ABSTRACT

The most common form of non-syndromic autosomal recessive deafness is caused by mutations in the GJB2 gene which encodes connexin 26. Among all the mutations described to date in the GJB2 gene, is the most common and has been found in virtually of the populations studied. Preliminary data suggest that pathologic changes due to GJB2 mutations do not affect the spiral ganglion cells, which are the site of stimulation of the cochlear implant. Besides, the survival of the spiral ganglion cells is believed to be an important determinant of the outcome after surgery. Recently, two deletions truncating the GJB6 gene which encodes connexin 30, near GJB2, named del (GJB6-D13S1830) and del(GJB6-D13S1854) have also been frequently described accompanying *in trans* mutations in another allele of the GJB2 gene.

Therefore, we have studied 115 nonsyndromic deaf patients with unknown etiologies in order to determine the prevalence of the GJB2 and GJB6 gene mutations as well as mutations in the mitochondrial genes 12S rRNA e tRNASer(UCN) in patients undergoing cochlear implantation surgery. As a result, we found 42,85% of the individuals with mutations including two new mutations in the gene GJB2 (W172X and K168R), one patient homozygous for the Δ (GJB6-D13S1830) mutation, and one patient with the mitochondrial mutation A1555G.

Concluding, these results establish that genetic screening can provide an etiologic diagnosis, which highlights a counseling importance, and may provide a prognostic on performance after cochlear implantation, as has been hypothesized in previous studies.

A forma mais comum de surdez não-sindrômica com padrão de herança autossômico recessivo é causada por mutações no gene GJB2 (que codifica a proteína conexina 26). Recentemente duas deleções que interrompem o gene GJB6 (que codifica a proteína conexina 30), próximo ao gene GJB2, chamadas del(GJB6-D13S1830) e del(GJB6-D13S1854) foram descritas na presença de mutações *in trans* no outro alelo do gene GJB2. Dentre todas as mutações descritas até o momento, a mutação 35delG no gene GJB2 é a mais comum e é encontrada praticamente em todas as populações estudadas. Dados preliminares sugerem que as alterações causadas devido a mutações no gene GJB2 não afetam as células do gânglio espiral, as quais constituem o principal alvo de estimulação do implante coclear. Além disso, acredita-se que a sobrevivência das células do gânglio espiral é fator determinante ao sucesso do implante.

Desta forma, foram estudados 115 pacientes candidatos ou submetidos ao implante coclear com perda auditiva não-sindrômica de etiologia não esclarecida a fim de se determinar a prevalência de mutações nos genes GJB2 e GJB6, assim como mutações em genes mitocondriais 12S rRNA e tRNASer(UCN) em pacientes candidatos e submetidos ao implante coclear.

Como resultado foram encontrados 42,85% de indivíduos com mutações, incluindo duas novas alterações no gene GJB2 ambas em heterozigose (W172X e K168R), um paciente homozigoto para a del(GJB6-D13S1830), e um paciente com a mutação mitocondrial A1555G.

Concluindo, esses resultados estabelecem que o rastreamento genético proporciona o diagnóstico etiológico, importante para o aconselhamento genético podendo fornecer um melhor prognóstico para o implante coclear, como sugerido em estudos prévios.

1.1 - Perda Auditiva

A perda auditiva é o distúrbio sensorial mais prevalente na população mundial e pode se manifestar em diferentes faixas etárias, podendo esta ser de causa genética ou adquirida por fatores ambientais, os quais podem ser pré, peri e pós-natais como, por exemplo: trauma acústico, meningite, infecções congênitas virais ou bacterianas (rubéola e citomegalovírus), tocotraumatismo e exposição a drogas ototóxicas (aminoglicosídeos) (Kalatzis & Petit, 1998).

A importância da surdez dentre as anomalias congênitas é considerável, uma vez que está presente, numa frequência em nosso país, que varia de acordo com a região e diferentes autores, de 2 a 7 de cada 1000 recém-nascidos; além disso, outras crianças vão manifestar déficit auditivo após o nascimento, mas antes de adquirirem a linguagem, e outras, ainda, podem ter déficits progressivos até a segunda década de vida (Russo, 2000). Finalmente, mais de 60% das pessoas com mais de 70 anos apresentam perda auditiva em grau suficiente para que seja necessário algum tipo de intervenção e continuem a se comunicar (Kalatzis & Petit, 1998).

A perda auditiva pode ser classificada de acordo com alguns critérios. Quanto a sua localização, ela pode ser **neurossensorial** (sensorial ou neural), quando as anomalias estiverem situadas entre os receptores da orelha interna e as regiões auditivas do cérebro; ou **condutiva**, envolvendo a orelha média e/ou externa assim como serem **mistas**, quando os dois sinais estiverem presentes. A perda auditiva também pode ser classificada, considerando os graus de perda auditiva, como leve, quando a perda estiver entre 27-40 dB; moderada quando for entre 41-55 dB, perda moderada a severa entre 56-70 dB, perda severa entre 71-90 dB e profunda, correspondendo a perda auditiva maior que 90 dB (Guilford *et al.*, 1994; Kalatzis & Petit, 1998).

Uma outra forma de classificação é quanto à associação da perda auditiva com outros sinais clínicos. Assim, a perda auditiva pode ser **sindrômica** ou **não-sindrômica**.

As formas ditas *sindrômicas* constituem aproximadamente 30% dos casos de perda auditiva hereditária. Elas estão associadas a malformações crânio-faciais ou cervicais, displasias esqueléticas, anomalias cutâneas ou oculares, doenças neurológicas e disfunções renais ou metabólicas. Centenas de síndromes foram descritas, nas quais a perda auditiva é um dos sinais clínicos observados (Mustafa *et al.*, 2001).

As formas *não-sindrômicas* constituem a maioria dos casos. Até o momento já foram mapeados por estudos de ligação 122 *loci* relacionados à surdez *não-sindrômica* destes. Muitos genes já estão devidamente localizados e clonados.

Entre as formas *não-sindrômicas* podem-se observar diferentes padrões de herança: autossômica recessiva, autossômica dominante, recessivo ligada ao cromossomo X e mitocondrial (Mustafa *et al.*, 2001; Skvorak & Morton *et al.*, 1999).

As formas autossômicas recessivas são responsáveis por quase todas as formas de perda auditiva de origem genética. Em geral, são as mais graves e quase exclusivamente causadas por anomalias cocleares, portanto neurosensoriais. As formas autossômicas dominantes são, usualmente, pós-linguais, progressivas, menos graves e a alteração, na grande maioria dos casos, é do tipo condutiva ou mista (sensorial e neurosensorial) (Petit, 1996; Lalwani, 1999).

1.1.1 - Perda auditiva *sindrômica*

A identificação de mutações em genes responsáveis por quadros *sindrômicos* associados à surdez não é recente. São listadas mais de 400 síndromes genéticas onde a surdez se apresenta como um dos sinais clínicos, como por exemplo a osteogênese imperfeita, a qual está relacionada à surdez com displasias esqueléticas e a síndrome de Pendred onde a surdez aparece concomitante a disfunção metabólica.

Dentre as formas sindrômicas, uma das mais freqüentes é a Síndrome de Waardenburg (SW). A SW apresenta-se com grande heterogeneidade clínica. Entre indivíduos de uma mesma família podem ser encontrados diferentes fenótipos, inclusive a perda auditiva de forma isolada, que pode até ser confundida com as formas não-sindrômicas de surdez. A SW apresenta padrão de herança autossômico dominante, e manifesta-se clinicamente por perda auditiva e hipopigmentação de cabelos, pele e íris (Watanabe *et al.*, 1998).

Outra síndrome importante é a síndrome de Usher que é caracterizada por perda auditiva associada com retinite pigmentosa. Possui padrão de herança autossômico recessivo, e é clinicamente e geneticamente heterogênea. É a mais freqüente causa de surdo-cegueira em humanos, sendo responsável por aproximadamente 5% de todas as causas de surdez de origem genética. Alguns pacientes com síndrome de Usher apresentam anormalidades na organização dos microtúbulos nos axônios das células fotorreceptoras, células ciliadas nasais, e também degeneração do órgão espiral. Interessantemente, um dos genes relacionados à Síndrome de Usher (MYO7A) também está envolvido na surdez neurossensorial não-sindrômica (Weil *et al.*, 1995).

1.1.2 - Perda Auditiva não-sindrômica

Como mencionado anteriormente, a perda auditiva não-sindrômica, é encontrada no indivíduo de forma isolada e está relacionada à surdez neurossensorial. Como estão envolvidos todos os padrões de herança possíveis nesta forma de perda, convencionou-se denominar as diferentes localizações dos genes envolvidos com a sigla DFN (proveniente do inglês *deafness*) acrescida das letras A e B, significando forma de transmissão autossômica dominante (DFNA) e recessiva (DFNB), respectivamente. Quando se denominar DFN isoladamente, trata-se de surdez de transmissão ligada ao cromossomo X. Após as letras, há um número inteiro, indicando a ordem da descoberta do gene (Van Camp *et al.*, 1997).

A perda auditiva não-sindrômica é bastante heterogênea e é praticamente monogênica. Estima-se que mais de 100 genes estejam envolvidos na etiologia da surdez neurossensorial não-sindrômica (Sobe *et al.*, 2000) De fato, já foram mapeados 110 *loci* em cromossomos humanos e 35 genes já foram identificados (<http://webhost.era.ac.be/hhh>).

Cerca de 75% a 85% dos casos de perda auditiva pré-lingual não-sindrômica manifestam-se como formas autossômicas recessivas (DFNB). As formas autossômicas dominantes (DFNA) estão presentes em 15 a 25% dos casos. Assim como, a herança recessiva ligada ao cromossomo X representa cerca de 2% dos casos Além disso, existem casos de herança materna, devido a mutações em genes mitocondriais que representam 1-2 % dos casos (Guilford *et al.*, 1994; Kalatzis & Petit *et al.*, 1998).

São várias as classes de genes envolvidas na perda auditiva não-sindrômica. Genes funcionais, com importante papel nas funções cocleares; genes estruturais, necessários para a organização da actina nos estereocílios e células ciliadas; fatores de transcrição que podem modular a expressão de outros genes, ou ainda genes com funções ainda desconhecidas (Kelsell *et al.*, 1997).

1.2 - Conexinas e suas funções

A produção da proteína conexina 26 (Cx26) é codificada pelo gene GJB2 que está localizado na região cromossômica 13q11-12. Em termos evolucionários, as conexinas podem ser agrupadas em pelo menos três subfamílias- α , β , γ . Entretanto, a nomenclatura mais comum é baseada no peso molecular da proteína, em daltons, por exemplo, Cx26 (GJB2), Cx30 (GJB6), Cx31 (GJB3), Cx32 (GJB1), Cx43 (α 1) e assim sucessivamente (Krutovskikh & Yamasaki *et al.*, 2000; Perkins & Sosinsky *et al.*, 1997).

Mutações em diferentes genes de conexinas causam surdez com herança autossômica recessiva (GJB2 e GJB3), autossômica dominante (GJB2, GJB3 e GJB6) ou mesmo ligada ao cromossomo X (GJB1). Um mesmo gene pode estar envolvido tanto em formas sindrômicas, quanto não-sindrômicas (Rabionet *et al.*, 2000).

Os genes das conexinas possuem uma arquitetura comum, com uma região codificante contendo um éxon separado da região não traduzida 5' por um íntron de tamanho variável (Bruzzone *et al.*, 1996).

Seis moléculas de conexinas se agrupam para formar uma estrutura chamada *conexon*, o qual une-se com células vizinhas equivalentes para formar as junções comunicantes. Um *conexon* é composto de um único tipo de conexina, podendo se unir com *conexons* de outros tipos de conexinas formando, assim, um canal heterotípico. São exceções os *conexons* da conexina 31 (Cx31) que somente formam canais funcionais quando unidos com *conexons* da mesma proteína, ou seja, da Cx31 (Steel, 1998).

Os conexons, dispostos como uma rede de malhas hexagonais, têm um diâmetro de 6nm e um canal central de 2nm. Fundamentalmente, alterações no pH e nas concentrações dos íons cálcio citoplasmático podem causar a abertura ou fechamento desses canais e, assim, a comunicação intercelular pode mudar com as alterações metabólicas nas células participantes (Maillet, 2003; Yeager & Nicholson *et al.*, 1996) (Figura 1).

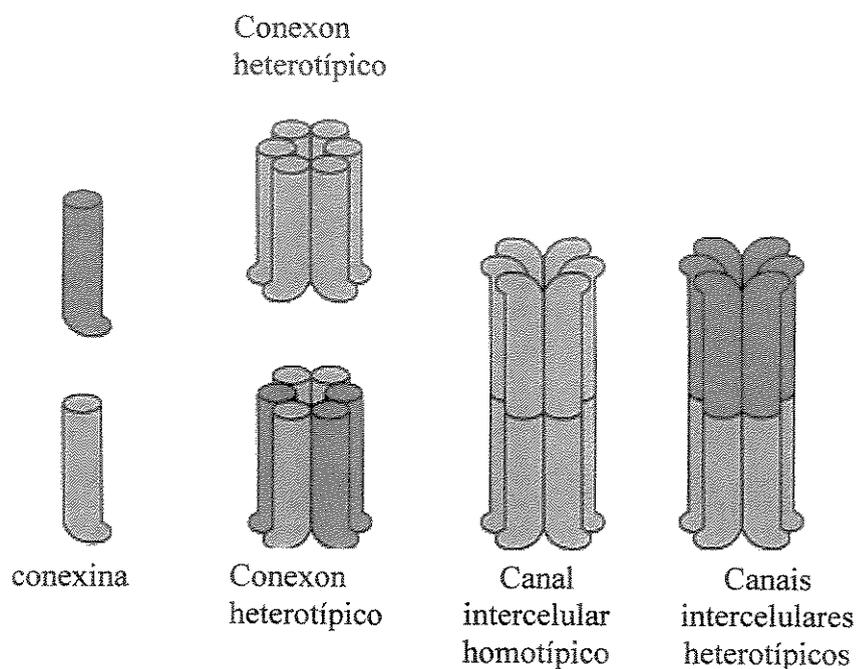


Figura 1- Representação esquemática da organização das junções comunicantes. Estas são caracterizadas pelos conexons (hexâmero de uma molécula protéica, a conexina). Cada canal intercelular faz a conexão entre o citoplasma de duas células adjacentes. Modificado de <http://personalpages.umist.ac.uk>.

Os dois *loops* extracelulares das proteínas conexinas são estruturas críticas para a união dos hemicanais (conexons), na formação de um canal funcional. Três cisteínas conservadas em todas as espécies de conexinas estão localizadas em cada um desses dois *loops* e são cruciais para a estabilização intramolecular. Além disso, esses domínios são responsáveis pela compatibilidade seletiva entre diferentes espécies de conexinas para formar canais heterotípicos funcionais (Krutovskikh & Yamasaki *et al.*, 2000; Perkins *et al.*, 1997).

A composição dos aminoácidos e o tamanho do *loop* citoplasmático são bastante variáveis entre as conexinas, e é nessa região que os polimorfismos são mais freqüentemente detectados em algumas dessas proteínas (Krutovskikh & Yamasaki, 2000).

Mutações no terceiro domínio transmembrânico (M3) levam a perda da função de transporte intracelular. Os conexons são formados, mas o transporte é prejudicado devido ao ligamento incorreto entre dois conexons ou à incapacidade de formação de uma junção comunicante funcional entre eles (Liu *et al.*, 2000).

A identificação de várias mutações associadas com perda auditiva na mesma região do domínio M3 de três genes de conexinas (Cx26 Cx31 e Cx32), sugere que este domínio é importante para o funcionamento das proteínas, e que desempenha um papel vital na formação dos conexons nas células do ouvido interno (Liu *et al.*, 2000).

Os canais de *gap junctions* exibem uma alta seletividade para a difusão de uma célula para a outra, nos dois sentidos, em função do gradiente eletrostático, somente de molécula com massa molecular entre 1000 e 1500 Da (daltons) ou com um diâmetro de 0,8 a 1,4 nm, tais como íons e pequenos metabólitos intracelulares (Liu *et al.*, 2000; Krutovskikh & Yamasaki, 2000).

Assim, em alguns tecidos excitáveis como por exemplo, músculos cardíacos e não estriado, uma célula pode afetar a outra através do fluxo de corrente elétrica sem a intervenção de um transmissor químico, em contraste com o modo comum de transmissão sináptica. Devido a isso, essas junções têm recebido particular atenção, pois possivelmente são as principais ou até mesmo as únicas que atuam na transmissão elétrica entre as células (Maillet, 2003; Poirier *et al.*, 2003).

Existem outras evidências, porém, de que as conexinas podem possuir funções que não estão diretamente relacionadas com as *gap junctions* da comunicação intercelular. Recentes experimentos de transfecção revelaram que a capacidade das conexinas de regular a expressão dos genes que controlam o crescimento, a diferenciação celular e a supressão de tumorigenicidade está necessariamente correlacionada com a capacidade das células se comunicarem via *gap junctions* (Krutoviskikh & Yamasaki, 2000) (Figura 2).

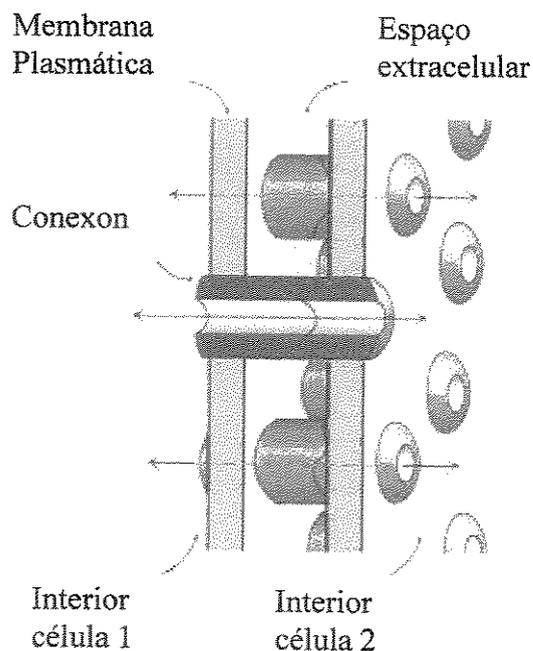


Figura 2: Esquema das junções comunicantes. Modificado de <http://orengostat.edu>.

As junções comunicantes estão situadas sobre a face basolateral das membranas celulares e podem ser encontradas em inúmeros tecidos, incluindo fígado, epiderme, tecidos conectivos, músculo cardíaco e não-estriado, no cristalino e em tecido embrionários. Na parte central do sistema neural, elas são encontradas no epêndima, na neuroglia e formam sinapses elétricas entre alguns tipos de neurônios (Zhang e Nicholson *et al.*, 1994; Yeager, 1998).

Na cóclea situada na orelha interna, também foram encontradas múltiplas subunidades das junções comunicantes, as conexinas, refletindo o nível de organização e diferenciação do tecido. A maior parte das células da cóclea estão conectadas via junção comunicante, menos as células sensoriais (Kikichi *et al.*, 2000).

Na cóclea os conexons existem entre as células de suporte das células ciliadas, podendo formar um caminho para reciclagem dos íons K⁺ e transdução da audição, levando a um influxo endolinfático desses íons com despolarização da membrana celular. Acredita-se que as *gap junctions* tenham um papel fundamental na reciclagem dos íons K⁺ da endolinfa do ducto coclear após a estimulação das células sensoriais ciliadas.

A cóclea, como responsável pela audição, utiliza aproximadamente 16.000 células sensoriais ciliadas que dependem, para seu bom funcionamento, de despolarização da membrana celular e transdução mecanoelétrica, liberação e transporte de íons, entre outros eventos (Avrahan, 1997).

Em células adjacentes os conexons que contribuem para a formação de um canal intercelular podem ser compostos por idênticas ou diferentes conexinas, formando então, um canal homotípico ou heterotípico, respectivamente. A formação de canais heterotípicos é limitada pela compatibilidade entre as conexinas (Kumar, 1999). Assim, a falta desta proteína levaria a um distúrbio na formação dos conexons e, portanto no fluxo de íons K⁺, levando a perda da audição (Kelsell *et al.*, 1997).

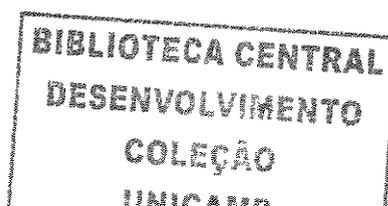
As *gap junctions* são numerosas na cóclea e na porção vestibular, onde a proteína Cx26 é uma das principais conexinas expressas além das conexinas 30 e 31.

A conexina 26 é uma proteína altamente expressa no aparelho vestibular, e é predominante no órgão espiral da cóclea assim como a conexina 32 também está presente nas células de suporte. Durante o desenvolvimento coclear, a formação inicial e o subsequente aumento do tamanho e número de *gap junctions* na estria vascular coincidem com a geração inicial e o aumento do potencial endonuclelar. Estas e outras evidências sugerem que o papel das *gap junctions* na cóclea é o de propiciar um caminho para a passagem de íons para sustentar a endolinfa e, conseqüentemente, a audição. Mutações na conexina 26 (Cx26) poderão, portanto, interromper esta circulação de íons resultando na perda auditiva (Forge *et al.*, 1992).

1.3 - Gene GJB2

No que se refere ao grande avanço nos estudos de genes relacionados à surdez, a descoberta do gene GJB2, como já mencionado, representa a principal descoberta nessa área (Kelsell *et al.*, 1997). Este foi o primeiro gene nuclear relacionado à surdez não-sindrômica. Inicialmente não se imaginava seu grau de envolvimento na origem dos casos de surdez hereditária, principalmente aqueles com padrão de herança autossômico recessivo. Hoje, porém, sabe-se que esse gene está envolvido em 50% dos casos onde se observa o padrão de herança autossômico recessivo, e que mutações no gene da conexina 26 também podem determinar surdez herdada de modo dominante (Denoyelle *et al.*, 1998).

Mutações no gene GJB2 são responsáveis por mais da metade de casos genéticos de hipoacusia. Mais de 70 diferentes mutações nesse gene foram identificadas tanto em formas recessivas como dominantes de surdez não-sindrômica. A mutação mais freqüentemente encontrada é a 35delG, que ocorre na maioria dos casos de surdez onde o gene GJB2 está envolvido (Salvinelli *et al.*, 2004).



A comprovação de que mutações no gene GJB2 estão envolvidas na maioria dos casos de surdez pré-lingual não-sindrômica de herança autossômica recessiva, o que poderia até corresponder a 10-20% de todos os tipos de surdez mudou a prática do aconselhamento genético nessa área. Principalmente considerando-se o fato de que uma mutação específica (35delG) está presente em 80% dos casos onde esse gene está envolvido (Cohn *et al.*, 1999; Denoyelle *et al.*, 1999; Wilcox *et al.*, 2000).

Inicialmente, a perda auditiva relacionada ao gene GJB2 foi determinada como sendo severa ou profunda, mas recentemente tem-se demonstrado que as mutações no gene da conexina também estão relacionadas a casos com perda auditiva leve ou moderada (Salvinelli *et al.*, 2004).

1.3.1 - Mutação 35delG

A mutação 35delG, que ocorre no primeiro domínio intracitoplasmático (IC1) da proteína conexina 26, trata-se da deleção de uma guanina (G) em uma seqüência 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 prematuro de terminação na proteína (*stop códon*) 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).

Esta mutação no gene que codifica a Cx26 não é rara; pelo contrário, sua presença em heterozigose pode ser encontrada em até 4% dos indivíduos em algumas populações. Foi observado, em populações do norte e sul europeu e em populações brancas americanas, que a frequência desta mutação está em torno de 1.3% a 2.8%. Na Itália, especificamente, sua frequência é maior 1:32. Em Portugal e na Espanha a frequência é cerca de 1:40 e 1:45, respectivamente (Gasparini *et al.*, 2000).

Em países em desenvolvimento, ainda são muito escassos estudos sobre a prevalência da perda auditiva genética, sob todas as formas. Na população brasileira, a mutação 35delG também é encontrada frequentemente. O primeiro estudo em uma amostra de neonatos de Bragança Paulista, revelou a frequência da mutação em 0,97% dos casos (Sartorato *et al.*, 2000).

O fato da mutação 35delG estar presente em alta frequência em diferentes grupos étnicos levantou a hipótese de que isso ocorria devido à particularidade da sequência de nucleotídeos do gene ser uma mutação *hot spot* ao invés de um efeito do fundador (Kelley *et al.*, 1998; Denoyelle *et al.*, 1997; Morel *et al.*, 1998).

Entretanto, os dados da maioria das populações estudadas, com ancestrais comuns do Norte Europeu, sugeriram um possível efeito fundador para origem da mutação 35delG, inferindo que esta deve ter se originado há 500 gerações ou, aproximadamente, há 10.000 anos e mantida até os dias atuais (Gasparini *et al.*, 2000; Van Laer *et al.*, 2001).

Em recente trabalho a mutação 35delG foi encontrada em 84,2% dos alelos mutados, o que sustenta a hipótese de que essa mutação não é rara na população brasileira (Oliveira *et al.*, 2002). O Brasil por ser um país muito extenso, e pela grande miscigenação em suas diversas regiões apresenta uma considerável heterogeneidade filogeográfica, o que dificulta as estimativas das prevalências de mutações as quais variam em diferentes grupos étnicos.

Os dados relacionados à frequência da mutação 35delG na população branca do Brasil apresentaram uma similaridade de frequência com toda a população europeia (1:51), o que claramente indica que essa alteração genética é a maior mutação encontrada em surdez autossômica recessiva em Caucásios (Gasparini *et al.*, 2000; Oliveira *et al.*, 2004). Apesar da mistura étnica da população brasileira, a análise molecular da mutação 35delG ainda é o primeiro passo para a determinação de perda auditiva.

Em relação aos aspectos clínicos da DFNB1, os pacientes com mutações em ambos alelos do gene GJB2 têm perda auditiva que ocorre na fase pré-lingual. A perda auditiva associada à mutação 35delG é, em geral, bilateral, com grau de perda variando apenas entre moderado-severa a profundo, em cerca de dois terços dos casos, assim a gravidade da perda auditiva em pacientes homocigotos para a 35delG é altamente variável, mesmo entre irmãos (Wilcox *et al.*, 2000; Denoyelle *et al.*, 1999; Cohn *et al.*, 1999).

A mutação 35delG também pode ser diagnosticada ao nascimento a partir de uma gota de sangue em papel, pela técnica de PCR alelo-específico, portanto na ocasião do teste do pezinho, concomitantemente aos exames de triagem neonatal (Lucotte *et al.*, 2001).

1.3.2 - Outras mutações no gene da conexina 26

Além da mutação 35delG, primeira mutação descrita no gene GJB2, pelo menos outras 70 mutações já foram relatadas. Em uma amostra da população brasileira, mutações no gene GJB2 foram encontradas em 22% de famílias com surdez neurossensorial não-sindrômica, indicando que a análise molecular desse gene em pacientes com perda auditiva não-sindrômica deve ser o primeiro passo na determinação das causas de perda auditiva em nosso país (Oliveira *et al.*, 2002). Isto é particularmente verdadeiro para os casos familiares, onde mutações neste gene foram encontradas em 50% das famílias, mas também nos casos esporádicos, cujas mutações estão presentes em 11,55% (aproximadamente 1:9).

A falta de informações precisas por parte da família acerca de intercorrências durante a gestação, o parto e o período peri-natal, podem confundir a natureza genética dos casos esporádicos.

Entretanto, uma das maiores dificuldades em relação ao aconselhamento genético de indivíduos portadores de mutações no gene da conexina 26, deve-se ao fato de que em aproximadamente 10 a 40 % dos casos, mutações no gene da conexina 26 são detectados em apenas um dos alelos do indivíduo portador de surdez (Wilcox *et al.*, 2000).

Várias hipóteses foram formuladas para explicar a surdez associada à mutação em somente um dos alelos (1) existência de mutações em regiões não codificantes do gene GJB2, afetando a expressão; (2) mutações em outros genes (incluindo genes da família das conexinas); (3) relação casual, a qual não estaria relacionado à surdez nesses casos. Acredita-se que esta última hipótese seja pouco provável, uma vez que já foi observada segregação do suposto alelo normal com a surdez (Wilcox *et al.*, 2000).

Parte desse dilema, a respeito dos heterozigotos para mutação no gene GJB2, foi esclarecido por um grupo de pesquisadores da Espanha. Foram encontradas duas deleções que estão situadas também no cromossomo 13 que se estendem à região proximal desse gene indo até parte do gene da conexina 30 (GJB6). Estas deleções foram denominadas $\Delta(\text{GJB6-D13S1830})$ e $\Delta(\text{GJB6-D13S1854})$ e referem-se à perda de 342 Kb e 232 Kb respectivamente (del Castillo *et al.*, 2005).

Na Espanha, em indivíduos heterozigotos para o gene da conexina 26, 50% dos casos apresentam a mutação $\Delta(\text{GJB6-D13S1830})$ e 25% dos casos apresentam a $\Delta(\text{GJB6-D13S1854})$. Ainda não está esclarecido se estes casos com a mutação na conexina 26 em um alelo e a presença de uma das deleções seriam um padrão complexo de herança digênica ou se haveria inativação do gene GJB2 pela deleção de elementos regulatórios próximos a esse gene (del Castillo *et al.*, 2005).

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

1.4 - Ototoxicidade e genes mitocondriais

As ototoxicoses são provocadas por drogas medicamentosas que alteram a orelha interna, as quais podem afetar o sistema coclear, o sistema vestibular, ou ambos. Diferentes drogas podem causar ototoxicidade. Entre elas está o grupo dos antibióticos aminoglicosídeos, como a estreptomicina, a diidroestreptomicina, a neomicina, a canamicina A e B, a paramomicina, a aminosidina, a gentamicina, amicina, a tobramicina e a anetilmicina. Com exceção da estreptomicina, tobramicina e geutamicina, que são mais vestibulotóxicos que colceotóxicos, todos os demais são preferencialmente cocleotóxicos. Esses aminoglicosídeos são um grupo de antibióticos clinicamente importantes, utilizados em hospitais de países ocidentais para combater infecções por bactérias aeróbias gram-negativas ou em pacientes com tuberculose.

Em países asiáticos, os aminoglicosídeos são freqüentemente utilizados como primeira linha de terapia em pacientes com infecções relativamente menores como otite média e bronquite. Estes antibióticos são altamente polares, e geralmente, não metabolizados, sendo inteiramente excretados pela filtração glomerular. Assim, a ototoxicidade envolve a audição e o sistema renal (Fischel-Ghodsian, 1999; Lortholary 1995).

Outros grupos de drogas ototóxicas podem ser citados como o iodo e os álcoois, muitas vezes utilizados como desinfetantes para assepsia da orelha média em cirurgias. Assim como, beta-bloqueadores e diuréticos que provocam alterações reversíveis, porém também potencializam a ação dos aminoglicosídeos. As drogas inflamatórias como a aspirina e os contraceptivos orais são outros exemplos de ototóxicos que também podem causar perdas auditivas uni ou bilaterais progressivas e irreversíveis (Black & Peszenecker *et al.*, 1993).

De todos os grupos de ototóxicos citados, os antibióticos aminoglicosídeos são os mais importantes e sem dúvida os mais estudados. Alguns autores concluíram que estes antibióticos se ligam aos receptores das membranas das células ciliadas do órgão espiral, da mácula sacular e da utricular e das cristas do sistema vestibular. Esses receptores são os polifosfoinosítídios, componentes da membrana celular com papel importante nos eventos bioelétricos e na permeabilidade da membrana por interação com o íon cálcio (Schacht, 1993).

A formação de complexos entre os antibióticos aminoglicosídeos e os polifosfoinosítídios produzem modificações na fisiologia da membrana e na sua permeabilidade, acabando por afetar a estrutura e a função dos cílios, primeiramente, tingindo a própria membrana, e finalmente, causando destruição das células receptoras (Schacht, 1993).

Mutações em genes mitocondriais têm sido apontadas como a causa de uma grande variedade de doenças, incluindo predisposição à surdez pelo uso de medicamentos aminoglicosídeos. Várias mutações nesses genes podem causar perda auditiva tanto síndrômica quanto não-síndrômica. A mutação mitocondrial A1555G localizada no gene ribossomal 12Sr RNA foi a primeira alteração molecular identificada como causa da surdez; esta mutação foi descrita em 1993 em uma grande família árabe-israelita (Prezant *et al.*, 1993).

O DNA mitocondrial (DNAm_t) é um pequeno genoma circular localizado no interior da mitocôndria, a qual encontra-se no citoplasma da célula. Existe a hipótese desta organela ter se originado como um simbiote de células proto-eucarióticas há aproximadamente 1,5 a 2 milhões de anos e conseqüentemente possuir a molécula de DNA diferente, autônoma e independente do DNA nuclear (Wallace *et al.*, 1999).

Cada mitocôndria possui de 10 a 100 moléculas de DNAm_t; assim, cada célula contém milhares de moléculas de DNAm_t. Cada uma destas moléculas de DNAm_t constitui-se de 16.569bp, dupla fita, em forma circular, o que corresponde a 1-2% do total de DNA em células de mamíferos. A molécula de DNAm_t codifica 13 genes de RNAm, 2 de rRNA e 22 de RNAt, específicos desta organela. Os 13 RNAm são transcritos em ribossomos mitocondriais específicos, através de um código também específico, em 13 proteínas (Xin Guan, 2004).

As mitocôndrias possuem sistemas de replicação de DNA, de transcrição e de tradução próprios. Entretanto, muitas das proteínas presentes no interior da mitocôndria são sintetizadas no citosol celular e importadas para o interior da mitocôndria. Sendo assim, elas interagem com aproximadamente 60 outras proteínas codificadas no núcleo para formar cinco complexos enzimáticos requeridos na fosforilação oxidativa. Estes complexos, situados na membrana das mitocôndrias, estão envolvidos na cadeia transportadora de elétrons e síntese de ATP (Xin Guan, 2004; Attardi & Schatz *et al.*, 1998).

O DNA mitocondrial é transmitido exclusivamente pela mãe, já que apenas as mitocôndrias do oócito são transmitidas de uma geração para a outra, sendo assim o espermatozóide não contribui com o DNAm_t à prole (Wallace *et al.*, 1999).

Devido ao fato das mitocôndrias terem uma baixa atividade de reparo de DNA e serem continuamente expostas a radicais livres como o oxigênio, que é liberado da mitocôndria pela cadeia de transferência de elétrons, mutações somáticas no DNAm_t são comuns.

Como cada célula contém múltiplas mitocôndrias e cada mitocôndria contém múltiplas (10-100) moléculas de DNA, qualquer mutação que ocorrer produz uma alteração nas cópias de DNA mitocondrial. Quando a mutação estiver presente em todas as cópias do DNA mitocondrial é chamada de homoplasmia ou quando estiver presente em apenas parte do mesmo é heteroplasmia.

A correlação de genótipo e fenótipo em alterações na mitocôndria é complexa e pouco conhecida. Várias mutações em DNAMt podem produzir inúmeras manifestações clínicas como, perda auditiva, neuropatia, miopatia, cardiomiopatia, *Diabetes Melitus*, assim como as doenças Mal de Alzheimer e Mal de Parkinson. Danos mitocondriais geralmente provocam doenças que afetam tecidos que requerem altos níveis de energia, como o muscular e o nervoso, como apresentado anteriormente. Estas mutações incluem deleções ou inserções e mutações pontuais (Xin Guan, 2004).

É realmente comum observar perda auditiva causada por danos mitocondriais (mutações DNAMt), uma vez que a cóclea é um órgão altamente dependente do metabolismo da cadeia respiratória (Petty *et al.*, 1986).

A perda auditiva frequentemente ocorre como um dos vários sintomas em doenças síndrômicas causadas por estas mutações mitocondriais. A perda auditiva não-sindrômica também pode ser causada por mutações mitocondriais, como demonstrado por mutações no DNA mitocondrial em famílias com perda auditiva de herança materna, cuja herança é não-sindrômica em muitos pacientes. Tem-se demonstrado mutações no DNA mitocondrial associadas a ambos tipos de perda auditiva, síndrômicas e não-sindrômicas (Newkrirk *et al.*, 1997).

Entre as formas de surdez síndrômica, é freqüente observar a perda auditiva como parte do fenótipo de síndromes neuromusculares como KSS (*Kearns-Sayre Syndrome*), MERRF (*Myoclonicepilepsy and red fibers*) e MELAS (*Mitochondrial encephalopathy, lactic acidosis and stroke-like episodes*) ou ainda na *Diabetes Melitus* de herança materna (Newkrirk *et al.*, 1997).

1.4.1 - Mutação A1555G

Pelo menos seis mutações diferentes foram identificadas em famílias com perda auditiva não-sindrômica. Cinco delas estão localizadas no gene tRNASer(UCN). A mutação A1555G foi a primeira detectada em homoplasmia associada à perda auditiva e é considerada a mutação mais comum associada com surdez de herança materna. Essa mutação foi descoberta, inicialmente, em populações africanas e asiáticas, o que levou a se pensar na possibilidade de um ancestral comum entre essas populações (Prezant *et al.*, 1993; Howell *et al.*, 1996).

Analisando a filogenia dessa mutação, foram encontradas famílias com a A1555G na África e Ásia. Com isso, conseguiu-se detectar que há uma múltipla origem desta mutação já que ela foi encontrada em diversas outras etnias como a população grega, inglesa, italiana, mexicana, portoriquenha e vietnamita (Usami *et al.*, 1997; Fischel-Ghodsian *et al.*, 1997). A mutação A1555G apresenta frequências altas nas populações espanhola e japonesa o que sugere que populações de alto-risco para esta mutação existam em todo o mundo, entretanto a frequência pode variar de acordo com a herança racial (Xin Guan *et al.*, 2004; Fischel-Ghodsian, 1998).

A perda auditiva encontrada em muitos pacientes com a mutação A1555G apresenta características comuns como: perda auditiva sensorineural bilateral, simetria, alta frequência do dano, às vezes progressiva, variações individuais na mesma família, com ou sem história de uso de antibióticos aminoglicosídeos e normalmente mais severa com uso desses antibióticos.

É sugerido que pacientes que apresentem a mutação A1555G, quando em contato com antibióticos aminoglicosídeos, apresentem, seqüencialmente, uma perda auditiva irreversível. Os fenótipos clínicos variam consideravelmente entre membros da mesma família, podendo estes apresentar surdez congênita severa, progressiva moderada, como também, podem ser fenotipicamente normais (Xin Guan, 2004; Xin Guan *et al.*, 2000).

1.4.2 - Mutação C1494T

Esta mutação foi encontrada, primeiramente, em uma grande família chinesa com herança materna de sensibilidade a aminoglicosídeos e surdez não-sindrômica (Zhao *et al.*, 2003). Membros da família apresentaram severidade e idade do início da perda auditiva variáveis.

A mutação C1494T, recentemente descrita, é uma transição de C para T na posição 1494, no gene 12S RNAr. A mutação é apresentada na nova forma 1494U-A1555 pb, a qual está na mesma posição da 1494C-G1555 par de base criado para a ligação da surdez com a mutação A1555G, na base A altamente conservada do gene 12S rRNA. Este sítio tem sido classificado como o principal alvo de antibióticos aminoglicosídeos (ototoxicidade). Sendo assim, é antecipado que a alteração na estrutura terciária do 12S RNAr deve resultar na sensibilidade a aminoglicosídeos (Xin Guan, 2004).

1.4.3 - Mutação A7445G

A mutação A7445G está localizada no gene tRNASer(UCN). Esta interfere mecanicamente no processamento da cadeia leve do RNAm policistrônico, com significativa diminuição na quantidade de tRNASer(UCN) (Guan *et al.*, 1997).

Essa mutação foi encontrada em uma família da Escócia, da Nova Zelândia e do Japão. Todas as famílias apresentavam perda auditiva neurossensorial não-sindrômica de padrão de herança materna (Reid *et al.*, 1994; Fischel-Ghodsian *et al.*, 1995). A avaliação clínica da família da Nova Zelândia revelou queratoderma palmoplantar em muitos de seus membros.

Assim como a família japonesa que também apresentou queratoderma palmoplantar e surdez neurossensorial progressiva (Servior *et al.*, 1998). Na família escocesa a penetrância da perda auditiva detectada foi baixa enquanto na japonesa e na da Nova Zelândia, a penetrância encontrada foi alta. A diferença da penetrância nestas situações é aparentemente devida a uma diferença de haplótipos mitocondriais. Na família da Nova Zelândia, a seqüência completa do DNAm_t revelou três mudanças adicionais no gene do complexo protéico I (Fischel-Ghodsian *et al.*, 1995).

Esta mutação foi encontrada em homoplasmia em todas as famílias analisadas neste trabalho (Fischel-Ghodsian, 2000).

1.5 - Tratamento e reabilitação da perda auditiva relacionada aos aspectos moleculares

As possibilidades de terapia gênica nas perdas auditivas, não alcançaram os passos das descobertas desta área. É interessante ressaltar que a orelha interna possui características que a fazem um órgão ideal para a transferência de genes mediada por vetores virais. Primeiro devido aos espaços preenchidos por líquidos com possibilidades de inoculação *in situ*. As moléculas secretadas na perilinfa podem se difundir e atingir alvos celulares distantes dentro da cóclea e do sistema vestibular. Além disso, o órgão possui um isolamento eletrofisiológico que permite o acesso ao funcionamento coclear e avaliação do fenótipo (Izumikawa *et al.*, 2005).

Apesar disso, nos últimos anos pouco se caminhou em direção à terapia gênica da surdez, em modelos animais. Entretanto, recentes experimentos publicados por um grupo de pesquisadores da Universidade de Michigan, mostraram a regeneração de células ciliadas de cobaias, inicialmente induzidos à perda auditiva pelo uso de aminoglicosídeos, por meio da implantação adenoviral do gene *Atoh 1* ou também chamado *Math 1*, cujo produto é um fator de transcrição que sinaliza durante a embriogênese o desenvolvimento de células ciliadas (Izumikawa *et al.*, 2005).

Apesar da terapia gênica ainda estar muito distante de sua aplicação na prática terapêutica, o implante coclear é um recurso viável e acessível para indivíduos com perda auditiva bilateral e profunda (Izumikawa *et al.*, 2005).

1.6 - Implante coclear

A partir da década de 1990, o implante coclear passou a ser uma indicação clínica valiosa, sendo cada vez mais utilizado na habilitação da criança com perda auditiva pré-lingual (quando a surdez ocorre antes da aquisição da linguagem oral), como também na reabilitação da criança com perda auditiva pós-lingual (quando a surdez ocorre após a aquisição da linguagem oral).

Atualmente, o implante coclear (ouvido biônico) é um recurso poderoso de tecnologia sofisticada, sendo uma prótese que substitui funcionalmente o órgão espiral e não necessita da existência de células ciliadas para transferir o sinal para o nervo auditivo, diferentemente da utilização de AASI (aparelho de amplificação sonora individual) que requer a existência destas células. Sendo assim, os eletrodos colocados na cóclea estimulam diretamente as fibras nervosas e as células ganglionares deste nervo. O implante coclear possibilita ao indivíduo a sensação da audição, mesmo os que tenham surdez profunda, e principalmente o reconhecimento dos sons da fala.

O sistema de implante coclear multicanal foi definido como uma prótese computadorizada composta por dispositivos internos (um feixe de eletrodos e um receptor estimulador) e por dispositivos externos (microfone, antena transmissora, fios, processador de fala e imã). 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.*, 1998).

O dispositivo externo é responsável por captar o som através do microfone posicionado junto à orelha e transmitido 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 imã e a transmissão elétrica ocorre transcutaneamente.

O Ministério da Saúde Brasileiro apresenta a portaria nº 1.278, de 20 de outubro de 1998, 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 da portaria nº 1.278/GM para os adultos. Já para as crianças, devido a grande demanda, o programa prioriza as que têm até 3 anos e 11 meses, com surdez pré-lingual, com uso de AASI bilateral (aqueles que não se adaptam ao AASI, provavelmente terão problemas com o implante), em fonoterapia e com uma família estruturada para que ocorra uma reabilitação fonoaudiológica adequada e sucesso no implante coclear.

Os critérios para a indicação de implante coclear, de um modo geral, são: perda auditiva neurossensorial severa a profunda bilateral, inabilidades 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 (Bevilacqua & Moret, 1997).

Além de tempo de surdez e de uso de AASI, acompanhamento fonoaudiológico e análise molecular para diagnosticar a etiologia da surdez, quando não detectado clinicamente, também são aspectos importantes no prognóstico e nos resultados quanto à percepção e desenvolvimento de fala e linguagem do paciente submetido ao implante coclear (Bevilacqua & Moret, 1997).

O Implante coclear torna o trabalho terapêutico com as habilidades auditivas possível de ser alcançado com mais facilidade e rapidez. O domínio da linguagem oral, que é a meta dos terapeutas auriorais, é uma conquista viável às crianças implantadas.

Alguns fatores interferem no desenvolvimento das habilidades auditivas das crianças que fazem uso de implante coclear. São eles:

A: características de cada criança: estilo cognitivo, aspectos psíquicos (memória e atenção) e o desenvolvimento emocional,

B: características familiares: como os pais e os irmãos que convivem com a criança,

C: ambiente adequado: ambiente acústico em casa e no contexto escolar que favoreça o desenvolvimento das habilidades auditivas,

D: terapeuta e/ou professor: devem ter capacitação e sensibilidade para realizar o trabalho adequadamente (Bevilacqua & Moret, 1997).

O implante coclear, com o desenvolvimento tecnológico dos últimos anos, vem se tornando uma opção para o tratamento de pacientes com perda auditiva neurosensorial bilateral profunda, demonstrando ser um recurso muito benéfico e efetivo na reabilitação desses pacientes. Nas crianças o desenvolvimento de fala e linguagem ocorre com a percepção da fala, gradativamente, após a cirurgia. No primeiro ano de uso do implante surge a emissão dos primeiros vocábulos; as primeiras frases e a linguagem espontânea surgem no segundo ano, após a cirurgia (Bevilacqua & Moret, 1997).

As crianças usuárias de implante coclear se desenvolvem mais rapidamente do que as crianças que usam aparelhos de amplificação sonora individual (AASI), e o processo terapêutico é mais dinâmico. As crianças implantadas conseguem obter maior domínio da leitura oro-facial e, alguns pacientes, conseguem ter um nível razoável de compreensão sem necessidade desta.

Existe uma tendência internacional à implantação em crianças cada vez mais jovens, a partir de um ano de idade. O implante coclear é, comumente, indicado como tratamento em casos de perda auditiva bilateral severa a profunda em pacientes que apresentem surdez pré ou pós-lingual. Sendo que os melhores resultados em crianças pré-linguais aparecem em casos em que o implante é feito entre o primeiro e segundo ano de vida (Bevilacqua & Formigoni *et al.*, 1997; Azevedo, 1997).

A possibilidade do implante em adultos surdos, ou seja, em pacientes com perda auditiva pós-lingual, tem por objetivo a aquisição da percepção da fala, e o reconhecimento das palavras (Bento *et al.*, 2004). Enquanto que em crianças os principais objetivos são o desenvolvimento da linguagem oral e a aquisição da habilidade auditiva (Bevilacqua, 1998; Illg *et al.*, 1999).

Os fatores que devem ser avaliados, visando à análise dos resultados pós-implante são: a idade do candidato, as características da surdez, o tempo de privação auditiva, a produção de fala e a habilidade de comunicação (Bento *et al.*, 2004).

Alguns trabalhos publicados recentemente propuseram que o implante coclear em pacientes com perda auditiva, com etiologia genética relacionada às mutações no gene GJB2, obtém igual ou melhor discriminação de fala comparada a crianças surdas pré-linguais com surdez de etiologia não esclarecida ou mesmo com surdez congênita como por exemplo, por citomegalovírus (Sinnathuray *et al.*, 2004; Green *et al.*, 2002). Nos casos com mutação no gene GJB2, a cóclea não está comprometida como ocorre nos casos de causa traumática ou infecciosa como a meningite ou ototoxicidade, que lesam a estrutura física da cóclea, impedindo muitas vezes que um número maior de eletrodos sejam introduzidos, por problemas como calcificação da cóclea. Os danos genéticos causados por mutações no gene GJB2 são com relação à estrutura dos conexons, como foi citado anteriormente, ocorrendo dificuldade de comunicação intercelular, não comprometendo as estruturas físicas da cóclea, podendo de fato favorecer o sucesso do implante coclear.

Um estudo comparando pacientes implantados com perda auditiva relacionada ao gene GJB2 ou não mostrou que todos os pacientes beneficiados com a técnica de implante coclear apresentaram resultados positivos com relação à percepção de fala. O efeito máximo do implante coclear na vida da criança parece ocorrer após quatro anos de uso (Nikolopoulos *et al.*, 1999). Entretanto, nos primeiros 24 meses de uso do dispositivo são observados os primeiros resultados quanto às habilidades de audição e de linguagem oral (Bevilacqua, 1998; Nikolopoulos *et al.*, 1999):

Alguns autores observaram que, após seis meses de uso do dispositivo, as crianças aumentaram o balbucio e a produção de vogais específicas (Molina *et al.*, 1999). Após um ano de uso do implante coclear, as crianças iniciaram a produção de duas palavras juntas, e após 24 meses começaram a produzir frases com a utilização de verbos (Bevilacqua, 1998; Molina *et al.*, 1997; Hassanzadeh *et al.*, 2002).

Para que se obtenha resultados favoráveis em pacientes implantados, uma equipe de profissionais deve estar relacionada à essa intervenção, otorrinolaringologistas (cirurgiões ou não), fonoaudiólogas, psicólogos, assistentes sociais e geneticistas. Um grupo multidisciplinar ampara paciente e sua família na busca por resultados positivos e satisfatórios.

Evidentemente que, os resultados obtidos em pacientes que receberam o implante coclear têm sido satisfatórios e animadores, mas existem muitas diferenças individuais. De qualquer forma os pacientes que apresentaram resultados positivos nos exames moleculares foram encaminhados ao aconselhamento genético com o objetivo de se esclarecer sobre a perda auditiva genética, seus riscos e considerações.

O trabalho clínico feito no Ambulatório de Otorrinolaringologia da Unicamp tem demonstrado vantagens na implantação de crianças mais novas entre 1 e 2 anos de idade. Existem alguns fatores prognósticos, com implicações diretas, no desenvolvimento da fala e da linguagem de crianças com perda auditiva que são denominados como: a idade em que se inicia a perda em relação à plasticidade cerebral e o período auditivo crítico; a duração da perda auditiva; se houve a adaptação precoce de aparelhos auditivos; o modo de comunicação e o ambiente sócio familiar.

Contudo, à habilidade das crianças mais novas fazerem uso do aprendizado incidental e da generalização diminuem a extensão do atraso lingüístico (Bollard & Green, 1999; Miyamoto *et al.*, 1999; Robbins, 2000).

Com as vantagens observadas ao realizarem a cirurgia em crianças com idade que varia entre 1 e 2 anos, momento em que a criança está completamente inserida no contexto familiar, se torna de suma importância um trabalho efetivo junto às famílias. Quanto maior o envolvimento familiar, melhor e mais rápido são os resultados observados. A natureza e o grau de comprometimento de pais e familiares é decisivo para o sucesso do implante (Simões & Maciel-Guerra, 1992; Waltzman & Shapiro, 1999).

Com o avanço das pesquisas na genética da perda auditiva, pôde-se observar a importância dos estudos de mutações no gene GJB2. O grande número de casos com mutações identificadas neste gene faz com que aumentem as expectativas com relação ao aconselhamento genético (Sobe *et al.*, 2000).

A viabilidade e os benefícios de rastreamento de mutações no gene da conexina 26 estão se refletindo na saúde pública. O uso de testes moleculares, em conjunto com os audiológicos, ajudará na detecção precoce da surdez, o que é de extrema importância no manejo desses pacientes, em particular nos casos de surdez progressiva, pois a estimulação da linguagem em seu período crítico faz com que as crianças aprendam a se comunicar antes que a surdez se torne mais grave. Além disso, é possível hoje inclusive, o diagnóstico preditivo, naqueles indivíduos afetados por mutações no gene da conexina 26, ainda sem manifestação da surdez. As consequências dessa predição, no âmbito social e familiar, são enormes, seja em relação à prevenção da surdez, ou no auxílio e redução de custos destinados à educação especial desses indivíduos, seu tratamento médico e decisão profissional (Sobe *et al.*, 2000; Sartorato *et al.*, 2000).

O aconselhamento genético é um processo de comunicação que visa, especialmente, orientar casais sobre o risco de doenças genéticas em descendentes e fornecer-lhes informação pertinente, exposta de forma simples, sincera e direta. Sendo assim ele abarca, esclarecimentos, tanto para indivíduos com perda auditiva quanto pessoas portadoras de outras anomalias genéticas. Mas quando se trata de aconselhamento para indivíduos com perda auditiva, dois aspectos devem ser considerados: a questão sócio-cultural e a heterogeneidade etiológica.

Quanto à heterogeneidade, uma grande parcela dos afetados é representada por casos esporádicos de surdez isolada. Sendo assim, em casos onde apenas o paciente em questão é afetado, sem apresentar casos de consangüinidade e nem apresente um diagnóstico de síndrome associada, fica extremamente complicado afirmar que a perda auditiva apresentada seja de caráter ambiental ou genético e assim fazer um aconselhamento adequado. A análise do histórico gestacional e das intercorrências pós-natais podem auxiliar na exclusão ou não da influência de fatores ambientais. Mas de qualquer forma, o aconselhamento genético tenta mostrar os riscos empíricos, calculados com base em pesquisas populacionais sobre a ocorrência da perda auditiva (Silva *et al.*, 1995).

Os riscos de recorrência do problema em filhos e outros parentes próximos devem ser alertados quando a etiologia é genética para a perda auditiva. O aconselhamento genético de pais de pacientes com perda auditiva esporádica permitirá avaliar o risco de uma futura criança poder ter perda auditiva semelhante. É de costume que médicos que acompanhem crianças encaminhem também as famílias para os serviços de aconselhamento genético.

OBJETIVOS

2.1 - Objetivo principal

Estudar a incidência de surdez genética em indivíduos candidatos ou submetidos ao implante coclear, os quais tiveram a surdez diagnosticada como, supostamente, idiopática, a fim de esclarecer a sua etiologia para aconselhamento genético e orientação familiar.

2.2 - Objetivos específicos

2.1.1 - Verificar as mutações:

- a) 35delG no gene da conexina 26 (GJB2),
- b) deleções del(GJB6-D13S1830) e del(GJB6-D13S1854),
- c) mitocondriais A1555G, A7445G e C1494T.

- ✓ Em indivíduos com perda auditiva neurosensorial não-sindrômica que foram submetidos ao implante coclear.
- ✓ Em indivíduos com perda auditiva neurosensorial não-sindrômica que se enquadram aos critérios estabelecidos no programa de implante coclear, considerados candidatos potenciais a esta opção.

2.1.2- Investigar a presença de outras mutações no gene GJB2.

- ✓ Em indivíduos com perda auditiva neurosensorial não-sindrômica que foram submetidos ao implante coclear, onde não foram observadas as mutações rastreadas no item 1.
- ✓ Em indivíduos com perda auditiva neurosensorial não-sindrômica que se enquadram aos critérios estabelecidos no programa de implante coclear,

Objetivos

considerados candidatos potenciais a esta opção, onde não foram observadas as mutações rastreadas no item 1.

2.1.3- Determinar a frequência de indivíduos submetidos ao implante coclear com surdez de etiologia genética e mutações no gene da conexina 26 (GJB2).

2.1.4- Buscar correlacionar a etiologia da surdez aos diferentes parâmetros relacionados ao sucesso do implante coclear.

3.1 Casuística

De acordo com as Normas Regulamentadoras de Pesquisa em Seres Humanos, resolução 196/96 do Ministério da Saúde, o projeto referente ao presente estudo foi encaminhado ao Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Médicas da Unicamp e à Comissão Nacional de Ética em Pesquisa de Brasília, DF (CONEP), com aprovação em ambos (Anexo 2).

Fizeram parte deste estudo 130 indivíduos, dos quais, 98 são pacientes e 11 familiares provenientes do Ambulatório de Otorrinolaringologia do Hospital das Clínicas-Unicamp; 17 são pacientes e 4 familiares provenientes do Hospital de Reabilitação de Anomalias Craniofaciais, da USP, Bauru (Centrinho). Dentre os 115 pacientes, 59 foram submetidos ao implante coclear na Unicamp e 10 implantados em Bauru, entretanto apenas em 49 pacientes os exames moleculares foram totalmente concluídos e considerados nesse trabalho. Todos os indivíduos apresentavam perda auditiva neurossensorial não síndrômica e todos foram incluídos nessa amostra tendo a sua participação previamente autorizada, mediante assinatura do Consentimento Livre e Esclarecido (Anexo 3), após terem recebido esclarecimento sobre o estudo a ser realizado.

Os pacientes da Unicamp foram encaminhados para essa pesquisa após passarem por avaliação clínica no Departamento de Otorrinolaringologia do HC-Unicamp. Foram coletadas amostras de sangue de cada paciente e encaminhadas diretamente ao Laboratório de Genética Humana do Centro de Biologia Molecular e Engenharia Genética (CBMEG) da Unicamp, onde foram realizados os exames genéticos.

3.2 Exames moleculares realizados em pacientes candidatos e submetidos ao implante coclear provenientes do HC-Unicamp e do HRACF- Bauru.

Os dados obtidos dos pacientes, tais como sexo, idade, data da ativação do implante estão relacionados nas Tabelas 1 e 2, respectivamente. Todos os pacientes avaliados neste estudo apresentavam perda auditiva bilateral profunda.

Os pacientes provenientes do HC-Unicamp foram numerados seguidos da letra A, compondo assim o grupo A e do HRACF-Bauru apresentam numeração seguida da letra B, compondo o grupo B.

*Material e Métodos***Tabela 1 – Dados das famílias pertencentes ao grupo A provenientes do HC- Unicamp.**

Famílias	Indivíduos	Sexo	Idade (anos)	Situação	Data da ativação do implante
1 A	1 A	M	SI	Implantado	06/11/2002
2 A	2 A	F	SI	Implantado	12/03/2003
3 A	3 A	F	8	Implantado	SI
	3 A-I (irmã)	F	SI	-----	-----
	3 A-M (mãe)	F	SI	-----	-----
	3 A-P (pai)	M	SI	-----	-----
4 A	4 A	F	4	Implantado	SI
	4 A (mãe)	F	SI	-----	-----
	4 A (pai)	M	SI	-----	-----
	4 A (tia)	F	SI	-----	-----
5 A	5 A	F	9	Candidata	-
6 A	6 A	M	6	Candidato	-
7 A	7 A	F	44	Candidato	-
8 A	8 A	F	61	Implantado	14/08/2002
9 A	9 A	M	5	Implantado	20/09/2004
10 A	10 A	F	4	Implantado	14/07/2004
11 A	11 A	M	4	Implantado	28/04/2004
	11 A (mãe)	F	SI	-----	-----
	11 A (pai)	M	SI	-----	-----
12 A	12 A	F	33	Candidata	-
13 A	13 A	M	4	Candidato	-
14 A	14 A	M	36	Candidato	-
15 A	15 A	F	5	Implantado	03/11/2004
16 A	16 A	M	62	Implantado	11/08/2004
17 A	17 A	F	58	Implantado	17/12/2003
18 A	18 A	M	6	Candidato	-
19 A	19 A	F	27	Implantado	28/01/2004
20 A	20 A	M	3	Implantado	03/03/2004
21 A	21 A	M	4	Implantado	SI
22 A	22 A	M	58	Implantado	08/10/2003
23 A	23 A	F	35	Implantado	26/05/2004
24 A	24 A	F	5	Implantado	SI
25 A	25 A	F	5	Implantado	31/03/2004
	25 A-M (mãe)	F	SI	-----	-
	25 A-P (pai)	M	SI	-----	-
	25 A-I (irmã)	F	SI	-----	-
26 A	26 A	F	8	Implantado	18/08/2004
27 A	27 A	F	3	Implantado	24/09/2004
28 A	28 A	M	3	Implantado	SI
29 A	29 A	M	5	Implantado	21/12/2004
30 A	30 A	F	3	Candidato	-
31 A	31 A	M	SI	Implantado	SI
32 A	32 A	M	3	Implantado	15/09/04
33 A	33 A	M	21	Candidato	-
34 A	34 A	F	SI	Candidato	-
35 A	35 A	M	24	Implantado	03/12/2004
36 A	36 A	F	56	Implantado	13/10/2004

Material e Métodos

Continuação Tabela 1 – Dados das famílias pertencentes ao grupo A provenientes do HC- Unicamp.

Famílias	Indivíduos	Sexo	Idade (anos)	Situação	Data da ativação do implante
37 A	37 A	M	4	Candidato	-
38 A	38 A	M	2	Candidato	-
39 A	39 A	M	3	Candidato	-
40 A	40 A	M	42	Candidato	-
41 A	41 A	F	47	Implantado	04/08/2004
42 A	42 A	F	3	Implantado	22/06/2005
43 A	43 A	F	54	Implantado	02/04/2003
44 A	44 A	F	SI	Candidato	-
45 A	45 A	F	SI	Candidato	-
46 A	46 A	M	3	Implantado	05/01/2005
47 A	47 A	F	4	Implantado	02/03/2005
48 A	48 A	M	3	Implantado	15/12/2004
49 A	49 A	M	4	Implantado	SI
50 A	50 A	M	4	Implantado	01/12/2004
51 A	51 A	M	61	Implantado	23/03/2005
52 A	52 A	M	17	Implantado	04/05/2005
53 A	53 A	F	4	Candidato	-
54 A	54 A	M	4	Implantado	30/03/2005
55 A	55 A	F	4	Implantado	06/04/2005
56 A	56 A	M	50	Candidato	-
57 A	57 A	F	61	Implantado	29/06/2005
58 A	58 A	M	9	Implantado	06/12/2004
59 A	59 A	M	3	Implantado	07/01/2005
60 A	60 A	F	43	Candidato	-
61 A	61 A	F	10	Implantado	06/05/2005
62 A	62 A	F	65	Implantado	09/03/2005
63 A	63 A	F	2	Candidato	-
64 A	64 A	F	2	Implantado	13/04/2005
65 A	65 A	M	3	Candidato	-
66 A	66 A	F	40	Implantado	09/10/2002
67 A	67 A	F	38	Implantado	10/07/2002
68 A	68 A	M	3	Candidato	-
69 A	69 A	M	45	Candidato	-
70 A	70 A	M	3	Candidato	-
71 A	71 A	F	4	Implantado	01/06/2005
72 A	72 A	F	60	Implantado	03/09/2003
73 A	73 A	F	3	Implantado	14/07/2004
74 A	74 A	F	56	Implantado	13/07/2005
75 A	75 A	F	3	Candidato	-
76 A	76 A	M	57	Candidato	-
77 A	77 A	M	78	Implantado	08/10/2003
78 A	78 A	F	50	Implantado	24/09/2003
79 A	79 A	M	1	Implantado	-
80 A	80 A	F	43	Candidato	-
81 A	81 A	F	66	Implantado	12/11/2003
82 A	82 A	M	39	Candidato	-

Material e Métodos

Continuação Tabela 1 – Dados das famílias pertencentes ao grupo A provenientes da Unicamp.

Famílias	Indivíduos	Sexo	Idade (anos)	Situação	Data da ativação do implante
83 A	83 A	M	44	Implantado	13/05/2005
84 A	84 A	M	50	Candidato	--
85 A	85 A	M	42	Implantado	12/03/2003
86 A	86 A	M	2	Candidato	-
87 A	87 A	M	62	Candidato	-
88 A	88 A	M	30	Candidato	-
89 A	89 A	F	35	Candidato	-
90 A	90 A	F	36	Candidato	-
91 A	91 A	M	2	Candidato	-
92 A	92 A	F	28	Candidato	-
93 A	93 A	M	48	Implantado	10/12/2003
94 A	94 A	F	46	Implantado	07/05/2003
95 A	95 A	M	46	Implantado	10/03/2004
96 A	96 A	M	5	Candidato	-
97 A	97 A	M	8	Candidato	-
98 A	98 A	M	2	Candidato	-

F: feminino; M: masculino; SI: sem informação.

Tabela 2 – Dados das famílias pertencentes ao grupo B provenientes de Bauru.

Famílias	Indivíduos	Sexo	Idade (anos)	Situação	Data da ativação do implante
1 B	1 B	M	SI	Implantado	SI
2 B	2 B	M	SI	Implantado	SI
3 A	3 B	M	4	Implantado	SI
	3 B-M (mãe)	F	25	-----	-----
	3 B-P (pai)	M	25	-----	-----
4 B	4 B	F	5	Implantado	SI
	4 B-M (mãe)	F	31	-----	-----
	4 B-P (pai)	M	38	-----	-----
5 B	5 B	M	11	Implantado	SI
6 B	6 B	M	7	Candidato	-
7 B	7 B	M	4	Candidato	-
8 B	8 B	M	4	Candidato	-
9 B	9 B	M	5	Candidato	-
10 B	10 B	M	4	Candidato	-
11 B	11 B	F	2	Candidato	-
12 B	12 B	F	11	Implantado	SI
13 B	13 B	M	30	Implantado	03/07/1998
14 B	14 B	F	10	Implantado	SI
15 B	15 B	F	1	Candidato	-
16 B	16 B	F	SI	Implantada	SI
17 B	17 B	F	4	Implantada	18/03/2004

F: feminino; M: masculino; SI: sem informação.

3.3 Métodos

3.3.1. Extração de DNA genômico de sangue periférico

A extração de DNA genômico foi realizada a partir de leucócitos obtidos em 10 a 15ml de sangue periférico coletado em tubos *Vacutainer* contendo EDTA 10% ou coletado em papel FTA, utilizando o método de fenol-clorofórmio, em protocolo adaptado no Laboratório de Genética Humana – CBMEG.

3.3.2. Detecção da mutação 35delG no gene GJB2

A partir do DNA extraído do sangue periférico total dos pacientes, a mutação **35delG** foi analisada pela técnica de AS-PCR, utilizando **ARMS primers** (do inglês Amplification-Refractory Mutations System) para detecção de mutações de ponto (Scott *et al.*, 1998). O *primer* normal (NOR) foi usado para amplificar o alelo sem a mutação **35delG** e o *primer* mutante (MUT) para o alelo com a mutação **35delG**. O *primer* comum (COM) foi usado como *primer* inverso juntamente com o *primer* NOR e MUT. Com essas duas reações (NOR e MUT) analisa-se cada indivíduo como sendo homozigoto normal para a mutação **35delG**, homozigoto mutante para essa mutação e heterozigoto. Os *primers* A e B são usados como controles internos de amplificação. Esta técnica foi desenvolvida no Laboratório de Genética Humana do Centro de Biologia Molecular e Engenharia Genética, a qual se encontra patenteada (patente nº P10005340-6; Método de teste para surdez de origem genética-UNICAMP, 2002).

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

Através da técnica de PCR foram analisadas as deleções $\Delta(GJB6-D13S1830)$ e $\Delta(GJB6-D13S1854)$ utilizando *primers* previamente descritos por del Castillo e colaboradores (2005). Desenvolveu-se um único teste diagnóstico envolvendo as duas deleções em um mesmo PCR. Os fragmentos de DNA amplificados 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 PCR e distinguir os alelos heterozigoto e homozigoto para qualquer das duas deleções.

A utilização dos três pares de *primers* (Tabela 3) em conjunto resulta em dois produtos diferentes de amplificação na PCR: 333pb referente ao éxon 1 do gene GJB6, 460pb e 564pb relacionados as deleções $\Delta(GJB6-D13S1830)$ e $\Delta(GJB6-D13S1854)$, respectivamente.

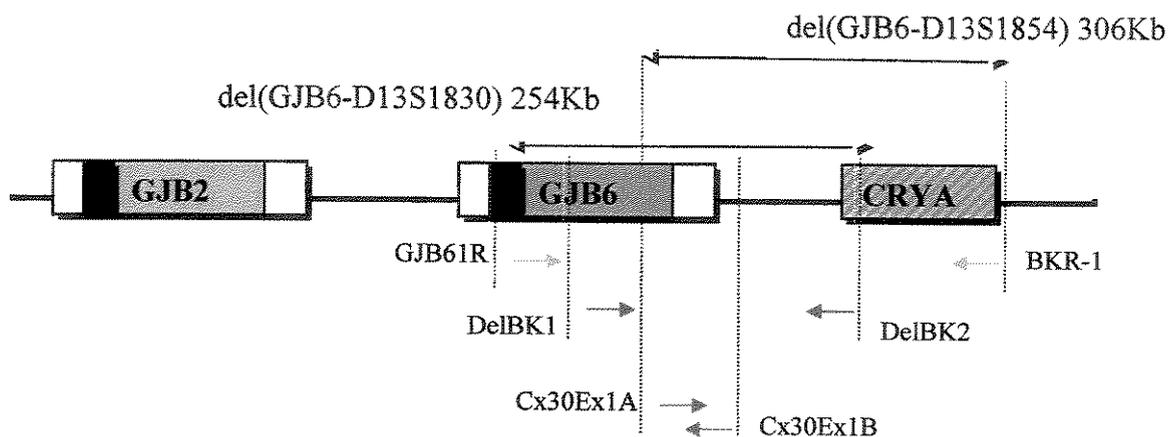


Figura 3: Esquema representando as duas deleções $\Delta(GJB6-D13S1830)$ e $\Delta(GJB6-D13S1854)$.

Tabela 3 - Sequência de *primers* para amplificação das deleções $\Delta(GJB6-D13S1830)$ e $\Delta(GJB6-D13S1854)$ no gene GJB6.

Par	Posição	Primer 5'→3'
1	ponto de quebra da del(<i>GJB6-D13S1830</i>)	GJB6-1R – TTT AGG GCA TGA TTG GGG TGA TTT BKR1 – CAC CAT GCG TAG CCT TAA CCA TTT T
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
3	exon 1 do gene GJB6	Cx30Ex1A – CGT CTT TGG GGG TGT TGC TT Cx30Ex1B – CAT GAA GAG GGC GTA CAA GTT AGA A

3.3.4. Amplificação do gene GJB2

O gene GJB2 possui 2311pb e é composto por apenas 1 éxon codificante, com 618pb (*GenBank*, número de acesso: M86849), codifica uma das proteínas da família das conexinas, a conexina 26 (26-KDA), com 226 aminoácidos. O éxon foi dividido para amplificação pela reação em cadeia da polimerase PCR – do inglês *Polymerase Chain Reaction*. As seqüências dos *primers*, a posição de anelamento e o tamanho (em pares de bases) dos fragmentos amplificados por cada par de *primers* são mostrados na tabela 4 (Kelsell *et al.*, 1997; Denoyelle *et al.*, 1997).

Tabela 4 – Sequência de *primers* para a amplificação do gene GJB2.

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

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

Na amplificação dos fragmentos foram utilizados ciclos de amplificação determinados de acordo com o T_m (temperatura de fusão, do inglês-melting) de cada *primer* utilizado como mostra a figura 4 (Kelsell *et al.*, 1997; Denoyelle *et al.*, 1997).

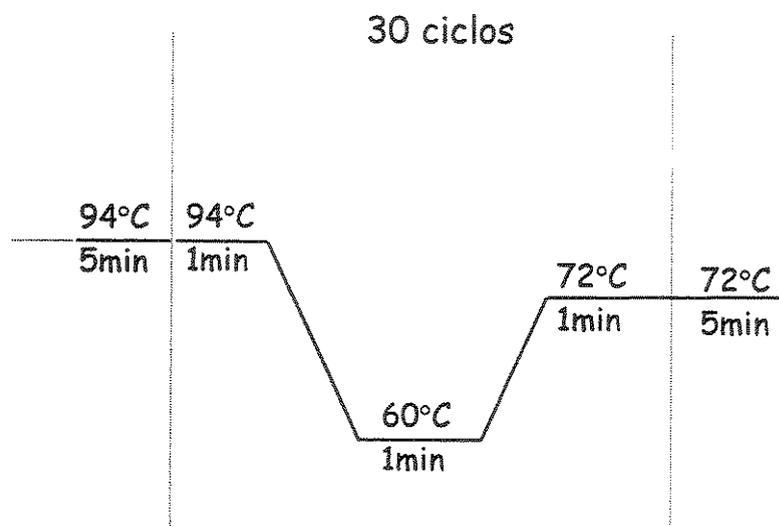


Figura 4 - Ciclo utilizado na amplificação do gene **GJB2**.

Os produtos de amplificação foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1% em tampão de corrida TBE, corados com Brometo de etídio e os fragmentos amplificados foram visualizados por luz ultravioleta.

3.3.5 Seqüenciamento automático do gene GJB2

3.3.5.1 Purificação dos produtos de PCR

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

3.3.5.2 Reação de seqüenciamento automático para produto de PCR

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

40-80ng de DNA

2 µl do *mix BigDye*

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

Completar com H₂O deionizada para 10µl

A reação de seqüenciamento consistiu de 30 ciclos nas condições especificadas na figura 5.

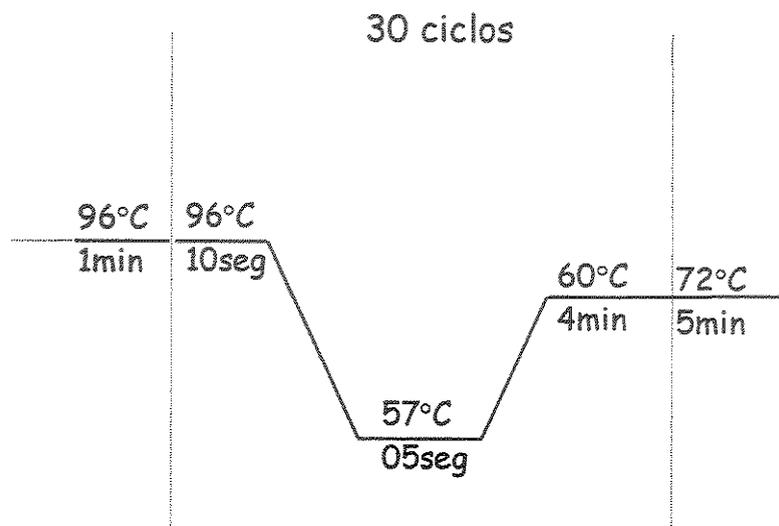


Figura 5: Ciclos utilizados no seqüenciamento do gene GJB2.

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

- . Adicionou-se 80µl de Isopropanol 75% e incubou-se por 15 minutos no escuro;
- . Centrifugou-se por 30 minutos a 13.000rpm, descartando o sobrenadante vagorosamente em papel absorvente;
- . Adicionou-se 150µl de etanol e centrifugou-se por 10 minutos descartando o sobrenadante e deixando o etanol escorrer e evaporar por completo.

As reações foram então mantidas a -20°C até o momento da aplicação do gel de seqüenciamento. Antes da corrida, o precipitado foi eluído em 3 µl de tampão formamida/Blue Dextran (5:1). As amostras foram previamente desnaturadas a 96°C por 2 minutos e 1,5 µl da amostra contida em cada tubo foram aplicadas no gel de seqüenciamento, sendo submetidos a uma corrida eletroforética. A composição do gel de seqüenciamento encontra-se descrita abaixo; posteriormente, tal gel foi filtrado em filtro 0,22 µm (Millipore).

3.3.5.3 Preparo do gel de acrilamida

Foi utilizado gel de poliacrilamida a 4,5%, composto por 100ml de solução de acrilamida (19:1), 100ml de tampão TBE 10x, 360g de uréia, 10g de resina (Dowex MR-3 [I-9005]) e água destilada para um volume final de 1 litro. Para a polimerização, foram adicionados 195 µl de persulfato de amônio 1% e 19,5 µl de TEMED (Tetrametiletilenodiamino).

Gel de acrilamida 4,5%:

360g de uréia

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

100ml de solução de acrilamida (19:1)

100ml de TBE 10X

Completar o volume com H₂O para 1 litro

3.3.5.4 Análise das seqüências obtidas

As seqüências obtidas foram alinhadas e comparadas com a seqüência normal do cDNA do gene GJB2 com o auxílio dos programas de análise *Chromas* e *Gene Runner*.

3.3.6. Detecção de mutações em genes mitocondriais

3.3.6.1 Mutação A1555G e C1494T no gene 12S rRNAr e mutações A7445G no gene tRNASer (UCN).

Foram amplificados fragmentos de DNAm_t de 2060pb no gene 12S rRNA, para detectar a mutação A1555G e fragmentos de 441pb para detectar a mutação C1494T, e fragmentos de 1821pb para detectar a mutação A7445G no gene tRNASer (UCN). Para estas reações de amplificação foram sintetizados três pares de *primers* como mostrado na tabela 5 a seguir, onde os pares 1, 2 e 3 foram utilizados para detecção das mutações C1494T, A1555G e A7445G, respectivamente (Anderson *et al.*, 1981; Zhao *et al.*, 2003).

Tabela 5: Posições de anelamento e seqüência dos *primers* utilizados na amplificação dos fragmentos mitocondriais e tamanho dos fragmentos gerados.

Par de <i>primers</i>	Gene	Seqüência dos <i>Primers</i> 5'→3'	Tamanho do fragmento (pb)
1	12S rRNA	MIT F- GTCGAAGGTGGATTTAGCAGT MIT R- CAGAAGGTATAGGGGTTAGTC	441
2	12S rRNA	MIT1F- ATATCTGAACACACAATAGC MIT 1R- GAAACCGACCTGGATTACTC	2060
3	tRNASer (UCN)	MIT 2F- AAATGATCTGCTGCAGTGCT MIT 2R- TCCTTTAGTGTTGTGTATGG	1821

As amplificações dos três fragmentos foram realizadas em 30 ciclos utilizando 200 a 500ng de DNA genômico, 200 μ M de solução contendo desoxinucleotídeos trifosfato (dATP, dCTP, dGTP, dTTP), 1 μ l de cada *primer* 0,1 μ g/ μ l (direto e inverso), 0,5 μ l de Taq DNA polimerase (5U/ μ l), 5 μ l de tampão e 3 μ l de MgCl₂ (25mM), em um volume final de 50 μ l. O ciclo para amplificação está esquematizado na figura 6 a seguir.

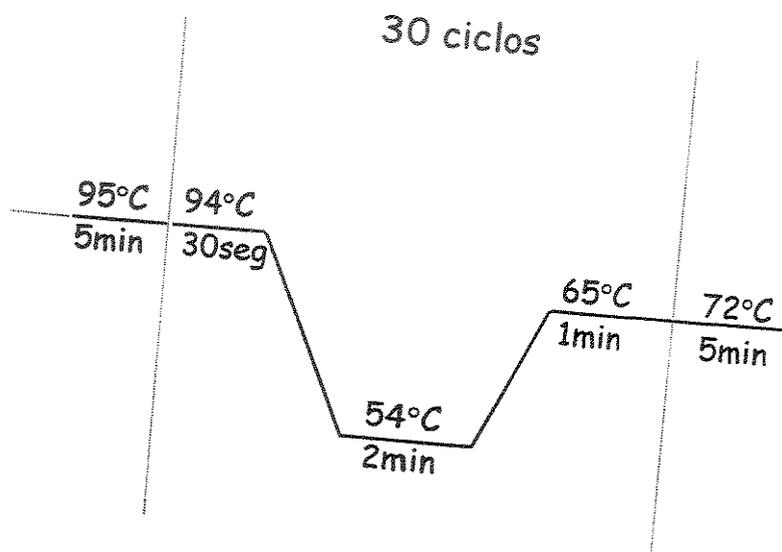


Figura 6: Ciclo utilizado na amplificação da região mitocondrial contendo as mutações A1555G, A7445G e C1494T.

Material e Métodos

Os produtos de amplificação foram submetidos à análise de restrição usando a enzima *BsmA* I, por duas horas a 55° C para detecção da mutação A1555G, com *Xba* I por duas horas a 37° C para detecção da mutação A7445G e com *Hph* I para a detecção da mutação C1494T da seguinte forma:

17,5µl de produto de PCR

2,0µl de tampão da enzima

0,5µl da enzima respectiva

A digestão de produtos de PCR normais para a mutação A1555G com a enzima *BsmA* I gera 3 fragmentos de 1100pb, 51pb e 444pb. Quando esta mutação é detectada, um dos sítios de restrição é abolido; assim, apenas dois fragmentos são gerados, um de 1616pb e outro de 444bp.

Com a presença da mutação A7445G, dois fragmentos de 1386pb e 435pb são gerados, após digestão com a enzima *Xba* I. Na ausência da referida mutação, um sítio adicional para a enzima é criado, sendo gerados 3 fragmentos de 846, 540 e 435 pb.

E com a presença da mutação C1494T o sítio de restrição é abolido mostrando somente uma banda de 441pb. Na ausência desta mutação são visualizados 2 fragmentos um com 370pb e outro com 71pb.

Os produtos da digestão foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1% em tampão Tris-Borato-EDTA, ou TBE. O gel foi corado com brometo de etídio e os fragmentos amplificados foram visualizados sob iluminação ultravioleta e fotografados.

Os produtos de amplificação das três mutações estudadas, após serem submetidos à digestão pelas enzimas específicas, apresentam fragmentos de digestão de diferentes tamanhos conforme apresentado na tabela 6.

*Material e Métodos***Tabela 6:** Produtos da digestão com enzimas de restrição.

Mutação	Tamanho dos produtos de amplificação	Enzima de restrição	Tamanho dos produtos de digestão
A1555G	2060pb	<i>BsmA I</i>	sem mutação: 444pb, 516pb e 1100pb com mutação: 444pb e 1616pb
A7445G	1821pb	<i>Xba I</i>	sem mutação: 435pb, 540pb, 846pb com mutação: 435pb e 1386pb
C1494T	441pb	<i>Hph I</i>	Sem mutação: 441pb Com mutação: 370pb e 71pb

Resultados

Foram analisados, quanto à presença de mutações em genes relacionados à perda auditiva, 98 pacientes, candidatos ou já submetidos ao implante coclear e 11 familiares analisados apenas quanto à mutação 35delG no gene GJB2, provenientes do Hospital das Clínicas-Unicamp; pertencentes ao Grupo A e 17 pacientes candidatos ou já submetidos ao implante coclear assim como 4 familiares também analisados apenas quanto à mutação 35delG no gene GJB2, provenientes do HRACF-Bauru, pertencentes ao Grupo B.

Os resultados são apresentados, a seguir, conforme os testes moleculares foram realizados: PCR alelo-específico, deleções Δ (GJB6-D13S1830) e Δ (GJB6-D13S1854), mutações mitocondriais A1555G, A7445G e C1494T e seqüenciamento automático.

4.1 - Análise do gene GJB2

Para a análise do gene GJB2, foram amplificados pela técnica de PCR dois fragmentos, dividindo-se desta forma, o éxon do gene a fim de facilitar o seu seqüenciamento (figura 7):

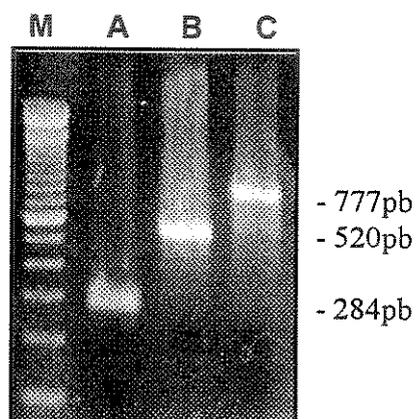


Figura 7 – Gene GJB2 amplificado na reação de PCR. M- marcador de peso molecular (100pb – Gibco BRL[®]); A e B – fragmentos do gene denominados Cx1 e Cx2, respectivamente; C – éxon do gene GJB2.

4.2 - Identificação da mutação 35delG encontrada no gene GJB2

Inicialmente os pacientes e familiares foram analisados quanto à presença da mutação 35delG, pela técnica de AS-PCR. A figura 8 ilustra os resultados obtidos a partir de um indivíduo normal, heterozigoto e homozigoto para a mutação 35delG.

Dentre os 49 pacientes implantados e com análises moleculares concluídas foram encontrados 8 pacientes homozigotos, 7 pacientes heterozigotos, 1 paciente heterozigoto composto e 33 pacientes normais. A mutação 35delG está presente em 32,65% dos pacientes implantados, sendo responsável por 75% dos alelos mutantes, considerando os genes GJB2, GJB6 e os mitocondriais, 12S RNAr e tRNASer(UCN). Quando considerado apenas o gene GJB2, a mutação 35delG foi responsável por 84,2% dos alelos mutantes.

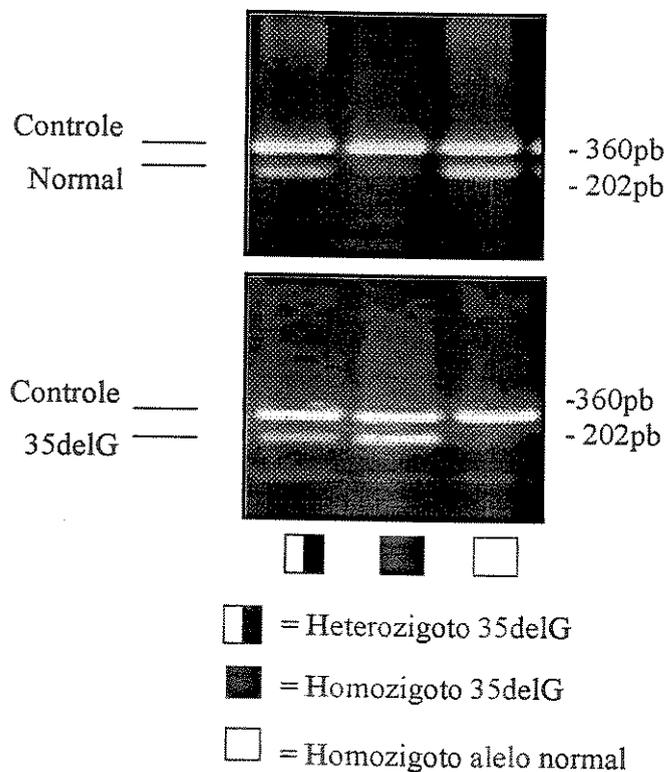


Figura 8 – Técnica de AS-PCR para detecção da mutação 35delG.

4.3 - Identificação das deleções $\Delta(\text{GJB6-D13S1830})$ e $\Delta(\text{GJB6-D13S1854})$

No presente estudo as deleções $\Delta(\text{GJB6-D13S1830})$ e $\Delta(\text{GJB6-D13S1854})$ foram pesquisadas em todos os pacientes. Somente os familiares da paciente 4A foram analisados quanto à primeira deleção, devido a paciente apresentar esta mutação em homozigose. O heredograma desta família é mostrado na figura 10. A figura 9 abaixo ilustra resultados das duas deleções.

A $\Delta(\text{GJB6-D13S1854})$ não foi encontrada em nenhum dos pacientes analisados.

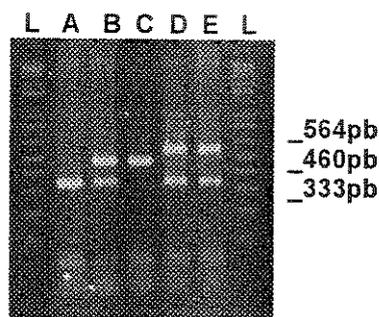


Figura 9 - Resultado da técnica de PCR para detecção das deleções $\Delta(\text{GJB6-D13S1830})$ e $\Delta(\text{GJB6-D13S1854})$ M = marcador *ladder* 100pb Gibco BRL[®]; A – indivíduo normal; B- $\Delta(\text{GJB6-D13S1830})/\text{N}$; C- $\Delta(\text{GJB6-D13S1830})/\Delta(\text{GJB6-D13S1830})$; D e E - $\Delta(\text{GJB6-D13S1854})/\text{N}$.

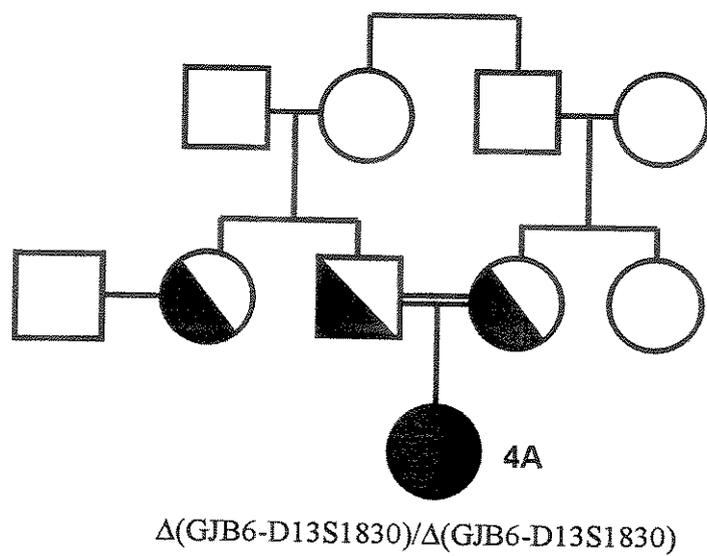


Figura 10 – Heredograma da família 4A.

4.4 - Identificação da mutação A1555G no gene mitocondrial 12S rRNA

Para a detecção da mutação A1555G foi amplificado um fragmento do gene 12S rRNA de cada paciente, pela técnica de PCR (figura 11).

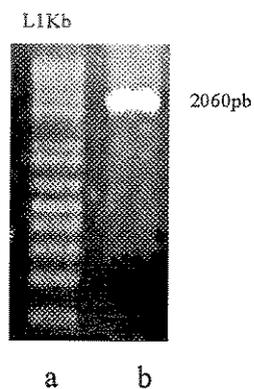


Figura 11: Fragmento do gene 12S rRNA amplificado pela reação de PCR em gel de agarose 1%, corado com brometo de etídeo. (a) *ladder* de 1Kb Gibco BRL[®]; e (b) fragmento de 2060pb.

A figura 12 ilustra o resultado da digestão do produto de PCR do paciente 51A portador e a figura 13 o resultado de um não portador da mutação A1555G.

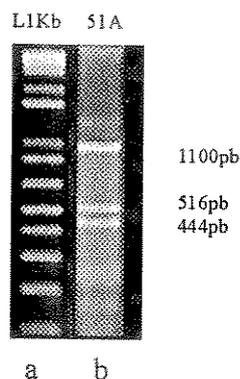
Resultados

Figura 12: Fragmento da digestão do gene 12S rRNA com a enzima *BsmA I*, em gel de agarose 1%, corado com brometo de etídeo. (a) *ladder* de 1Kb Gibco BRL®; e (b) fragmentos de 1100pb, 516pb e 444pb no paciente 51A, ilustrando a presença da mutação A1555G.

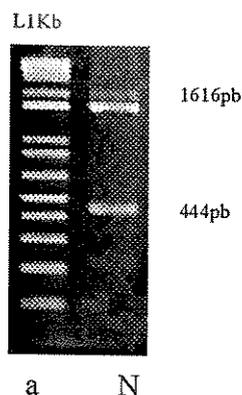


Figura 13: Fragmento da digestão do gene 12S rRNA com a enzima *BsmA I*, em gel de agarose 1%, corado com brometo de etídeo. (a) *ladder* de 1Kb Gibco BRL®; e N fragmentos de 1616pb e 444pb, de um indivíduo normal para a mutação A1555G.

No fragmento com a mutação A1555G ocorre o ganho de um sítio de restrição, portanto sendo observados três fragmentos no produto da digestão (Figura 12).

4.5 - Identificação da mutação A7445G no gene mitocondrial tRNASer(UCN)

Para a detecção da mutação A7445G foi amplificado um fragmento do gene tRNASer (UCN) pela técnica de PCR (figura 14).

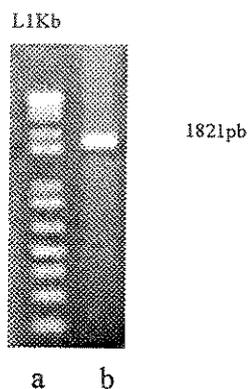


Figura 14: Fragmento do gene tRNASer (UCN) amplificado pela técnica de PCR, em gel de agarose 1%, corado com brometo de etídeo. (a) *ladder* de 1Kb Gibco BRL®; e (b) fragmento de 1821pb.

A figura 16 ilustra o resultado da digestão do produto do PCR de um controle positivo para a mutação A7445G e a figura 15 o resultado de um indivíduo normal.

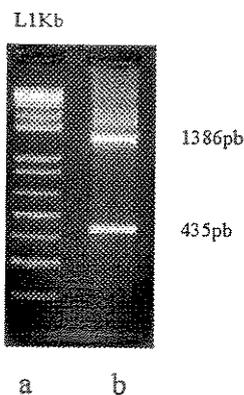


Figura 15: Fragmento da digestão do gene tRNASer (UCN) com a enzima *Xba* I de um controle positivo para a mutação A7445G, em gel de agarose 1%, corado com brometo de etídeo. (a) *ladder* de 1Kb Gibco BRL®; e (b) fragmentos de 1386pb e 435pb.

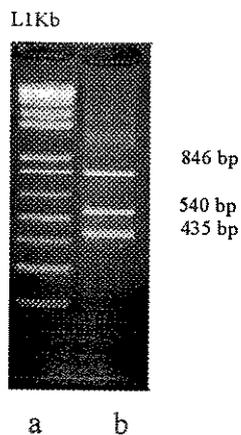


Figura 16: Fragmento da digestão do gene tRNASer (UCN) com a enzima *Xba* I de um indivíduo normal para a mutação A7445G, em gel de agarose 1%, corado com brometo de etídeo. (a) *ladder* de 1Kb Gibco BRL®; e (b) fragmentos de 846pb, 540pb e 435pb.

A mutação A7445G não foi encontrada entre os pacientes analisados neste estudo.

4.6 - Identificação da mutação C1494T no gene mitocondrial tRNASer(UCN)

Para a detecção da mutação C1494T foi amplificado um fragmento do gene tRNASer (UCN) pela técnica de PCR e em seguida foi feita a análise de restrição com a enzima *Hph I* (Figura 17).

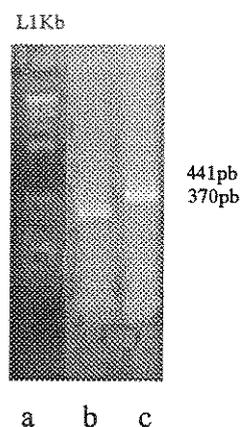


Figura 17: (a) *Ladder* de 1Kb Gibco BRL[®], (b) fragmento da digestão do gene tRNASer (UCN) com a enzima *Hph I* de um indivíduo normal para a mutação com 370pb e (c) fragmento da digestão do gene tRNASer (UCN) com a enzima *Hph I* de um controle positivo para a mutação C1494T com 441pb em gel de agarose 1%, corado com brometo de etídeo.

A mutação C1494T não foi encontrada entre os pacientes analisados neste estudo.

4.7 - Identificação de mutações no gene GJB2

4.7.1- Em pacientes submetidos ao implante coclear

O seqüenciamento completo do gene GJB2 foi realizado nos pacientes onde não foram observadas as mutações 35delG, as deleções Δ (GJB6-D13S1830) e Δ (GJB6-D13S1854) e as mutações A1555G no gene mitocondrial 12S rRNA, A7445G e C1494T no gene mitocondrial tRNASer(UCN).

Dentre os pacientes submetidos ao implante coclear e com análises completas dos genes (N=49) foram encontradas três alterações sendo G>A na posição 79 (polimorfismo V27I), G>A na posição 101 (M34T) e T>C na posição 109 (V52); duas mutações *missense* também foram detectadas, a V37I e a W172X, todas já descritas na literatura e também uma mutação *missense* nova, a K168R.

4.7.1 - Alteração G>A na posição 79

Nos pacientes 18A e 9B foi detectada essa alteração em heterozigose (V27I/N). Esta se trata da substituição do aminoácido valina por isoleucina no códon 27, situada no primeiro domínio transmembrânico da proteína e é considerada um polimorfismo. A variação da base G para a base A no códon 27 do gene GJB2 foi previamente descrita por Kelley *et al* em 1998. A figura 18 mostra o resultado obtido para o paciente 18 A.

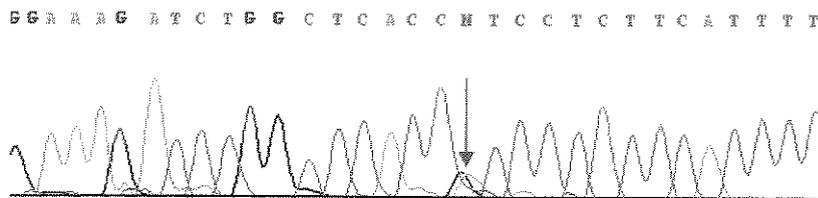


Figura 18 – Eletroferograma mostrando a alteração G>A na posição 79 em heterozigose. A fita está apresentada na direção *sense* do *primer*

4.7.2 - Alteração T>C na posição 101

A mutação M34T foi detectada no paciente 85A em heterozigose (M34T/N). Esta mutação é caracterizada pela mudança da base T para C, na posição 101, acarretando a mudança do aminoácido de metionina para tirosina no códon 34, ocorrendo no primeiro domínio transmembrânico da proteína (Griffith *et al.*, 2000). A figura 19 mostra o resultado do seqüenciamento.

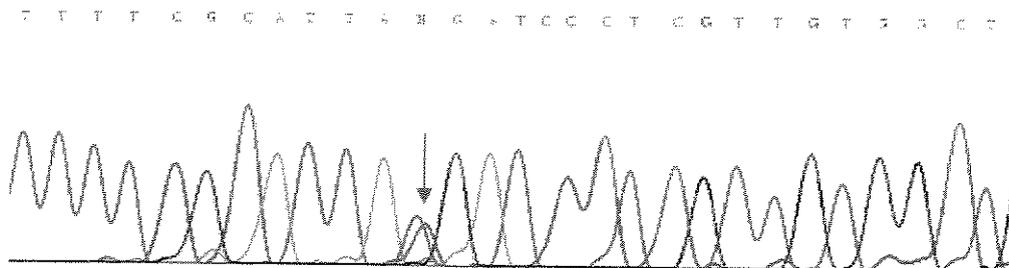


Figura 19 - Eletroferograma mostrando a mutação M34T em heterozigose. A fita está apresentada na direção *sense* do *primer*.

4.7.3 - Alteração G>A na posição 109

A mutação V37I foi detectada no paciente 5B em homozigose (V37I/V37I) trata-se de uma mutação descrita primeiramente por Kelley *et al.* em 1998, sendo uma transição na posição 109, da base G para A, levando à substituição do aminoácido valina para isoleucina no códon 37 (Figura 20). Essa alteração de aminoácido ocorre no primeiro domínio transmembrânico da conexina 26.

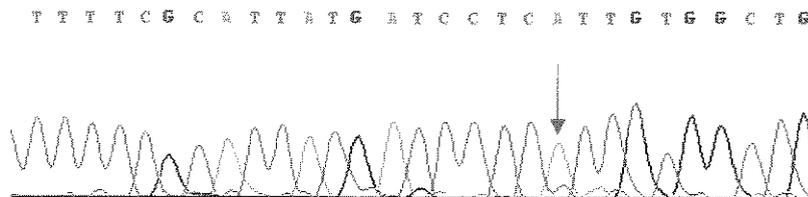


Figura 20 – Eletroferograma mostrando a mutação V37I em homozigose. A fita está apresentada na direção *sense* do *primer*.

4.7.4 - Alteração C>T na posição 116

A alteração da base C para T no códon 52 do gene GJB2 foi detectada no paciente 5A em heterozigose (V52/N) (figura 21). Trata-se de uma mutação silenciosa V52 onde não ocorre substituição do aminoácido valina, portanto essa alteração não é responsável pela perda auditiva nesse paciente.

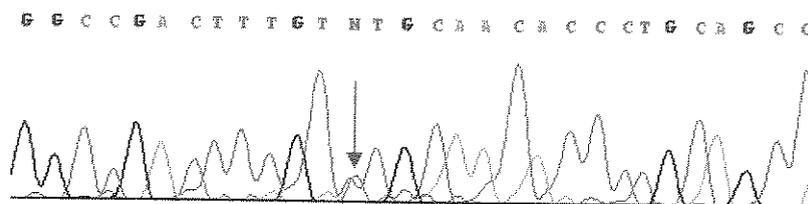


Figura 21 – Eletroferograma da mutação silenciosa V52 em heterozigose. A fita está apresentada na direção *sense* do *primer*.

4.7.5 - Alteração A>G na posição 503

A mutação K168R foi encontrada em heterozigose no paciente 24A (K168R/N). Esta mutação ainda não foi descrita na literatura. Ela provoca a mudança da base A para G na posição 503, acarretando a troca do aminoácido lisina para arginina no códon 168. A figura 22 mostra o resultado do seqüenciamento.

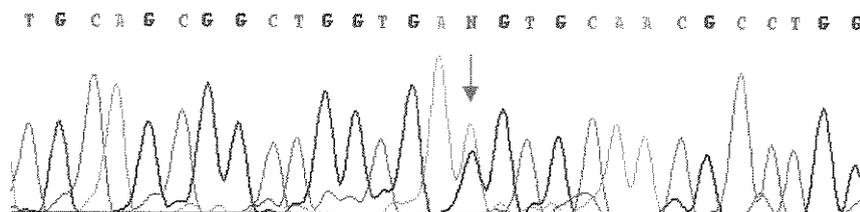


Figura 22 – Eletroferograma mostrando a mutação K168R em heterozigose. A fita está apresentada na direção *antisense* do *primer*.

Como se trata de uma mutação nova, não existem estudos de expressão que comprovem a sua patogenicidade. Entretanto ela não foi encontrada em uma amostra controle de 50 indivíduos normais, ou seja, ouvintes, utilizando a mesma metodologia, diminuindo a possibilidade de tratar-se de um polimorfismo. Estudos futuros poderão esclarecer melhor a relação dessa mutação K168R com perda auditiva neurossensorial.

4.7.6 - Alteração G>A na posição 516

A mutação W172X foi previamente descrita por Alexandrino (2003). É encontrada em heterozigose no paciente 25A, (W172X/35delG), sendo, portanto, um heterozigoto composto. Ela provoca a mudança da base G para A na posição 516, acarretando a troca do aminoácido triptofano para um códon *stop*, no códon 172, fazendo com que a transcrição do gene seja interrompida. A figura 23 apresenta o resultado do seqüenciamento.

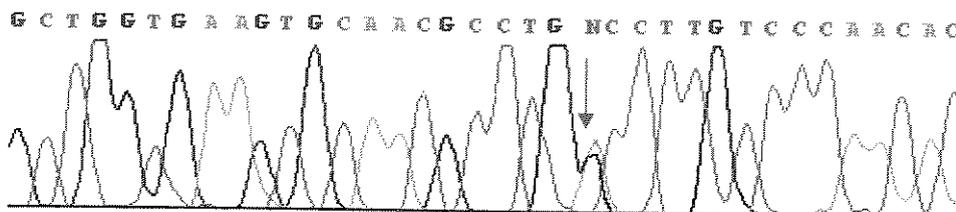


Figura 23- Eletroferograma mostrando a mutação W172X em heterozigose. A fita está apresentada na direção *sense* do *primer*.

Resultados

Os resultados da análise molecular dos 130 indivíduos desta pesquisa, sendo 98 pacientes candidatos e já submetidos ao implante coclear e 11 familiares totalizando 109 indivíduos pertencentes ao Grupo A e 17 pacientes candidatos e já submetidos ao implante coclear e 4 familiares totalizando 21 indivíduos pertencentes ao Grupo B são apresentados nas tabelas 7 e 8 respectivamente.

Tabela 7 – Genótipos das famílias e indivíduos provenientes do HC-Unicamp (Grupo A).

Famílias	Indivíduos	AS-PCR 35delG	Seqüencia- mento GJB2 alelo1/alelo2	Deleções no gene GJB6		Gene 12srRNA		Gene tRNA
				Δ (GJB6- D13S1830)	Δ (GJB6- D13S1854)	A1555G	C1494T	A7445G
1 A	1 A	N/N	N/N	N/N	N/N	(-)	(-)	(-)
2 A	2 A	N/N	N/N	N/N	N/N	(-)	(-)	(-)
3 A	3 A	35delG / 35delG	NR	N/N	N/N	(-)	(-)	(-)
	3 A (irmã)	35delG / N	NR	NR	NR	NR	NR	NR
	3 A (mãe)	35delG / N	NR	NR	NR	NR	NR	NR
	3 A (pai)	35delG / N	NR	NR	NR	NR	NR	NR
4 A	4 A	N/N	NR	Δ (GJB6 – D13S1830) / Δ (GJB6 – D13S1830)	N/N	(-)	(-)	(-)
	4 A (mãe)	N/N	NR	Δ (GJB6 – D13S1830)N	NR	NR	NR	NR
	4 A (pai)	N/N	NR	Δ (GJB6 – D13S1830)N	NR	NR	NR	NR
	4 A (tia)	N/N	NR	Δ (GJB6 – D13S1830)N	NR	NR	NR	NR
5 A	5 A	N/N	V52** / N	N/N	N/N	(-)	(-)	(-)
6 A	6 A	N/N	N / N	N / N	N / N	(-)	(-)	(-)
7 A	7 A	N/N	N / N	N / N	N / N	(-)	(-)	(-)
8 A	8 A	N/N	N / N	N / N	N / N	(-)	(-)	(-)
9 A	9 A	N/N	N / N	N / N	N / N	(-)	(-)	(-)
10 A	10 A	N / N	N / N	N / N	N / N	(-)	(-)	(-)
11 A	11 A	35delG / 35delG	NR	N / N	N / N	(-)	(-)	(-)
	11 A (mãe)	35delG / N	NR	NR	NR	NR	NR	NR
	11 A (pai)	35delG / N	NR	NR	NR	NR	NR	NR
12 A	12 A	N / N	N / N	N / N	N / N	(-)	(-)	(-)
13 A	13 A	N / N	N / N	N / N	N / N	(-)	(-)	(-)
14 A	14 A	N / N	N / N	N / N	N / N	(-)	(-)	(-)
15 A	15 A	35delG / 35delG	NR	N / N	N / N	(-)	(-)	(-)
16 A	16 A	N / N	N / N	N / N	N / N	(-)	(-)	(-)

*: polimorfismo; **: mutação silenciosa, NR: não realizado; (-): negativo; (+): positivo

Resultados

Continuação Tabela 7 – Genótipos das famílias e indivíduos provenientes do HC-Unicamp (Grupo A).

Famílias	Indivíduos	AS-PCR 35delG	Sequenciamento GJB2 alelo1/alelo2	Deleções no gene GJB6		Gene 12srRNA		Gene tRNA
				Δ(GJB6- D13S1830)	Δ(GJB6- D13S1854)	A1555G	C1494T	A7445G
17 A	17 A	N/N	N/N	N/N	N/N	(-)	(-)	(-)
18 A	18 A	N/N	V27I*/N	N/N	N/N	(-)	(-)	(-)
19 A	19 A	N/N	N/N	N/N	N/N	(-)	(-)	(-)
20 A	20 A	N/N	N/N	N/N	N/N	(-)	(-)	(-)
21 A	21 A	N/N	N/N	N/N	N/N	(-)	(-)	(-)
22 A	22 A	N/N	NR	N/N	N/N	(-)	(-)	(-)
23 A	23 A	N/N	NR	N/N	N/N	(-)	(-)	(-)
24 A	24 A	N/N	K168R/N	N/N	N/N	(-)	(-)	(-)
25 A	25 A	heterozigoto	W172X/35delG	N/N	N/N	(-)	(-)	(-)
	25 A (mãe)	heterozigoto	35delG/N	NR	NR	NR	NR	NR
	25 A (pai)	N/N	W172X/N	NR	NR	NR	NR	NR
	25 A (irmã)	N/N	NR	NR	NR	NR	NR	NR
26 A	26 A	N/N	N/N	N/N	N/N	(-)	(-)	(-)
27 A	27 A	N/N	N/N	N/N	N/N	(-)	(-)	(-)
28 A	28 A	35delG/35delG	NR	N/N	N/N	(-)	(-)	(-)
29 A	29 A	N/N	N/N	N/N	N/N	(-)	(-)	(-)
30 A	30 A	N/N	NR	N/N	N/N	(-)	(-)	(-)
31 A	31 A	N/N	NR	N/N	N/N	(-)	(-)	(-)
32 A	32 A	N/N	N/N	N/N	N/N	(-)	(-)	(-)
33 A	33 A	N/N	NR	N/N	N/N	(-)	(-)	(-)
34 A	34 A	N/N	N/N	N/N	N/N	(-)	(-)	(-)
35 A	35 A	N/N	N/N	N/N	N/N	(-)	(-)	(-)
36 A	36 A	N/N	N/N	N/N	N/N	(-)	(-)	(-)
37 A	37 A	N/N	NR	N/N	N/N	(-)	(-)	(-)
38 A	38 A	N/N	NR	N/N	N/N	(-)	(-)	(-)
39 A	39 A	heterozigoto	35del/N	N/N	N/N	(-)	(-)	(-)
40 A	40 A	N/N	NR	N/N	N/N	(-)	(-)	(-)
41 A	41 A	N/N	N/N	N/N	N/N	(-)	(-)	(-)
42 A	42 A	N/N	NR	N/N	N/N	(-)	(-)	(-)
43 A	43 A	N/N	NR	N/N	N/N	(-)	(-)	(-)
44 A	44 A	N/N	NR	N/N	N/N	(-)	(-)	(-)
45 A	45 A	N/N	NR	N/N	N/N	(-)	(-)	(-)
46 A	46 A	N/N	N/N	N/N	N/N	(-)	(-)	(-)
47 A	47 A	35delG/35delG	NR	N/N	N/N	(-)	(-)	(-)
48 A	48 A	heterozigoto	35delG/N	N/N	N/N	(-)	(-)	(-)
49 A	49 A	N/N	NR	N/N	N/N	(-)	(-)	(-)
50 A	50 A	heterozigoto	35delG/N	N/N	N/N	(-)	(-)	(-)
51 A	51 A	N/N	NR	N/N	N/N	(+)	(-)	(-)
52 A	52 A	N/N	NR	N/N	N/N	(-)	(-)	(-)
53 A	53 A	N/N	NR	N/N	N/N	(-)	(-)	(-)
54 A	54 A	N/N	NR	N/N	N/N	(-)	(-)	(-)
55 A	55 A	N/N	N/N	N/N	N/N	(-)	(-)	(-)

*: polimorfismo; **: mutação silenciosa, NR: não realizado; (-): negativo; (+): positivo

Resultados

Continuação Tabela 7 – Genótipos das famílias e indivíduos provenientes do HC-Unicamp (Grupo A).

Famílias	Indivíduos	AS-PCR 35delG	Sequenciamento GJB2 alelo1/alelo2	Deleções no gene GJB6		Gene 12srRNA		Gene tRNA
				Δ(GJB6- D13S1830)	Δ(GJB6- D13S1854)	A1555G	C1494T	A7445G
56 A	56 A	heterozigoto	35delG / N	N / N	N / N	(-)	(-)	(-)
57 A	57 A	N / N	NR	N / N	N / N	(-)	(-)	(-)
58 A	58 A	heterozigoto	35delG / N	N / N	N / N	(-)	(-)	(-)
59 A	59 A	N / N	NR	N / N	N / N	(-)	(-)	(-)
60 A	60 A	N / N	NR	N / N	N / N	(-)	(-)	(-)
61 A	61 A	heterozigoto	35delG / N	N / N	N / N	(-)	(-)	(-)
62 A	62 A	N / N	NR	N / N	N / N	(-)	(-)	(-)
63 A	63 A	N / N	NR	N / N	N / N	(-)	(-)	(-)
64 A	64 A	N / N	N / N	N / N	N / N	(-)	(-)	(-)
65 A	65 A	N / N	NR	N / N	N / N	(-)	(-)	(-)
66 A	66 A	N / N	N / N	N / N	N / N	(-)	(-)	(-)
67 A	67 A	N / N	NR	N / N	N / N	(-)	(-)	(-)
68 A	68 A	N / N	NR	N / N	N / N	(-)	(-)	(-)
69 A	69 A	N / N	NR	N / N	N / N	(-)	(-)	(-)
70 A	70 A	N / N	NR	N / N	N / N	(-)	(-)	(-)
71 A	71 A	N / N	NR	N / N	N / N	(-)	(-)	(-)
72 A	72 A	N / N	N / N	N / N	N / N	(-)	(-)	(-)
73 A	73 A	N / N	N / N	N / N	N / N	(-)	(-)	(-)
74 A	74 A	N / N	NR	N / N	N / N	(-)	(-)	(-)
75 A	75 A	N / N	NR	N / N	N / N	(-)	(-)	(-)
76 A	76 A	N / N	NR	N / N	N / N	(-)	(-)	(-)
77 A	77 A	N / N	NR	N / N	N / N	(-)	(-)	(-)
78 A	78 A	N / N	NR	N / N	N / N	(-)	(-)	(-)
79 A	79 A	heterozigoto	35delG / N	N / N	N / N	(-)	(-)	(-)
80 A	80 A	N / N	NR	N / N	N / N	(-)	(-)	(-)
81 A	81 A	N / N	NR	N / N	N / N	(-)	(-)	(-)
82 A	82 A	N / N	NR	N / N	N / N	(-)	(-)	(-)
83 A	83 A	N / N	NR	N / N	N / N	(-)	(-)	(-)
84 A	84 A	N / N	NR	N / N	N / N	(-)	(-)	(-)
85 A	85 A	N / N	M34T / N	N / N	N / N	(-)	(-)	(-)
86 A	86 A	N / N	NR	N / N	N / N	(-)	(-)	(-)
87 A	87 A	N / N	NR	N / N	N / N	(-)	(-)	(-)
88 A	88 A	heterozigoto	35delG / N	N / N	N / N	(-)	(-)	(-)
89 A	89 A	heterozigoto	35delG / N	N / N	N / N	(-)	(-)	(-)
90 A	90 A	N / N	NR	N / N	N / N	(-)	(-)	(-)
91 A	91 A	N / N	NR	N / N	N / N	(-)	(-)	(-)
92 A	92 A	N / N	NR	N / N	N / N	(-)	(-)	(-)
93 A	93 A	N / N	N / N	N / N	N / N	(-)	(-)	(-)
94 A	94 A	N / N	N / N	N / N	N / N	(-)	(-)	(-)
95 A	95 A	N / N	NR	N / N	N / N	(-)	(-)	(-)
96 A	96 A	N / N	NR	N / N	N / N	(-)	(-)	(-)
97 A	97 A	N / N	NR	N / N	N / N	(-)	(-)	(-)
98 A	98 A	N / N	NR	N / N	N / N	(-)	(-)	(-)

* : polimorfismo; **: mutação silenciosa, NR: não realizado; (-): negativo; (+): positivo

Resultados

Tabela 8 – Genótipos das famílias e indivíduos provenientes do HRACF -Bauru (Grupo B).

Famílias	Indivíduos	AS-PCR 35delG	Sequenciamento GJB2 alelo1/alelo2	Deleções no gene GJB6		Gene 12srRNA		Gene tRNA A7445G
				Δ(GJB6- D13S1830)	Δ(GJB6- D13S1854)	A1555G	C1494T	
1 B	1 B	N/N	N/N	N/N	N/N	(-)	(-)	(-)
2 B	2 B	N/N	N/N	N/N	N/N	(-)	(-)	(-)
3 A	3 B	35delG / 35delG	NR	N/N	N/N	(-)	(-)	(-)
	3 B (mãe)	heterozigoto	35delG / N	NR	NR	NR	NR	NR
	3 B (pai)	heterozigoto	35delG / N	NR	NR	NR	NR	NR
4 B	4 B	heterozigoto	35delG / N	N/N	N/N	(-)	(-)	(-)
	4 B (mãe)	N/N	N/N	NR	NR	NR	NR	NR
	4 B (pai)	heterozigoto	35delG / N	NR	NR	NR	NR	NR
5 B	5 B	N/N	V37I / V37I	N/N	N/N	(-)	(-)	(-)
6 B	6 B	N/N	NR	N/N	N/N	(-)	(-)	(-)
7 B	7 B	N/N	NR	N/N	N/N	(-)	(-)	(-)
8 B	8 B	N/N	NR	N/N	N/N	(-)	(-)	(-)
9 B	9 B	N/N	V27* / N	N/N	N/N	(-)	(-)	(-)
10 B	10 B	N/N	NR	N/N	N/N	(-)	(-)	(-)
11 B	11 B	N/N	NR	N/N	N/N	(-)	(-)	(-)
12 B	12 B	35delG / 35delG	NR	N/N	N/N	(-)	(-)	(-)
13 B	13 B	35delG / 35delG	NR	N/N	N/N	(-)	(-)	(-)
14 B	14 B	N/N	N/N	N/N	N/N	(-)	(-)	(-)
15 B	15 B	N/N	NR	N/N	N/N	(-)	(-)	(-)
16 B	16 B	N/N	NR	N/N	N/N	(-)	(-)	(-)
17 B	17 B	heterozigoto	35delG / N	N/N	N/N	(-)	(-)	(-)

*: polimorfismo; NR: não realizado.

Resultados

Os pacientes provenientes do HC-Unicamp e HRACF-Bauru (Grupos A e B respectivamente), foram identificados como implantados e como candidatos ao implante coclear. Alguns pacientes candidatos não puderam ser submetidos ao implante coclear, por diferentes motivos, sendo, portanto excluídos do programa de implante.

Foram estudados, no total, 130 indivíduos, sendo que destes 69 foram submetidos ao implante coclear, 46 permaneceram como candidatos e 15 representam os familiares dos pacientes. Dentre os 69 indivíduos implantados somente em 49 foram realizados todos os exames moleculares.

Na tabela 8 a seguir, os indivíduos submetidos ao implante coclear estão apresentados com os resultados de todos os exames realizados: AS-PCR para a mutação 35delG; seqüenciamento completo do gene GJB2; deleções Δ (GJB6-D13S1830) e Δ (GJB6-D13S1854), mutações mitocondriais A1555G, A7445G e C1494T. Esta tabela apresenta as informações relacionadas aos objetivos do presente trabalho.

Entre os pacientes implantados (N=49), com todas as análises moleculares concluídas, de acordo com a tabela 9, foram encontradas mutações em 21 deles (42,85%), sendo 8 pacientes homozigotos para a mutação 35delG, 7 pacientes heterozigotos para a mutação 35delG, 1 paciente heterozigoto composto (W172X/35delG), 1 paciente homozigoto para a deleção Δ (GJB6-D13S1830), 1 paciente com a mutação mitocondrial A1555G e 28 pacientes normais, resultados apresentados no quadro 1.

Resultados

Tabela 9: Resultados dos exames moleculares realizados nos pacientes (Grupo A e Grupo B, N=49) submetidos ao implante coclear.

N	Famílias	Indivíduos	Genótipo
1	1 A	1	N/N
2	2 A	2	N/N
3	3 A	3	35delG / 35delG
4	4 A	4	del(GJBD13S1830) / del(GJB6-D13S1830)
5	8 A	8	N/N
6	9 A	9	N/N
7	10 A	10	N/N
8	11 A	11	35delG / 35delG
9	15 A	15	35delG / 35delG
10	16 A	16	N/N
11	17 A	17	N/N
12	19 A	19	N/N
13	20 A	20	N/N
14	21 A	21	N/N
15	24 A	24	K168R / N
16	25 A	25	W172X / 35delG
17	26 A	26	N/N
18	27 A	27	N/N
19	28 A	28	35delG / 35delG
20	29 A	29	N/N
21	32 A	32	N/N
22	35 A	35	N/N
23	36 A	36	N/N
24	41 A	41	N/N
25	46 A	46	N/N
26	47 A	47	35delG / 35delG
27	48 A	48	35delG / N
28	50 A	50	35delG / N
29	51 A	51	A1555G
30	55 A	55	N/N
31	58 A	58	35delG / N
32	61 A	61	35delG / N
33	64 A	64	N/N
34	66 A	66	N/N
35	72 A	72	N/N
36	73 A	73	N/N
37	79 A	79	35delG / N
38	85 A	85	M34T / N
39	93 A	93	N/N
40	94 A	94	N/N
41	1 B	1	N/N
42	2 B	2	N/N
43	3 B	3	35delG / 35delG

Resultados

Continuação **Tabela 9**: Resultados dos exames moleculares realizados nos pacientes (Grupo A e Grupo B, N=49) submetidos ao implante coclear.

N	Famílias	Indivíduos	Genótipo
44	4 B	4	35delG / N
45	5 B	5	V37I / V37I
46	12 B	12	35delG / 35delG
47	13 B	13	35delG / 35delG
48	14 B	14	N / N
49	17 B	17	35delG / N

Resultados

Quadro 1: Resultados encontrados nos pacientes submetidos ao implante coclear, com análises completas do gene GJB2, deleções $\Delta(\text{GJB6-D13S1830})$ e $\Delta(\text{GJB6-D13S1854})$ e genes mitocondriais (12S rRNA e tRNASer(UCN)).

	Número de pacientes (N)	Genótipo	Número de alelos alterados	Número de pacientes com alterações moleculares
PACIENTES SUBMETIDOS AO IMPLANTE COCLEAR	49	35delG / 35delG	16	8
		35delG / N	7	7
		$\Delta(\text{GJB6-D13S1830}) / \Delta(\text{GJB6-D13S1830})$	2	1
		K168R / N	1	1
		W172X / 35delG	2	1
		V37I / V37I	2	1
		M34T / N	1	1
		A1555G	2	1
		N / N (28)	-	-
		Total de pacientes com mutações		21 / 49 (42,85%)
Total de pacientes sem mutações		28 / 49 (57,14%)		
Total de pacientes com mutações no gene GJB2		19 / 49 (38,8%)		
Total de alelos com mutações no gene GJB2		29 / 94 (30,85%)		
Total de pacientes com a mutação 35delG		16 / 49 (32,65%)		
Total de pacientes sem a mutação 35delG		33 / 49 (67,34%)		
Total de pacientes com a deleção $\Delta(\text{GJB6-D13S1830})$		1 / 49 (2%)		
Total de pacientes com a mutação mitocondrial A1555G		1 / 49 (2%)		

4.7.2- Em pacientes candidatos ao implante coclear

Dentre os 17 pacientes pertencentes ao Grupo B, proveniente de Bauru, 10 foram implantados e 7 permaneceram como candidatos ao implante coclear. E entre os 98 pacientes do HC-Unicamp, 39 eram candidatos, perfazendo um total de 46 indivíduos. A análise molecular completa do gene GJB2 foi realizada em 12 pacientes, porém todos os indivíduos desse grupo foram analisados quanto à mutação 35delG, deleções $\Delta(\text{GJB6-D13S1830})$ e $\Delta(\text{GJB6-D13S1854})$ e mutações mitocondriais investigadas (Quadro 2).

Resultados

Quadro 2: Resultados encontrados nos pacientes candidatos ao implante coclear com análises completas do gene GJB2, deleções Δ (GJB6-D13S1830) e Δ (GJB6-D13S1854) e mutações mitocondriais nos genes 12S rRNA e tRNASer(UCN).

PACIENTES CANDIDATOS AO IMPLANTE COCLEAR (N=46)	Número de pacientes (N)	Genótipo	Número de alelos alterados	Número de pacientes com alterações moleculares
	12	35delG / N V52 / N V27I* / N (2) N / N (5)	4 1 2 -	4 1 2 -
Total de pacientes com mutações	7 / 12 (58,33%)			
Total de pacientes sem mutações	5 / 12 (41,66%)			
Total de pacientes com mutações no gene GJB2	7 / 12 (58,33%)			
Total de alelos com mutações no gene GJB2	7 / 24 (29,2%)			
Total de pacientes com a mutação 35delG	4 / 12 (33,33%)			
Total de pacientes sem a mutação 35delG	8 / 12 (66,66%)			

*:polimorfismo; **: mutação silenciosa.

As mutações mitocondriais e as deleções envolvendo o gene GJB6 não foram encontradas nesse grupo.

DISCUSSÃO

Este estudo realizado em Campinas, SP, com o objetivo de realizar a análise molecular em pacientes candidatos e submetidos ao implante coclear com perda auditiva neurossensorial não-sindrômica, tem caráter inédito.

Em estudos anteriores na nossa população, foi observada uma frequência de 22% de mutações no gene da conexina 26 em indivíduos com surdez neurossensorial com etiologia não esclarecida (Oliveira *et al.*, 2002). Nesse trabalho, nas amostras dos grupos A e B esta frequência foi maior, sendo 38,8% dos pacientes submetidos ao implante coclear apresentaram mutação no gene GJB2, talvez devido ao fato de praticamente todos os pacientes apresentarem surdez pré-lingual profunda.

No presente estudo, a frequência do alelo 35delG foi observada em 25% dos pacientes submetidos ao implante coclear analisados. A frequência encontrada da mutação 35delG nos pacientes completamente analisados foi de 32,7%. Estes resultados são concordantes com estudos já realizados e descritos na literatura, em várias populações. A relativa contribuição da mutação 35delG para a perda auditiva não-sindrômica, nessas populações, variou de 0% (Oman, Coreia e Japão) a 70% (Itália, Espanha e Grécia), demonstrando a heterogeneidade genética existente entre os diversos países, apesar de alguns desses estudos terem sido baseados em um pequeno número de pacientes, além dos critérios de investigação da perda e os métodos de rastreamento da mutação terem sido diferentes entre os mesmos (Pampanos *et al.*, 2002; Simsek *et al.*, 2001; Liu *et al.*, 2002).

Green e colaboradores (2002) apresentaram um trabalho onde 40% dos indivíduos implantados apresentavam mutações no gene GJB2, sendo que a mutação mais frequentemente observada é a 35delG, concordando com os dados obtidos neste trabalho.

Ainda com relação ao gene da conexina 26, mutações encontradas no gene são responsáveis por cerca de 60% das perdas auditivas não-sindrômicas recessivas. Dentre todas as mutações descritas, a mutação 35delG é a mais comum em cerca de 60-85% dos casos, e tem sido encontrada, praticamente, em todas as populações estudadas.

Discussão

Em nosso trabalho, a frequência de indivíduos com a mutação 35delG, entre os pacientes que possuem mutações no gene GJB2 foi de 84,2% e 63% dos alelos mutados, sendo, portanto concordante com dados da literatura.

No Brasil, foi determinada a prevalência de 0,97% de portadores da mutação 35delG, aproximadamente 1:103 heterozigotos, em um rastreamento realizado em 620 neonatos, na região de Campinas-SP (Sartorato *et al.*, 2000). Em outro estudo realizado, em 36 pacientes com perda auditiva, mutações no gene GJB2 foram encontradas em 22% dos casos sendo que, somente a mutação 35delG foi identificada em 84,2% dos alelos mutantes (Oliveira *et al.*, 2002). A metodologia utilizada neste trabalho foi semelhante às duas referências acima citadas, entretanto foi encontrada uma frequência de 75% dos alelos com a mutação 35delG entre os pacientes implantados. Este fato pode ser explicado pela diferença na amostra ou talvez pela composição étnica da população brasileira que é altamente heterogênea, ocorrendo miscigenação entre vários grupos étnicos, principalmente entre caucasóides e africanos, podendo ocorrer diferenças na prevalência, em diferentes regiões do país (Oliveira *et al.*, 2004). Há a necessidade de um estudo multicêntrico no Brasil para determinar a real prevalência de mutações no gene GJB2, incluindo a mutação 35delG.

Após a realização da PCR alelo-específico para a 35delG nos pacientes submetidos ao implante coclear com análises completas do gene GJB2 desse estudo, foi observado que em 16,5% deles a mutação 35delG foi identificada em somente um alelo, em 16,5% a mutação foi encontrada nos dois alelos e em 67,5% dos pacientes a mutação não foi encontrada.

5.1 - Avaliação geral de alguns pacientes implantados com mutação

No paciente 13B homocigoto para a mutação 35delG, a surdez foi percebida pela mãe no segundo mês de vida ao comparar suas reações com a da irmã gêmea. Havia resíduo de audição bilateralmente; com isso, a adoção de prótese auditiva a partir dos 9 meses, associada ao acompanhamento fonoaudiológico por 10 anos, permitiu o desenvolvimento da fala. Aos 24 anos apresentou piora da audição na orelha esquerda, chegando a anacusia. Simultaneamente, passou a ouvir zumbidos do mesmo lado, com grande prejuízo na sua qualidade de vida. Optou, assim, por realizar implante coclear à esquerda, com excelente resultado.

Com o implante coclear o paciente recuperou a audição e decidiu procurar o serviço de genética para o diagnóstico molecular, uma vez que, ele desconhecia a etiologia de sua perda auditiva, e por desejar conhecer os riscos de ter filhos afetados.

Foi explicado ao paciente 13B e sua esposa, o mecanismo de transmissão autossômica recessiva e suas implicações. Uma vez que sua esposa não apresenta mutações nesse mesmo gene, a expectativa é de que seus filhos serão todos heterocigotos, ou seja, portadores de uma cópia normal, herdada da esposa, e de uma com a mutação 35delG, herdada do paciente.

A mutação 35delG foi a mais prevalente encontrada nesse estudo, portanto existem outros casos a serem considerados, como o do paciente 11A, homocigoto para essa mutação.

O paciente 11A é uma criança de 4 anos de idade que teve a surdez diagnosticada com 1 ano e 4 meses, mas a mãe percebeu aos 6 meses que a criança não reagia aos sons. Apresentou desenvolvimento motor normal, a família nega outras patologias e antecedentes familiares. O paciente foi implantado em março de 2004, com ativação do implante em abril de 2004. No período de um ano e quatro meses de utilização do implante a criança apresenta ótimos resultados quanto à adaptação ao implante coclear e desenvolvimento de fala e linguagem, respondendo a praticamente todos os sons do ambiente (carro, porta, telefone, etc) e a alguns sons da fala (reage ao nome em 50% das vezes). Ele reconhece também mais de 200 palavras, já faz frases com 3 palavras e compreende sentenças em 60% das vezes. A família tem sido bem orientada e se apresenta bastante estruturada para participar do programa de implante coclear, incentivando e participando integralmente dos avanços da criança. O paciente 11A, sem dúvida foi inteiramente beneficiado com o implante e apresenta desenvolvimento com bastante sucesso e progressos.

A família também participou do programa de análise molecular, sendo os pais heterozigotos para a mutação 35delG. Eles foram encaminhados ao aconselhamento genético do programa de implante coclear do HC-Unicamp, para que fossem devidamente esclarecidos sobre a perda auditiva genética, quanto a seus riscos e considerações.

Nos dois casos considerados, o do paciente 13B e do paciente 11A, sendo o primeiro um adulto e o segundo uma criança, pode-se concluir que o implante foi benéfico para ambos. Os dois pacientes apresentam perda auditiva genética com excelentes respostas pós-implante coclear. O adulto com uma reabilitação extremamente rápida e eficiente e a criança com um desenvolvimento de fala e linguagem com bastante progresso além de boa adaptação ao implante, considerando que o paciente já possui o implante a 7 anos. Os dois casos apresentam dados extremamente relevantes, embora preliminares para o paciente 11A, visto que esse paciente ainda não atingiu o platô de adaptação ao implante, o qual é atingido após 4 anos de uso do mesmo (Bevilacqua e Moret, 1997).

Discussão

Dessa forma a relação entre diagnóstico molecular positivo e aquisição de bons resultados pós-implante ainda não pôde ser feita nesse caso. Estudos futuros poderão esclarecer melhor algumas questões levantadas no presente estudo.

Todos os pacientes submetidos ao implante coclear que apresentaram a mutação 35delG em homozigose obtiveram sucesso com o mesmo. Entretanto os ganhos foram individuais, devido aos diversos fatores relacionados à adaptação ao implante, sendo, portanto impossível compará-los.

Quanto aos pacientes heterozigotos para a mutação 35delG que apresentavam perda auditiva profunda, muitos ficaram sem explicações considerando que apenas o gene GJB2 foi totalmente rastreado, do total de mais de 100 genes relacionados à surdez. Em apenas um desses pacientes heterozigotos foi possível diagnosticar a causa da surdez apresentada devido à presença de uma outra alteração encontrada no gene GJB2 por meio do seqüenciamento automático.

Em amostras de indivíduos surdos submetidos a exame molecular foram identificados, nos últimos anos, heterozigotos para a mutação 35delG. De acordo com a literatura, as análises do gene GJB2 em pacientes com perda auditiva freqüentemente, demonstram, heterozigose em aproximadamente 10 a 42% dos casos, a despeito de que a maioria das mutações são recessivas (Wilcox *et al.*, 2000). Este fato foi comprovado em estudo com indivíduos brasileiros com perda auditiva, no qual encontrou-se a prevalência de 12,1% dos heterozigotos para a 35delG, dentre os casos estudados (Piatto *et al.*, 2005).

A primeira, em 50% dos casos estudados em uma amostra da população espanhola, foi a mais freqüente encontrada em indivíduos heterozigotos para o gene da conexina 26, tornando-a a mutação mais freqüentemente associada à surdez pré-lingual naquele país. Enquanto que a segunda foi encontrada em 25% dos casos de pacientes heterozigotos para o gene GJB2.

Discussão

No Brasil, pôde-se também comprovar esta hipótese em estudo com pacientes com perda auditiva, no qual se determinou a prevalência de 3% da mutação Δ (GJB6-D13S1830) em heterozigose com a mutação 35delG, nos casos estudados (Piatto *et al.*, 2005).

Quando nenhuma mutação é encontrada no gene GJB2 ou em pacientes com perda auditiva que são heterozigotos para a 35delG, mutações no gene GJB6, pela sua estreita relação (cerca de 77% de aminoácidos idênticos) e local cromossômico próximo ao do gene GJB2, podem ser consideradas como responsáveis pela perda auditiva nesses pacientes, devendo ser pesquisada, conforme realizado neste estudo (del Castillo *et al.*, 2003).

No Grupo A deste trabalho foi identificada uma paciente (4A), pertencente à família 4, homozigota para a deleção Δ (GJB6-D13S1830). A paciente é filha de pais consangüíneos, possui atualmente quatro anos de idade e foi recentemente submetida ao implante coclear no Hospital Centrinho-Bauru. Até o momento, o acompanhamento fonoaudiológico apresenta resultados positivos quanto à percepção e produção da fala, refletindo um benefício direto do desenvolvimento de fala e linguagem em crianças submetidas ao implante coclear. Este é o primeiro caso que apresenta esta deleção com implante coclear registrado até o momento.

Considerando as mutações mitocondriais rastreadas neste trabalho apenas no paciente 51A foi encontrada a mutação A1555G em homoplasmia, ou seja, a partir da presença de uma mutação no DNA mitocondrial, a célula apresenta o DNA mitocondrial totalmente mutado, o que caracteriza a homoplasmia quando a perda auditiva é detectada. Isto porque são necessários altos níveis de DNA mitocondrial mutado para que a célula apresente uma deficiência na função (Xin Guan, 2004).

Esta mutação associada à perda auditiva é considerada a mutação mais comum em genes mitocondriais, principalmente em indivíduos com história de uso de antibióticos aminoglicosídeos (Fischel-Ghodsian *et al.*, 1997).

O paciente 51A apresenta perda auditiva bilateral profunda, progressiva nos últimos 10 anos. Não possui histórico de uso de antibióticos aminoglicosídeos, apenas relata exposição por longos períodos a ruídos altos. É variável a relação entre a mutação A1555G e a susceptibilidade a antibióticos aminoglicosídeos.

Nos Estados Unidos, nos casos de surdez induzida por aminoglicosídeos, observou-se uma frequência de 15% da mutação A1555G (Fischel-Ghodsian *et al.*, 1997). No Japão o número encontrado foi de 30% (Hu *et al.*, 1991).

O paciente apresenta dificuldade de adaptação ao implante coclear quanto à compreensão da fala. Desde a data da ativação do implante tem sido feito um trabalho de estimulação auditiva quanto à percepção de fala, discriminação e compreensão dos sons e principalmente conversação com frases simples, sem competição sonora. Apesar de toda dificuldade apresentada pelo paciente houve melhoras nas respostas auditivas.

Como se trata de um paciente adulto com perda auditiva, pós-lingual e em idade avançada, esperava-se que o acompanhamento pós-implante fosse voltado apenas para reabilitação, mas um trabalho minucioso e demorado vem sendo desenvolvido devido às dificuldades de progresso do paciente, comprovando a existência de vários fatores relacionados às respostas positivas no pós-implante, tanto em adultos como em crianças.

O paciente 77A apresenta algumas características semelhantes ao quadro clínico geral do paciente 51A como idade avançada, exposição por longos períodos a ruídos altos, dificuldade de adaptação ao implante coclear e também de percepção de fala, exceto a presença da mutação A1555G, e de qualquer outra alteração pesquisada. Portanto a presença de mutação mitocondrial não determina as características gerais pós-implante, apresentadas pelos pacientes. É necessário que todos os aspectos físicos e psicológicos sejam avaliados minuciosamente e individualmente.

O seqüenciamento automático neste trabalho permitiu a identificação de um polimorfismo, duas mutações *missense*, já descrita na literatura, uma mutação silenciosa e uma mutação nova, *nonsense*.

Nos pacientes 18A e 9B foi possível identificar a alteração de G>A no códon 27 do gene GJB2 em heterozigose (V27I/N) através do seqüenciamento automático. Essa alteração foi previamente descrita por Kelley *et al.* (1998). Esta mutação é considerada um polimorfismo e está situada no primeiro domínio transmembrânico da proteína. Estudos populacionais indicam que não há correlação entre a alteração V27I e a perda auditiva, uma vez que esta é observada na população normal. Em japoneses observa-se uma frequência extremamente alta desse polimorfismo em indivíduos que não apresentam perda auditiva (Abe *et al.*, 2000).

A mutação *missense* M34T foi encontrada no paciente 85A em heterozigose (M34T/N). Esta mutação apresenta, na literatura, algumas considerações importantes além de uma extrema dificuldade de definição. Devido a diferentes manifestações clínicas encontradas em seus portadores, há uma grande dificuldade em relacionar o genótipo com o fenótipo. Com isso torna-se extremamente difícil determinar o efeito da expressão dessa mutação no gene GJB2. Sendo assim, não há, ainda, um consenso na literatura para a definição da mutação M34T (Griffith *et al.*, 2000; Houseman *et al.*, 2001).

Em um trabalho recentemente realizado, a mesma foi detectada em associação com outras duas mutações, 35delG e V95M. A mutação V95M foi previamente descrita como uma mutação real em pacientes com perda auditiva não-sindrômica recessiva. Entretanto a mutação M34T tem sido discutida desde a sua primeira descrição. A associação da M34T *in trans* com V95M foi apresentada antes como uma mutação recessiva (Kelley *et al.*, 1998; Kelsell *et al.*, 1997). Nos casos anteriormente citados, os genótipos não puderam ser relacionados aos fenótipos já que os pacientes apresentavam diferentes graus de perda auditiva. Em um paciente heterozigoto para a mutação M34T foi observada audição normal e em um paciente heterozigoto composto para as mutações M34T e 35delG, foi encontrada uma perda auditiva moderada. Portanto esses dados impossibilitam a definição correta e definitiva da M34T e tão pouco a expressão fenotípica da mesma.

Do mesmo modo que não é possível excluir a possibilidade de ser um polimorfismo, considerando os diferentes fenótipos encontrados nesses casos (Houseman *et al.*, 2001).

No paciente 85A, a surdez foi percebida há 5 anos na orelha direita, uma surdez súbita, já na orelha esquerda a perda ocorreu há 3 anos. O paciente apresenta perda auditiva neurossensorial não-sindrômica bilateral profunda. No histórico, o paciente apresenta a utilização de antibióticos em grande quantidade, já que apresentou otite. Sendo assim com o implante coclear o paciente apresentou uma boa resposta na avaliação audiométrica pós-implante, demonstrando que recuperou a capacidade de ouvir.

Outra mutação *missense*, a V37I foi encontrada no paciente 5B, em homozigose (V37I/V37I). Embora essa mutação tenha sido originalmente considerada como um polimorfismo sem efeito patogênico, uma vez que havia sido encontrado em heterozigose em um indivíduo controle não portador de perda auditiva, a conservação de valina nesta posição entre diferentes conexinas e a identificação de um indivíduo surdo homozigoto para a mutação V37I sugere que esta substituição seja crítica (Rabionet *et al.*, 2000). Outro trabalho descrito na literatura também encontrou um paciente homozigoto para a mutação V37I além de um heterozigoto composto, 35delG/V37I; ambos com perda auditiva (Wilcox *et al.*, 2000).

Outro caso descrito, envolvendo a mutação V37I apresenta dois irmãos com perda auditiva neurossensorial progressiva, ambos heterozigoto composto para as mutações V37I/V95M no gene GJB2. Considerando que nesse estudo também foram analisados indivíduos com perda auditiva neurossensorial progressiva que não apresentavam mutações no gene GJB2, não é possível descartar a possibilidade da mutação V37I ser um polimorfismo com efeito negativo resultando em uma atividade gênica menos grave (Oliveira *et al.*, 1999). Em um estudo mais recente foram analisados pacientes com perda auditiva neurossensorial severa pré-lingual, no qual foi encontrada a prevalência de 3% de pacientes heterozigoto composto 35delG/V37I (Piatto *et al.*, 2005).

Sendo assim é importante considerar os estudos que suportam a hipótese de que outros fatores modifiquem os efeitos fenotípicos de mutações no gene GJB2. A estrutura e a função do gene GJB2 têm sido extensamente estudadas, assim como a possibilidade de haver interações do gene GJB2 com outros genes ou até mesmo com outro *locus* (Bruzzone *et al.*, 1996).

Neste estudo também foram identificadas as mutações K168R e W172X no gene GJB2, a primeira ainda não descrita na literatura. A primeira foi encontrada no paciente 24A em heterozigose (K168R/N) e como se trata de uma mutação nova, não existem estudos de expressão que comprovem a sua patogenicidade. Entretanto ela não foi encontrada em uma amostra controle de 50 indivíduos normais, diminuindo a possibilidade de tratar-se de um polimorfismo. Estudos futuros poderão esclarecer melhor a relação desta mutação com perda auditiva neurossensorial.

E nesse trabalho foi detectada no paciente 25A em heterozigose (W172X/N) sendo que a mutação 35delG foi detectada no outro alelo do gene, portanto o paciente é um heterozigoto composto (W172X/35delG).

Essa paciente apresentou surdez desde o nascimento e foi diagnosticada quando tinha 1 ano e 8 meses, por não reagir a nenhum som. A paciente pertence a uma família com poder aquisitivo baixo e foi implantada aos 3 anos de idade. A paciente foi implantada em uma idade acima da considerada ideal, que é entre o primeiro e o segundo ano de idade para que o desenvolvimento de fala e linguagem da criança não sejam prejudicados. Durante os primeiros anos de vida ocorre a maturação do sistema auditivo central, que vai até os 13 anos de idade, desta forma, os primeiros anos de vida são críticos para o desenvolvimento das habilidades auditivas e de linguagem.

É interessante ressaltar que os efeitos da perda auditiva vão além da audição propriamente dita e podem levar a graves conseqüências no desenvolvimento global da criança.

Alguns autores relataram que a impossibilidade de ouvir os sons da fala não proporciona à criança o *feedback* necessário para o desenvolvimento da fala e linguagem.

E ao serem fornecidos estímulos auditivos a uma criança com perda auditiva em idade precoce, é possível ser minimizado os efeitos secundários apresentados acima (Northern & Downs, 1991).

É importante considerar a integridade anatomofisiológica do sistema auditivo, tanto em sua porção periférica quanto central, também como um pré-requisito para a aquisição e desenvolvimento da linguagem oral como apresenta Azevedo (1997). Mesmo assim, outros fatores interferem no processo de adaptação e progresso de desenvolvimento de fala e linguagem pós-implante coclear. Um deles, e de extrema importância, é a estrutura familiar, sendo que nesta idade a criança está totalmente inserida no ambiente doméstico, com isso o maior e melhor estímulo ocorre dentro de casa.

No caso da paciente 25A, a família não apresenta uma estrutura adequada para incentivá-la na adaptação ao implante coclear e no processo de desenvolvimento da fala e linguagem, portanto não apresentou os ganhos esperados em mais de um ano de implante.

Nesse período pós-implante coclear, a paciente tem como dados de seu último relatório, a não discriminação da linguagem com clareza, o não reconhecimento de vocábulos e a pouca vocalização.

Analisando o meio familiar em que essa paciente está inserida, o tempo de surdez, a idade em que fez o implante coclear, é possível ser constatada a importância do estímulo familiar, visto que os resultados observados pós-implante coclear, nesse caso, foram tão abaixo do esperado. Desta forma, não podemos considerar esse caso como contrário às hipóteses de que indivíduos com mutações no gene GJB2 têm um bom prognóstico ao implante. Realmente atribuímos o insucesso ao ambiente familiar e estímulos desfavoráveis ao bom desenvolvimento de fala e linguagem.

Ressaltando, a aquisição e o desenvolvimento da linguagem oral em crianças depende da integridade de vários fatores: sistema auditivo, sistema neurológico, nível intelectual, aspectos psíquicos, desenvolvimento emocional, estimulação de linguagem, família adequada e outros. Considerando o ritmo de aprendizagem, esse é mais rápido que o normal quando são observadas crianças com perda auditiva pré-lingual e que foram implantadas precocemente (Bevilacqua e Formigoni, 1997).

Outros benefícios podem ser observados tais como: a aceleração do ritmo de aprendizagem da linguagem e a possibilidade de eventualmente alcançar níveis aproximadamente normais de competência lingüística. Qualquer alteração em um ou mais fatores pode causar atraso na aquisição da fala e da linguagem ou impossibilitar o seu desenvolvimento, como apresentado no caso do paciente 25A (Bollard & Green, 1999).

Os avanços tecnológicos associados à avaliação clínica do comportamento auditivo proporcionaram a possibilidade de se realizar diagnósticos confiáveis durante o primeiro ano de vida, o que tem viabilizado o fornecimento do estímulo auditivo desde cedo na vida da criança, através da adaptação de aparelhos de amplificação sonora individual (AASI) ou mesmo o implante coclear, dependendo do grau da perda auditiva. O implante coclear é indicado no caso de crianças com perda auditiva bilateral profunda, onde não há ganho efetivo com o uso de AASI, e sem contra-indicações clínicas.

A partir dos dados anteriormente apresentados e da aplicação de testes de percepção de fala e de desenvolvimento da linguagem, as crianças são avaliadas, no pré e no pós-implante coclear, no Hospital das Clínicas da Unicamp.

Em adultos com perda auditiva pós-linguais, a reabilitação e a percepção de fala são observados mais facilmente, visto que, a perda ocorre após a linguagem oral estabelecida.

Os acompanhamentos após a implantação do componente interno e a ativação do implante com médicos, fonoaudiólogos e psicólogos são necessários, assim como ocorre com as crianças. Fatores prognósticos também devem ser considerados no caso de adultos, como início da perda auditiva, tempo de surdez, etiologia da perda auditiva, aspectos psicológicos, ambiente sócio familiar.

Não raro, adultos pós-linguais com pouco tempo de duração da privação sensorial não necessitam de fonoterapias devido à memória auditiva e ao rápido reconhecimento da fala através do implante coclear.

A principal diferença na reabilitação entre crianças e adultos é que as crianças irão adquirir todo o sistema fonético fonoaudiológico, que envolve a fala e a linguagem, bem como a conceitualização que estabelece a comunicação oral efetiva.

O adulto já tem esse sistema adquirido e ao obter o implante o objetivo é a associação do som recebido ao som fornecido pelo implante coclear. Nos casos ideais quando os fatores são favoráveis e o resultado do implante são bons, essa associação é rápida. No início é comum, que se refiram a voz que recebem, após o implante coclear, como sendo uma voz metalizada, porém após algumas semanas de adaptação ao implante, a voz que reconhecem é bastante similar a anterior à surdez (Bollard & Green, 1999).

Entretanto, correlacionar significativamente os dados obtidos no pré e pós-implante com a etiologia genética tanto nos adultos como nas crianças não foi possível devido à heterogeneidade dos grupos avaliados. Embora outros estudos tenham correlacionado os dados como Green *et al.* (2002) que obtiveram melhores respostas em pacientes submetidos ao implante que tiveram etiologia genética confirmada, ainda é muito difícil a confirmação estatística de tais dados, uma vez que, são inúmeros os fatores que podem interferir nos resultados. Apesar de apresentarmos uma comparação bastante superficial no presente estudo, especulamos que os resultados do implante coclear nos pacientes positivos para mutações no gene GJB2 são, de fato, bastante animadores. Em um contexto geral, a principal vantagem do implante coclear está em que os pacientes a ele submetidos deixam de apresentar privação sensorial. Entretanto é possível ressaltar o benefício do implante coclear, independente da etiologia apresentada, aos pacientes submetidos ao mesmo, sendo que a obtenção, pelas crianças, e a reabilitação, pelos adultos; da audição normal é claramente obtido.

Estudos futuros poderão esclarecer melhor algumas questões levantadas no presente trabalho, os quais poderiam incluir a correlação entre os resultados apresentados pelos indivíduos submetidos ao pós-implante coclear e a etiologia genética da surdez, no que diz respeito à percepção de fala. Para tal estudo seria necessário o acompanhamento dos pacientes por um período maior de tempo do que o envolvido na presente dissertação.

CONCLUSÕES

Conclusões

No presente estudo foram estudados 115 pacientes. Entre esses indivíduos selecionados, somente 49 pacientes submetidos ao implante coclear foram avaliados completamente no ponto de vista molecular. Dentre os pacientes submetidos ao implante coclear 42,85% apresentaram mutações nos genes analisados.

Entre os pacientes submetidos ao implante coclear foram encontradas mutações no gene GJB2 em 38,8% dos casos. A frequência observada é concordante com a observada na literatura entre indivíduos com surdez neurossensorial não-sindrômica de etiologia não esclarecida.

A frequência de indivíduos com a mutação 35delG, entre os pacientes que possuem mutações no gene GJB2 foi de 84,2%, dentro do esperado de acordo com a literatura científica que estima entre 60 a 85% dos casos.

Não foi possível correlacionar significativamente os resultados pós-implante coclear com a etiologia genética da surdez devido à heterogeneidade dos grupos avaliados.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Referências Bibliográficas

ABE, S.; USAMI, S.; SHIKAWA, H.; KELLEY, P.M.; KIMBERLING, W.J. Prevalent connexin 26 gene (GJB2) mutations in Japanese. *J Med Genet*, 37:41-3, 2000.

ALBERTS, B.; BRAY, D.; JOHNSON, A. *et al.* Essencial Cell Biology: an introduction to the molecular biology of the cell. New York:Garland Publish p.370-406, 1998.

ALEXANDRINO, F. Estudo molecular de mutações no gene GJB3 como causa de deficiência auditiva neurossensorial não-sindrômica. (Tese de mestrado- CBMEG-UNICAMP), 2003.

American College of Medical Genetics. Genetics Evaluation Guidelines for the Etiologic Diagnosis of Congenital hearing loss. *Genet Med*, 4:162-71, 2002.

ATTARDI, G.; SCHATZ, G. Biogenesis of mitochondria. *Annu Rev Cell Biol*, 4:289-333, 1998.

AVRAHAN, K.B. Motors, channels and sound of silence. *Nat Med*, 3(6):608-9, 1997.

AZEVEDO, M.F. Avaliação Audiológica no primeiro ano de vida. In: LOPES FILHO, O.,ed - Tratado de fonoaudiologia. São Paulo, Rocca, p.239-67, 1997.

BENTO, R.F.; BRITO, R.N.; CASTILHO, A.M.; GÓMEZ, V.G.; GIORGI, S.B.; GUEDE, M.C. Resultados auditivos com implante coclear multicanal em pacientes submetidos a cirurgia no Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.70, 2004.

Referências Bibliográficas

BEVLACQUA, M.C. Implante coclear multicanal: uma alternativa na habilitação de crianças surdas. Bauru.112p (Tese-Livre docência-faculdade de Odontologia de Bauru da Universidade de São Paulo), 1998.

BEVLACQUA, M.C.; FORMIGONI, G.M.P. Audiologia educacional: Uma opção terapêutica para as crianças deficiente auditiva. Carapicuíba, pró-Fono. 86p, 1997

BEVLACQUA, M.C.; MORET, A.L.M. Reabilitação e implante coclear. In LOPES FILHO, O. ed- Tratado de fonoaudiologia, São Paulo,Rocca. p. 401-14, 1997.

BLACK, F.O.; PESZNECKER, S.C. Vestibular ototoxicity: Clinical considerations. *Otolaryngol Clin North Am*, 26:713-36, 1993.

BOLLARD, P.M.; GREEN, J. Language development in children with the Clarion cochlear implant. *Ann Otol Rhinol Laryngol*, 108:113-18, 1999.

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

BRUZZONE, R.; MULLER-MYHSOK, B.; HORSTMANN, R.D. Connexin 26 R143W mutation associated with recessive non-syndromic sensorineural deafness in Africa. *N. Engl J Med*, 338(8):548-50, 1998.

CARRASQUILLO, M.M.; ZLOTOGORA, J.; BARGES, S.; CHAKRAVARTI, A. A two different connexin 26 mutations in an inbred kindred segregating non-syndromic recessive deafness: implications for genetic studies in isolated populations. *Hum Molec Genet*, 6:2173-7, 1997.

Referências Bibliográficas

COHN, E.S.; KELLEY, P.M.; FOWLER, T.W.; GORGA, M.P.; LEFRKOWITZ, D.M.; KUEHN, H.J.; SCHAEFER, G.B.; GOBAR, L.S.; HAHN, F.J.; HARRIS, D.J.; KIMBERLING, W.J. Clinical studies of families with hearing loss attributable to mutations in the connexin 26 gene (GJB2/DFNB1). *Pediatrics*, 103(3):546-50, 1999.

COSTA FILHO, O. A. Implantes cocleares multicanais no tratamento surdez em adultos. Bauru 81p. (Tese-Livre docência - Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo), 1998.

DENOYELLE, F.; MARLIN, S.; WEIL, D.; MOSTTI, L.; CHAUVIN, P.; ÉREA-NOEL, G.; PETIT, C. Clinical features of the prevalent form of childhood deafness, DFNB1, due to a connexin 26 gene defect: implications for genetic counseling. *Lancet*, 353(17):319-20, 1999.

DENOYELLE, F.; WEIL, D.; WILCOX A.S.; LENCH, N.J.; ALLEN-POWELL, D.R. OSBORN, A.H. Prelingual deafness: high prevalence of a 30delG mutation in the connexin 26 gene. *Hum Molec Genet*, 6:2173-7, 1997.

DENOYELLE, F.; LINA-GRANADE, G.; PLAUCHU, H.; BRUZZONE, R.; CHAIB, H.; LEVI-ACOBAS, F.; WEIL, D.; PETIT, C. Connexin 26 linked to a dominant deafness. *Nature*, 393:319-320, 1998.

DEL CASTILLO, I.; MORENO-PELAYO, M. A.; DELCASTILLO, F. J.; BROWNSTEIN, Z.; MARLIN, S.; ADINA, Q.; *et al.* Prevalence and Evolutionary origins of the del(GJB6-D13S1830) mutation in the DFNB1 locus in hearing impairment subjects: a multicenter study. *Am J Hum Genet*, 73(6):1452-8, 2003.

Referências Bibliográficas

DEL CASTILLO, F.J.; DELCASTILLO, F.J.; HUTCHIN, T.; LEONARDI, E.; OLIVEIRA, C.A.; AZAHIN, H.; SIEMERING, K.R.; WEIL, D.; WUYTS, W.; AGUIRRE, L.A.; MARTIN, Y.; MORENO-PELAYO, M.A.; VILLAMAR, M.; AVRAHAM, K.B.; DAHL, H.H.; KANANN, M.; NANCE, W.E.; PETIT, C.; SMITH, R.J.; VAN CAMP, G.; SARORATO, E.L.; MURGIA, A.; MORENO, F.; DELCASTILLO, I. A novel deletion involving the connexin 30 gene del(GJB6-D13S1854), found in trans with mutations in the GJB2 gene (connexin 26) in subjects with DFNB1 nonsyndromic hearing impairment. *J Med Genet*, 42:588-94, 2005.

FISCHEL-GHODSIAN, N.; PREZANT, T.R.; FOURNIER, P.; STEWART, J.A.; MAW, M. Mitochondrial tRNA mutation associated with non-syndromic deafness. *Am J Otolaryngol*, 16:403-8, 1995.

FISCHEL-GHODSIAN, N.; PREZANT, T.R.; CHALTRAW, W.E.; WENDT, K.A.; NELSON, R.A.; ARNOS, K.S.E FALK, R.E. Mitochondrial gene mutation is a significant predisposing factor in aminoglycoside ototoxicity. *Am J Otorryn*, 18:173-8, 1997.

FISCHEL-GHODSIAN, N. Mitochondrial mutations and hearing loss: paradigm for mitochondrial genetics. *Am J Genet*, 62:15-19, 1998.

FISCHEL-GHODSIAN, N. Genetic factors in aminoglycoside toxicity. *Ann New York Acad Sci*, 884:99-109, 1999.

FISCHEL-GHODSIAN, N. Mitochondrial mutations and hearing loss. *Cell and Molecular Biology of the Ear*, pp136. Lim Kluwer Academic/Plenum Publisher, New York, 2000.

Referências Bibliográficas

FORGE, A.; BECKER, D.; CASALOTTI, S.; EDWARDS, J.; EVANS, W.H.; LENCH, N.; SOUTER, M. Gap junctions and connexin expression in the inner ear. *Novartis Found Symp*, 219:134-50, 1992.

GASPARINI, P.; RABIONET, R.; BARBUJANI, G.; MELCHIONDA, S.; PETERSEN, M.; BRONDUM-NIELSSEN, K.; METSPALU, A.; OITMMA, E.; PISANO, M.; FOSTINA, P.; ZELANTE, L.; ESTIVILL, X. High carrier frequency of the 35delG deafness mutation in European populations. *Eur J Hum Genet*, 8: 19-23, 2000.

GUAN, M.; ENRIQUEZ, J.A.; FISCHER-GHODSIAN, N.; ATTARDI. Pathogenetic of the mitochondrial tRNASer(UCN) precursor 7445 mutation and coexisting complex I subunit mtDNA mutations associated with non-syndromic deafness. *Am J Hum Genetics*, 61:A1807, 1997.

GUILFORD, P.; AYADI, H.; BLANCHARD, S.; CHAIB, H.; LE PASLIER, D.; WEISSENBACH, J.; DRIDA, M.; PETIT, C. A human gene responsible for neurosensory, non-syndromic recessive deafness is a candidate homologue of the mouse *sh-1* gene. *Hum Mol Genet*, 3(6):989-93, 1994.

GREEN, G.E.; SCOTT, D.A.; MCDONALD, J.M.; TEAGLE, H.F.B.; TOMBLIN, B.J.; SPENCER, L.J.; WOODWORTH, G.G.; KNUTSON, J.F.; GANTZ, B.J.; SMITH, R.J.H. Performance of cochlear implant recipients with GJB2-related deafness. *Am J Med Genet*, 109:167-70, 2002.

Referências Bibliográficas

GRIFFITH, A.J.; CHOWDHRY, A.A.; KURIMA, K.; HOOD, L.J.; KEATS, B.; BERLIN, C.I.; MORELL, R.J.; FRIEDMAN, T.B. Autosomal recessive nonsyndromic neurosensory deafness at DFNB1 not associated with the compound-heterozygous GJB2 (connexin 26) genotype M34T/167delT. *Am J Hum Genet*, 67:745-49, 2000.

HASSANZADEH, S.M.S.; FARHADI, M.; DANESHI, A.; EMAMDJOMEH, H. The effects of age speech perception development in cochlear-implanted prelingually deaf children. *Otolaryngol Head and Neck Surgery*, 126(5): 524-27, 2002.

Home page <http://webhost.era.ac.be/hhh>, acessado em Setembro de 2005.

Home page <http://personalespages.umist.ac.uk>, acessado em Agosto de 2005.

Home page <http://oregangostat.edu>, acessado em Setembro de 2005.

HOUSEMAN, M.J.; ELLIS, L.A.; PAGNAMENTA, A.; DI, W.L.; RICHARD, S.; OSBORN, A.H.; DAHL, H.H.; REARDON, W.; MUELLER, R.F.; KELSELL, D.P.-genetic analysis of the connexin-26 M34T variant: identification of genotype M34T/M34T segregating with mild-moderate non-syndromic sensorineural hearing loss. *J Med Genet*, 38(1):20-5, 2001.

HOWELL, N.; KUBACKA, I.; MACKAY, D.A. How rapidly does the human mitochondrial genome evolve?. *Am J Hum Genet*, 59:501-9, 1996.

HU, D.N.; QUI, W.Q.; WU, B. T.; FANG, L. Z.; GU, Y.P.; ZHANG, G.H.; YAN, J.H.; *et al.* Genetic aspects of antibiotic induced deafness: mitochondrial inheritance. *J Med Genet*, 28:79-83, 1991.

Referências Bibliográficas

ILG, A.; VON DER HAAR-HEISE, S.; GOLDRING, J.E.; LESINSKI-SCHIEDAT, A.; BATTMER, R.D.; LENARZ, T. Speech perception results for children implanted with the Clarion cochlear implant at the Medical University of Hannover. *Ann Otol Rhinol Laryngol*, 177: 93-98, 1999.

IZUMIKAWA, M.; MINODA, R.; KAWAMOTO, K.; ABRASHKIN, K. A.; SWIDERSKI, D. L.; DOLAN, D. F.; BROUGH, D.; RAPHAEL, Y. Auditory hair cell replacement and hearing improvement by *Atoh1* gene therapy in deaf mammals. *Nature*, 13:1-6, 2005.

KALATZIS, V. & PETIT, C. The fundamental and medical impacts of recent progress in research on hereditary hearing loss. *Hum Mol Genet Rev*, 7(10): 1589-97, 1998.

KELLEY, P.M.; HARRIS, D.J.; COMER, B.C.; ASKEW, J.W.; FOWLWE, T.; SMITH, S.D.; KIMBERLING, W.J. Novel mutations in the connexin 26 gene (GJB2) that cause autosomal recessive (DFNB1) hearing loss. *Am J Hum Genet*, 62: 792-9, 1998.

KELSELL, D. P.; DUNLOP, J.; STEVENS, H.P.; LENCH, N.J.; LIANG, J.N.; PARRY,G.; MUELLER, R.F.; LEIGH, I. Connexin 26 mutations in hereditary non-syndromic sensorineural deafness. *Nature*, 387: 80-3, 1997.

KIKUCHI, T.; ADAMS, J.C.; MIYABE, Y.; SO, E.; KOBAYASHI, T. Potassium ion recycling pathway via gap junction systems in the mammalian cochlea and its interruption in hereditary nonsyndromic deafness. *Med Electron Microsc*, 33:51-6, 2000.

KUMAR, N.M. Molecular biology of the interactions between connexins. *Novartis Found Symp*, 219:6-16, 1999.

Referências Bibliográficas

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

LIU, X.Z.; XIA, X.J.; XU, L.R.; PANDAYA, A.; LIANG, C.Y.; BLANTON, S.H.; BROWN, S. D. M.; STEEL, K. P.; NANCE, W.E. Mutations in connexin 31 underlie recessive as well as dominant non-syndromic hearing loss. *Hum Mol Genet*, 9(1):63-67, 2000.

LIU, Y.; KE, X.; QI, Y.; LI, ZHU, P. Connexin 26 gene (GJB2): prevalence of mutations in the Chinese population. *J Hum Genet*, 47(12):688-690, 2002.

LORTHOLARY, O.; TOD, M.; COHEN, Y. & PETIT, C. Aminoglycoside. *Med Clin North Am*, 79:761-98, 1995.

LUCOTTE, G.; MERCIER, G. Meta-analysis of GJB2 mutation 35delG frequencies in Europe. *Genet Test*, 5(2):149-52, 2001.

MAILET, M. *Biologia Celular*. São Paulo: Santos.p11-80, 2003.

MIYAMOTO, R.T.; KIRK, K.I.; SVIRSKY, M.A.; SEHGAL, S.T. Communication skills in pediatric cochlear implant recipients. *Acta Otolaryngol (Stockh)*, 119:219-24, 1999.

MOLINA, M.; HUARTE, A.; CERVERA-PAZ, F.J.; MANRIQUE, M.; GARCIA-TAPIA, R. Development of speech in 2-year-old children with cochlear–implanted prelingually deaf children. *Otolaryngol Head and Neck Surgery*, 126(5):524-27, 1999.

Referências Bibliográficas

MORELL , R.J.; KIM, H.J.; HOOD, L.J.; GOFORTH, L.; FRIDERICI, K.; FISHER, R. *et al.* Mutations in the connexin 26 gene (GJB2) among Askenazi Jews with nonsyndromic recessive deafness. *N Engl J Med*, 339(21):1500-1505, 1998.

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

MUSTAPHA, T.; ARNOS, K.S.; PANDAYA, A. Advances in hereditary deafness. *Lancet*, 358:1082-90, 2001.

NEWKIRK, J.E.; TAYLOR, R.W.; HOWELL, N.; BINDOFF, L.A.; CHINNERY, P.F.; ALBERTI, K.G.; TURNBULL, D.M.; WALKER, M. Maternally inherited diabetes and deafness: prevalence in a hospital diabetic population. *Diabet Med*, 14(6):457-60, 1997.

NIKOLOPOULOS, T. P.; ARCHBOLD, S.M.; O'DONOGHUE, G.M. The development of auditory preception in children following cochlear implantation. *Int J Ped Otorhinol*, 49: S189-S191, 1999.

NORTHEN, J.L. & DOWNS, M.P. Hearing in children. 4 ed. Baltimore, willians and Wilkins. 421p., 1991.

Online Medendelian Inheritance In Man, OMIM- National Library of Medicine, Bethesda, MD.2003; <http://www.ncbi.nlm.gov/omim>.

OLIVEIRA, C.A.; ALEXANDRINO, F.; ABE-SANDES, K.; SILVA, W.A.; MACIEL-GUERRA, A.T.; MAGNA, L.A.; SARTORATO, E.L. Frequency of the 35delG mutation in the GJB2 gene in samples of european, Asian, and African Brazilians. *Hum Biol*, 76: 313-6, 2004.

Referências Bibliográficas

OLIVEIRA, J.J.A. Fisiologia Clínica da Audição-Cóclea Ativa. In: LOPES FILHO, O. & CAMPOS, C.A.H. Tratado de ORL. São Paulo: Rocca. p. 510-30,1994.

OLIVEIRA, C.A.; MACIEL-GUERRA, A.T.; SARTORATO, E.L. Deafness resulting from mutations in the GJB2 (connexin 26) gene in Brazilian patients. *Clin Genet*, 61: 354-8, 2002.

OLIVEIRA, C. A.; CASTRO, S. C. P.; GUERRA, A. T. M.; SARTORATO, E. Report of two siblings with progressive sensorineural hearing loss bearing V37I/V95M mutations in the connexin 26 gene (GJB2). *The Braz J Dysmorph Speech-Hearing Disorders*, 3:15-18, 1999.

PAMPANOS, A.; ECONOMIDES, J.; ILIADOU, V.; NEOU, P.; LEOTSAKOS, P.; VOYIATZIS, N.; ELEFThERIADES, N.; TSAKANIKOS, M.; ANTONIADI, T.; KONSTANTOPOULOU, I.; YANNOUKAKOS, D.; GRONSLOV, K.; BRONDUM-NIELSEN, K.; GRIGORIADOU, M.; GYFTODIMOU, J.; ILIADES, T.; SKEVAS, A.; PETERSEN, M.B. Prevalence of GJB2 mutations in prelingual deafness in the Greek population. *Int J Pediatr Otorh*, 65(2):101-8, 2002.

PERKINS, G.; GOODENOUGH, D.A.; SOSINSKY, G.E. Three-dimensional structure of the gap junction connexon. *Biophys J*, 30:577-90, 1997.

LALWANI, A.K. Progress congenital hearing loss. *Am J Otol*, 20(1):2-3, 1999.

PETIT, C. Genes responsible for human hereditary deafness: sympgony of a thousand. *Nature Genet*, 14:385-91, 1996.

Referências Bibliográficas

PETTY, R.K.H.; HARDING, A.E.; MORGAN-HUGHES, J.A. The clinical features of mitochondrial miopathy. *Brain*, 109:915-38, 1986.

POIRIER, J.; DUMAS, J.L.R.; CATALA, M.; ANDRÉ, J-M.; GHERARDI, R.K.; BERNAUDIN, J-F. *Histologia Molecular- texto e Atlas*. São Paulo: Santos, p257-74, 2003.

PREZANT, T.R.; AGAPIAN, J.V.; BOHLAMN, M.C.; BU, X.; OZATAS, S.; QUI, W-Q.; ARNOS, K.S.; COSTOPASSI, G.A.; JABER, L.; ROTTER, J.L.; SHOHAT, M.; FISCHER-GHODSIAN, N. Mitochondrial ribosomal RNA mutation associated with both antibiotic-induced and non-syndromic deafness. *Nat Genet*, 4:289-94, 1993.

RABIONET, R.; ZELANTE, L.; LOPEZ-BIGAS, N.; D'AGRUMA, L.; MELCHIONDA, S.; RESTAGNO, G.; ARBONES, M.L.; GASPARINI, P.; ESTIVILL, X. Molecular basis of childhood deafness resulting from mutations in the GJB2 (connexin 26) gene. *Hum Genet*, 106(1): 40-4, 2000.

REID, F.M.; VERNHAM, G.A.; JACOBS, H.T. A novel mitochondrial point mutation in a maternal pedigree with sensorineural deafness. *Hum Mut*, 3:243-47, 1994.

ROBBINS, A.M. Language development. In: Waltzman & Cohen eds *Cochlear implants*. New York, **Thieme Med Publishers**, 2000.p.269-83.

RUSSO, I.C. Overview of audiology in Brazil: state of the art. *Audiology*, 39(4):202-6, 2000.

Referências Bibliográficas

SARTORATO, E.L.; GOTTARDI, E.; OLIVEIRA, C.A.; MAGNA, L.A.; ANNICHINO-BIZZACCHI, J.M.; SEIXAS, C.A.; MACIEL-GUERRA, A.T. Determination on the frequency of 35delG allele in Brazilian noenatos. *Clin Genet*, 58(1):339-40, 2000.

SCHACHT J. Biochemical basis of aminoglycoside ototoxicity. *Otolaryngol Clin North Am*, 26: 845-856, 1993.

SERVIOR, K.B.; HATOMOCHI, A.; STEWART, I.A. Mitochondrial A7445G mutation in two pedigree with sensorineural deafness. *Am J Genet*, 75:179-85, 1998.

SILVA, E.O.; DUARTE, A. R. Surdez genética: uma revisão sucinta. *J Ped*, 71:297-302, 1995.

SIMÕES, A. M. & MACIEL-GUERRA, A.T. A surdez evitável: predominância de fatores ambientais na etiologia da surdez neurosensorial profunda. *J Ped*, 68:254-7, 1992.

SIMSEK, M.; AL-WARDY, N.; AL-KHAYAT, A.; SHANMUGAKONAR, M.; AL-BULUSHI, T.; AL-KHABORY, M.; AL-MUJENI, S.; AL-HASTHI, S. Absence of deafness-associated connexin-26 (GJB2) gene mutations in the Omani population. *Hum Mutant*, 18(6):545-6, 2001.

SINNATHURAY, A.R.; TONER, J.G.; CLARKE-LYTTLE, J.; GEDDIS, A.; PATTERSON, C.C.; HUGHES, A.E. Connexin 26 (GJB2) gen-related deafness and speech intelligibility after cochlear implantation. *Otol Neurotol*, 25(4):935-42, 2004.

SKVORAK GIERSCH, A.B.; MORTON, C.C. Genetic causes of nonsyndromic hearing loss. *Curr Opin Ped*, 11:551-7, 1999.

Referências Bibliográficas

SOBE, T.; VREUGDE, S.; SHADIN, H.; BERLIN, M.; DAVIS, N.; KANAAN, M.; FRYDMAN, M.; SHOHAT, M.; AVRAHAM, K.B. The prevalence and expression of inherid connexin 26 mutations associated with nonsyndromic hearing loss in the israeli population. **Hum Genet**, 106: 50-51, 2000.

STEEL, K.P. Genetic benefits of recycling. **Science**, 25:1363-4, 1999.

USAMI, S.; ABE, S.; SHINKAWA, S.; MOELLER, B.; KENYON, J.B. & KIMBERLING, W.J. Genetic and clinical features of sensorineural hearing loss associated with the 1555 mitochondrial mutation. **Laryngoscope**, 107:164-9, 1997.

VAN CAMP, G.; WILLWMS, P.J.; SMITH, R.J.H. Nonsyndromic hearing impairment: unparalleled heterogeneity. **Am J Hum Genet**, 60:758-64, 1997.

VAN LAER, L. COUKE, P.; MUELLER, R.F.; CAETHOVEM, G.; FLOTHMANN, K, PRASAD, S.D.; CHAMBERLIN, G.P.; HOUSEMAN, M.; TAYLOR, G.R.; VAN DE HEYNING, C.M.; FRANSEN,E.; ROWLAND, J.; CUCCI, R.A.; SMITH, R.J.; VANA CAMP, G. A common founder for the 35delG GJB2 gene mutation in connexin 26 hearing impairment. **J Med Genet**, 38(8):515-8, 2001.

WALLACE, D.C.; BROWN, M.D.; LOTT, M.T. Mitochondrial DNA variation in human evolution and disease. **Gene**, 238(1):211-30, 1999.

WALTZMANN, S.B. & SHAPIRO, W.H. Cochlear implants in children. **Trends in amplification**, 4(4):143-62, 1999.

Referências Bibliográficas

WATANABE, A.; TAKEDA, K.; PLOPLIS, B.; TACHIBANA, M. Epistatic relationship between Waardenburg Syndrome genes MITF and PAX3. *Nat Genet*, 18(3):283-86, 1998.

WEIL, D.; BLANCHARD, S.; KAPLAN, J.; GUILFORD, P.; GIBSON, F.; WALSH, J.; MBURU, P.; VARELA, A.; LEVILLIERS, J.; WESTON, M.D.; KELLEY, P.M.; KIMBERLING, W.J.; WAGENAAR, M.; LEVI-ACOBAS, F.; LARGET-PLET, D.; MUNNICH, A.; STEEL, K.P.; BROWN, S.D.M.; PETIT, C. Defective myosin VIIA gene responsible for Usher syndrome type 1B. *Nature*, 374:60-61, 1995.

WILCOX, A.S.; SAUNDERS, K.; OSBORN, A.H.; ARNOLD, A.; WUNDERLICH, J.; KELLEY, T.; COLLINS, V.; WILCOX, L.J.; GARDNER, R.J.M.C.; KAMARINOS, M.; CONE-WESSON, B.; WILLIAMSON, R.; DAHL, H.H.M. High frequency hearing loss correlated with mutations in GJB2 gene. *Hum Genet*, 106(4):399-405, 2000.

XIN GUAN, M.; FISCHER-GHODSIAN, N.; ATTARDI, G. A biochemical basis for the inherited susceptibility to aminoglycoside ototoxicity. *Hum Mol Genet*, 9:1787-93, 2000.

XIN GUAN, M. Molecular Pathogenetic mechanism of maternally inherited deafness. *Ann N Y Acad Sci*, 1011:259-71, 2004.

YEAGER, M.; NICHOLSON, B.J. Structure of gap junction intercellular channels. *Curr Opin Struct Biol*, 6:183-92, 1996.

YEAGER, M. Structure of cardiac gap junction intercellular channels. *J Struct Biol*, 121: 231-45, 1998.

Referências Bibliográficas

ZHANG, J.T.; NICHOLSON, B.J. The topological structure of connexin 26 and its distribution compared to connexin 32 in hepatic gap junctions. *J Memb Biol*, 139:15-45, 1994.

ZHAO, H.R.L.; WANG, Q. Maternally inherited aminoglycoside-induced and non-syndromic deafness is associated with the novel C1494T mutation in the mitochondrial 12SrRNA gene on a large Chinese family. *Am J Hum Genet*, 74:139-152, 2003.

ZELANTE, L.; GASPARINI, P.; ESTIVILL, X.; MELCHIONDA, S.; D'AGRUMA, L.; GOVEZ, N.; MILA, M.; MONICA, M.D.; LUTFI, J.; SHOHAT, M.; MANSFIELD, E.; DELGROSSO, K.; RAPPORT, 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):1605-9, 1997.

ALTA COMPLEXIDADE: IMPLANTE COCLEAR

MINISTÉRIO DA SAÚDE

GABINETE DO MINISTRO

PORTARIA Nº 1.278, DE 20 DE OUTUBRO DE 1999

DO 202, de 21/10/99

O Ministro de Estado da Saúde, interino, no uso de suas atribuições legais e,
Considerando a importância médico-social do tratamento da deficiência
auditiva;

Considerando que, em determinados casos de deficiência auditiva, há a
necessidade do emprego de tecnologia mais avançada para recuperação e reabilitação de seu
portador;

Considerando que a tabela do Sistema de Informações Hospitalares-SIH/SUS
contempla procedimentos para atendimentos deste grupo de portadores de deficiência;

Considerando a necessidade de estabelecer critérios de indicação e realização
de implante coclear;

Considerando a necessidade de estabelecer normas para o cadastramento de
Centros/Núcleos para a realização de implante coclear;

Considerando a necessidade de melhor identificar os pacientes e de coletar
informações a respeito dos implantes realizados, resolve:

Art. 1º Aprovar, na forma do Anexo I, os Critérios de Indicação e Contra-
Indicação de Implante Coclear.

Art. 2º Aprovar, na forma do Anexo II, as Normas para Cadastramento de
Centros/Núcleos para realização de Implante Coclear.

§ 1º Será realizada avaliação do cadastramento, por meio de relatório anual,
elaborado pelos Centros/Núcleos cadastrados e encaminhado à Secretaria de Estado da
Saúde, do qual deverá constar a produção do serviço.

§ 2º Será realizada avaliação anual do desempenho dos Centros/Núcleos de
Atendimento cadastrados, mediante informações técnicas fornecidas pelos mesmos e relatório
específico encaminhado à Coordenação de Alta Complexidade, do Departamento de Análise
da Produção dos Serviços de Saúde/DAPS/SAS, que se responsabilizará pelo envio dos
consolidados às Secretarias de Estado da Saúde para manifestação e verificação.

Art. 3º Estabelecer que os grupos e os procedimentos, abaixo relacionados,
somente poderão ser utilizados por Centro/Núcleo previamente cadastrado, de acordo com as
normas estabelecidas pelo Artigo 2º desta Portaria:

Grupo: 37.101.04.8 Cirurgia do Ouvido IV

Procedimento: 37.040.01.4 Implante Coclear

Grupos e Procedimentos criados pela Portaria GM/MS nº 3.762, de 20 de
outubro de 1998.

ALTA COMPLEXIDADE: IMPLANTE COCLEAR

Art. 4º Estabelecer que os Centros/Núcleos abaixo relacionados, anteriormente habilitados a realizar implante coclear e que vêm apresentando produção, deverão proceder seu recadastramento de acordo com as normas estabelecidas nesta Portaria, no prazo de 90 (noventa) dias, período no qual ficam, provisoriamente, cadastrados:

A - Hospital de Pesquisa e Reabilitação de Lesões Láblio-Palatais - Bauru/SP – CGC 63.025.530/0082-70

b - Fundação Faculdade de Medicina MEC/MPAS - SP – CGC 56.577.059/0001.00

Art. 5º Determinar a obrigatoriedade de preenchimento pelos Centros/Núcleos cadastrados, para cada Implante Coclear realizado, do Formulário de Informações de Implante Coclear constante do Anexo III, desta Portaria.

Parágrafo único. O Formulário de que trata este Artigo, devidamente preenchido, deverá ser enviado, anualmente, à Coordenação de Alta Complexidade/DAPS/SAS, onde integrará um Banco de Dados de Implante Coclear.

Art. 6º Esta Portaria entra em vigor na data de sua publicação, revogando o Artigo 3º, da Portaria GM/MS nº 3.762, de 20 de outubro de 1998.

BARJAS NEGRI

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 pós-lingual, 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:

ALTA COMPLEXIDADE: IMPLANTE COCLEAR

oral;

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

ANEXO II

IMPLANTE COCLEAR NORMAS PARA CADASTRAMENTO DE CENTROS/NÚCLEOS

1 – NORMAS GERAIS

1.1 – ROTINA DE CADASTRAMENTO

a - A abertura de qualquer Centro/Núcleo para Implante Coclear deverá ser precedida de consulta ao gestor do SUS, em níveis local e estadual, sobre as normas vigentes, a necessidade da sua criação e a possibilidade de cadastramento do mesmo, sem a qual o SUS não se obriga ao cadastramento.

b - Uma vez confirmada a necessidade da criação do serviço, a solicitação de cadastramento deverá ser formalizada junto à Secretaria de Saúde do Estado, Município ou Distrito Federal, de acordo com as respectivas condições de gestão e a divisão de responsabilidades pactuadas na Comissão Intergestores Bipartite, que se encarregará da avaliação das condições de funcionamento do serviço por meio de vistoria “in loco”, da emissão de laudo conclusivo a respeito do cadastramento, bem como da integração do novo serviço na rede de referência estadual.

c - Uma vez aprovada a solicitação de cadastramento pelo Gestor do SUS, o Ministério da Saúde, se julgar necessário, poderá solicitar parecer técnico da Sociedade Brasileira de Otologia que providenciará a realização de visita técnica e elaboração de parecer conclusivo a respeito do cadastramento solicitado;

d - Aprovado o cadastramento, a Secretaria de Assistência à Saúde – SAS, por meio da Coordenação de Alta Complexidade, tomará as providências necessárias a sua efetivação.

2 – NORMAS ESPECÍFICAS

2.1 - CAPACIDADE DE REALIZAÇÃO DE PROCEDIMENTOS

Para fins de cadastramento os Centros/Núcleos deverão ter condições de realizar os seguintes procedimentos:

- a - avaliação fonoaudiológica de linguagem oral e escrita e fonoarticulatória;
- b - terapia fonoaudiológica individual e em grupo;
- c - testes de próteses auditivas;
- d - testes de leitura oro-facial e de percepção da fala;
- e - audiometria tonal liminar, logaudiometria e imitanciometria;
- f - audiometria eletroencefálica e emissões otoacústicas;
- g - testes de função labiríntica;
- h - reabilitação auditiva.

2.2 – NECESSIDADE DE SERVIÇOS

Os Centros/Núcleos deverão possuir os seguintes Serviços:

ALTA COMPLEXIDADE: IMPLANTE COCLEAR

- a - Serviço de Otorrinolaringologia;
- b - Serviço de Neurologia;
- c - Serviço de Genética Clínica;
- d - Serviço de Pediatria;
- e - Serviço de Fonoaudiologia - audiologia clínica incluindo a adaptação de AASI e programas de reabilitação; terapias fonoaudiológicas distintas e adequadas a diferente faixas etárias e necessidades da clientela;
- f - Serviço de Pedagogia - realização de acompanhamento e orientação escolar e serviços de audiologia educacional;
- g - Serviço Social;
- h - Serviço de Nutrição - habilitado a realizar a reabilitação de portador de deficiência auditiva;
- i - Serviço de Enfermagem - habilitado a proceder à reabilitação de portador de deficiência auditiva

2.3 - EQUIPE TÉCNICA

Os Centros/Núcleos deverão ter, no mínimo, a seguinte equipe técnica:

2.3.1 - Equipe básica:

- a - Otorrinolaringologista;
- b - Fonoaudiólogo;
- c - Psicólogo;
- d - Assistente Social;

2.3.2 - Equipe Complementar:

- a - Neurologista, Neuropediatra;
- b - Geneticista
- c - Clínico Geral
- d - Pediatra

2.3.3 - Infraestrutura Hospitalar:

- a - Anestesiologista, laboratório clínico, diagnóstico por imagem.
- b - Equipe de enfermagem

OBSERVAÇÕES:

a - Os profissionais médicos deverão possuir título de especialista na respectiva área, conferido pelo Conselho Federal de Medicina ou Sociedade Brasileira afim ou, ainda, certificado de Residência Médica em sua área, reconhecida pelo Ministério de Educação. Os profissionais das demais áreas deverão comprovar experiência no tratamento de deficientes auditivos.

b - Os núcleos poderão contratar serviços especializados de terceiros a seu critério e responsabilidade, desde que isso não comprometa a integralidade e interdisciplinaridade do tratamento ofertado ao paciente.

2.4 - CARGA HORÁRIA MÍNIMA PARA HABILITAÇÃO AO CADASTRAMENTO

Os profissionais abaixo relacionados deverão ter a seguinte carga horária mínima de formação específica par fins de habilitação ao cadastramento:

- a - Otorrinolaringologista:

ALTA COMPLEXIDADE: IMPLANTE COCLEAR

- Residência Médica em Otorrinolaringologia ou título de especialista em otorrinolaringologia, com experiência comprovada em audiologia clínica e reabilitativa.

- Experiência em cirurgia otológica, com a carga horária exigida na Residência Médica.

- Curso para Implante Coclear com: aproximadamente 30 horas laboratoriais de osso temporal e 30 horas teórico-clínicas cobrindo os vários implantes multicanais.

b – Fonoaudiólogo:

- Curso com: 30 horas teórico-clínicas; 30 horas de mapeamento e 30 horas de reabilitação.

2.5 – INSTALAÇÕES FÍSICAS E EQUIPAMENTOS

a – Consultório Médico com equipe e instrumental de otorrinolaringologia, incluindo microscópio otológico;

b – Consultórios Médicos para neurologia, genética e pediatria;

c – Serviço de Audiologia Clínica com salas equipadas com: cabine acústica, VRA, audiômetro, impedanciômetro, BERA, amplificadores coletivos, vibradores táteis, ganho de inserção e emissões otoacústicas, equipamentos para testes perceptuais e conjuntos para teste de diferentes modelos de AASI, Hardware, Software e periféricos para ativação, mapeamento e balanceamento de eletrodos;

d – Serviço de Diagnóstico por Imagem: RX, Tomografia Computadorizada e Ressonância Magnética. Estes dois últimos exames poderão ser realizados em outras instituições, com referência devidamente formalizada nos moldes do disposto na Portaria SAS/MS Nº 494, de 26 de agosto de 1999;

e – Serviços Hospitalares com condições de proceder à internação hospitalar e com centro cirúrgico devidamente equipado e em condições de realizar cirurgias otológicas, sob anestesia geral e facilidades pós-cirúrgicas;

f – Serviço de Terapia com: salas para terapia individual e grupal, com aparelhos de amplificação coletiva, vibradores táteis e materiais pedagógicos;

g – Sala para atendimento psicológico;

h – Serviço de Nutrição;

i – Serviço de Enfermagem;

j – Laboratório para confecção de moldes auditivos equipado com motores de alta rotação e de bancada;

l – Serviço de Arquivo Médico.

OBSERVAÇÕES:

a - deverão ser utilizados equipamentos de implante coclear devidamente registrados na Agência Nacional de Vigilância Sanitária do Ministério da Saúde;

b - fica a critério do Centro/Núcleo a escolha do equipamento mais indicado para cada caso

2.6 – REGISTRO DE PACIENTES

Os Centros/Núcleos devem possuir um prontuário para cada paciente, com as informações sobre sua doença, seus diagnósticos, resultados de exames e tratamentos prévios, todos devidamente escritos, de forma clara e precisa, datadas e assinadas pelo profissional responsável pelo atendimento. Os prontuários deverão estar devidamente ordenados no Serviço de Arquivo Médico.

ALTA COMPLEXIDADE: IMPLANTE COCLEAR

Informações e procedimentos mínimos:

- Identificação do paciente;
- Histórico clínico e audiológico;
- Diagnóstico;
- Indicação do Implante Coclear;
- Descrição do ato cirúrgico;
- Condições na alta hospitalar e na retirada dos pontos;
- Ativação dos eletrodos após 30 dias da cirurgia;
- Em crianças: mapeamento e balanceamento dos eletrodos de 2 em 2 meses

no primeiro ano pós-cirúrgico, de 3 em 3 meses no segundo ano e semestralmente após o segundo ano;

- Em adultos: mapeamento e balanceamento dos eletrodos de 3 em 3 meses no primeiro ano pós-cirúrgico, semestral no segundo ano e anualmente após o segundo ano;

2.7 – FORMULÁRIO DE INFORMAÇÕES SOBRE IMPLANTE COCLEAR

É obrigatório o preenchimento pelos Centros/Núcleos cadastrados e seu envio anual para a Coordenação de Alta Complexidade do Ministério da Saúde, do Formulário de Informações sobre Implante Coclear, constante do Anexo III desta Portaria.

ANEXO III

FORMULÁRIO DE INFORMAÇÕES SOBRE IMPLANTE COCLEAR

I – IDENTIFICAÇÃO DO PACIENTE

- 1 - Nome: _____
- 2 - Idade: anos meses
- 3 - Sexo: Masculino Feminino
- 4 - Raça: Branca Negra Amarela Outras
- 5 - Escolaridade: Básica 1º grau completo 1º grau incompleto 2º grau completo
 2º grau incompleto Superior completo Superior Incompleto
- 6 - Profissão: _____
- 7 - O paciente trabalha? não se aplica não trabalha trabalha
- 8 - Endereço: _____
- 9 - Cidade: _____ Estado: _____
- 10 - Telefone: () _____ Recados com: _____

II - DADOS DO PRÉ-OPERATÓRIO

- 1 - Surdez:
- a) tipo: pré-lingual durante a gestação pré-lingual indefinido
 pré-lingual após a gestação pós-lingual
- b) idade na época da surdez: anos meses
- c) tempo de surdez: anos meses
- 2 - Diagnóstico etiológico provável:
- a) Surdez Congênita:

ALTA COMPLEXIDADE: IMPLANTE COCLEAR

<input type="checkbox"/> causas infecciosas: <input type="checkbox"/> meningite <input type="checkbox"/> sarampo <input type="checkbox"/> caxumba <input type="checkbox"/> toxoplasmose <input type="checkbox"/> rubéola <input type="checkbox"/> outras _____
<input type="checkbox"/> genética
<input type="checkbox"/> uso de ototóxicos. Qual? _____
<input type="checkbox"/> malformações congênitas. Quais? _____
<input type="checkbox"/> outras: _____
b) Surdez Adquirida:
<input type="checkbox"/> causas perinatais: <input type="checkbox"/> trabalho de parto prolongado <input type="checkbox"/> anóxia <input type="checkbox"/> icterícia <input type="checkbox"/> prematuridade <input type="checkbox"/> baixo peso ao nascimento <input type="checkbox"/> outras _____
<input type="checkbox"/> causas infecciosas: <input type="checkbox"/> meningite <input type="checkbox"/> sarampo <input type="checkbox"/> caxumba <input type="checkbox"/> rubéola <input type="checkbox"/> toxoplasmose <input type="checkbox"/> outras _____
<input type="checkbox"/> causas otológicas: <input type="checkbox"/> surdez súbita <input type="checkbox"/> otosclerose coclear <input type="checkbox"/> pós-operatório <input type="checkbox"/> trauma cranio encefálico <input type="checkbox"/> doença autoimune <input type="checkbox"/> fratura do osso temporal <input type="checkbox"/> otite média crônica <input type="checkbox"/> outras _____
<input type="checkbox"/> desconhecida
<input type="checkbox"/> outras causas: _____
<input type="checkbox"/> causa desconhecida ()
3 - Sintomas associados:
<input type="checkbox"/> zumbido <input type="checkbox"/> tonturas não rotatórias <input type="checkbox"/> vertigens
<input type="checkbox"/> outros: _____
4 - Exame Físico:
a) otoscopia <input type="checkbox"/> normal <input type="checkbox"/> alterada _____
b) rinoscopia <input type="checkbox"/> normal <input type="checkbox"/> alterada _____
c) oroscopia <input type="checkbox"/> normal <input type="checkbox"/> alterada _____
5 - Exames Subsidiários:
Audiometria <input type="checkbox"/> DNS profunda bilateral (> 90 dB) <input type="checkbox"/> DNS profunda unilateral e DNS severa unilateral <input type="checkbox"/> DNS severa bilateral (entre 70 e 90 dB) <input type="checkbox"/> outras _____

Discriminação: <input type="checkbox"/> %
CT dos temporais: <input type="checkbox"/> normal <input type="checkbox"/> alterada _____ <input type="checkbox"/> sinais de calcificação da cóclea
Exame vestibular: <input type="checkbox"/> normal <input type="checkbox"/> alterado _____
Ex. laboratoriais: <input type="checkbox"/> normais <input type="checkbox"/> alterados _____
Outros: _____
6 - Cirurgia otológica prévia:
<input type="checkbox"/> não <input type="checkbox"/> sim. Qual e quando? _____
7 - Doenças Associadas:
<input type="checkbox"/> diabetes <input type="checkbox"/> nefropatias <input type="checkbox"/> hipertensão <input type="checkbox"/> pneumopatias

ALTA COMPLEXIDADE: IMPLANTE COCLEAR

cardiopatias outras: _____

8 - Testes com prótese auditiva:

Audiometria com prótese auditiva:

Lado Direito:

dB	250	500	1000	2000	4000	8000	Hz
----	-----	-----	------	------	------	------	----

Lado Esquerdo:

dB	250	500	1000	2000	4000	8000	Hz
----	-----	-----	------	------	------	------	----

Lado da prótese: D E Bilateral

Marca: _____ Modelo: _____

Tempo de uso: _____ Acerto de sentenças abertas: %

a) Discriminação de sons complexos: %

b) Reconhecimento da fala:

- porcentagem de discriminação de monossílabos:	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> %
- porcentagem de discriminação de vogais:	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> %
- porcentagem de discriminação em apresentação fechada:	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> %

c) Reconhecimento de traços suprasegmentares:

- frequência:	_____
- tonicidade:	_____
- entonação:	_____
- ritmo:	_____

d) Reconhecimento da voz:

- intensidade:	_____
- pitch:	_____
- ressonância:	_____

e) Sistema fonêmico:

- fonemas distorcidos:	_____
- fonemas omitidos:	_____
- fonemas substituídos:	_____

III - DADOS DA CIRURGIA E DO IMPLANTE

1 - Data da Cirurgia: / /

2 - Data da alta hospitalar: / /

3 - Cirurgião:

Nome: _____

CRM: CPF: Estado:

4 - Equipe cirúrgica: _____

5 - Equipe anestésica: _____

6 - Identificação do Implante: _____

Marca do Implante Coclear: (alfanumérico)

Modelo: (alfanumérico)

Número de eletrodos do Modelo: (numérico)

ALTA COMPLEXIDADE: IMPLANTE COCLEAR

Tipo: MM MP PP
Sistema: digital analógico
Eletrodo: extracoclear intracoclear dificuldade de colocação
Número de eletrodos implantados:
7 - Estado da cóclea: normal obliterada
8 - Intercorrências na cirurgia ou pós-operatório imediato:
 paralisia facial vertigem intensa zumbido intenso
 isquemia do retalho necrose do retalho
 outras: _____
9 - Intercorrências no pós-operatório tardio:
 paralisia facial vertigem intensa zumbido intenso
 isquemia do retalho necrose do retalho
 outras: _____

IV - DADOS DA PROGRAMAÇÃO DO IMPLANTE COCLEAR

1 - Data de início: / /
2 - Engenheiro responsável: _____
3 - Há percepção do estímulo gerado?
 sim não
4 - Frequência mínima percebida: _____ Hz
5 - Frequência máxima percebida: _____ Hz
6 - Discriminação de intensidade do som (limiar mínimo, confortável e doloroso):
 ruim regular boa ótima
7 - Discriminação de frequência do som (grave ou agudo):
 ruim regular boa ótima

V - DADOS DA REABILITAÇÃO

1 - Data de início: / /
2 - Fonoaudióloga responsável: _____
a) Discriminação de sons complexos: %
b) Reconhecimento da fala:
- porcentagem de discriminação de monossílabos: %
- porcentagem de discriminação de vogais: %
- porcentagem de discriminação em apresentação fechada: %
c) Reconhecimento de traços suprasegmentares:
- frequência: _____
- tonicidade: _____
- entonação: _____
- ritmo: _____

d) Reconhecimento da voz:
- intensidade: _____
- pitch: _____
- ressonância: _____

e) Sistema fonêmico
- fonemas distorcidos: _____
- fonemas omitidos: _____
- fonemas substituídos: _____

VI - MAUS RESULTADOS DO IMPLANTE COCLEAR (para ser preenchido em caso de maus resultados após 6 meses da cirurgia)
 paciente desmotivado a usar o implante coclear
 eletrodo ativo mal posicionado

**ALTA COMPLEXIDADE:
IMPLANTE COCLEAR**

- | |
|--|
| <p><input type="checkbox"/> falha da estimulação elétrica do implante coclear
<input type="checkbox"/> dificuldades na leitura oro-facial durante a reabilitação
<input type="checkbox"/> outros _____</p> |
|--|

(Of.El.Nº 374/99)



MINISTÉRIO DA SAÚDE
Conselho Nacional de Saúde
Comissão Nacional de Ética em Pesquisas - CONEP

PARECER N.º 852/2004

Registro CONEP: 9864 (Este nº deve ser citado nas correspondências referentes a este projeto)

Registro CEP: 339/2003

Processo n.º 25000.007502/2004-11

Projeto de Pesquisa: " incidência e correlação da performance de fala em indivíduos submetidos ao implante coclear e que apresentem mutações em genes responsáveis pela deficiência auditiva."

Pesquisador Responsável: Dra. Edi Lúcia Sartorato

Instituição: Centro de Biologia Molecular e Engenharia Genética /UNICAMP

Área Temática Especial: Genética humana

Trata-se de um projeto com competente revisão de literatura e boa apresentação metodológica.

O principal objetivo da pesquisa é averiguar a incidência de surdez de causa genética em indivíduos que forem submetidos a implante coclear sem diagnóstico específico da causa da surdez, a fim de, após estudo de genes causais, realizar o aconselhamento genético.

Os genes a serem investigados estão bem definidos.

A amostra constará de 50 indivíduos submetidos a implante coclear no HC-UNICAMP e no Hospital de Reabilitação e Anomalias Crânio-Faciais em Bauru.

As técnicas de laboratórios para o estudo genético estão adequadamente apresentadas.

Os testes clínicos também estão satisfatoriamente descritos.

Existe na própria metodologia do trabalho uma previsão de retorno para os pacientes.

O Termo de Consentimento está satisfatório. Recomenda-se todavia, que a pesquisadora use a terminologia adotada pela Res. CNS 196/96 - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido e não Termo Pós- informação.

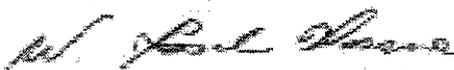
O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa - CEP da instituição supracitada.

Diante do exposto, a Comissão Nacional de Ética em Pesquisa - CONEP, de acordo com as atribuições definidas na Res. CNS 196/96, manifesta - se pela aprovação do projeto de pesquisa proposto com a seguinte recomendação:

- Adaptação do Título do Termo de Consentimento conforme consta no item IV da Res. 196/96.

Situação: Projeto aprovado com recomendação

Brasília, 13 de abril de 2004.


WILLIAM SAAD HOSSNE
Coordenador da CONEP/CNS/MS

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Projeto: *Determinação da frequência dos alelos 35delG no gene da conexina 26 em amostras da população brasileira.*

Responsáveis: *Profa. Dra. Edil Lúcia Sartorato*

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

Profa. Dra. Andréa Trevas Maciel-Guarra

(Departamento de Genética Médica - FCM - UNICAMP)

Nome do paciente: _____

Registro hospitalar (HC): _____

Endereço: _____

CEP: _____ Fone. (____) _____

Cidade: _____ Estado _____

Responsável: _____ Idade: _____

RG: _____ Grau de parentesco: _____

Justificativa e objetivos do estudo:

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

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

Este trabalho tem como objetivos determinar a prevalência da mutação 35delG em recém-nascidos da população brasileira, detectar precocemente casos de DA de origem genética, e indicar o aconselhamento genético aos heterozigotos.

Procedimentos a que serão submetidos os pacientes

A mutação 35delG será pesquisada a partir de uma gota de sangue do bebê colhida na ocasião do "teste do pezinho", em papel especial. Nos casos de detecção de indivíduo heterozigoto, todo o gene da conexina 26 será analisado para excluir a possibilidade de que haja outra mutação no outro alelo que resulte em DA. Como pode haver interação diferentes genes envolvidos na DA não sindrômica, caso ainda não se encontre a mutação do outro alelo no gene da conexina 26, outros genes poderão ser estudados. Nesse caso, pode ser necessária a coleta de 5ml de sangue do indivíduo e dos seus pais para confirmação dos achados e para que o aconselhamento genético seja realizado de forma adequada.

Risco e Desconforto

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

Benefícios esperados

Nos casos em que for detectada a mutação 35delG no gene da conexina 26 em dose única (recém-nascidos heterozigotos), serão fornecidas informações quanto à necessidade de reavaliação genética no futuro, quando a criança atingir a idade reprodutiva.

Por outro lado, naqueles em que forem detectadas mutações que levam a DA, a reabilitação poderá ser iniciada precocemente, com resultados muito superiores àqueles obtidos quando o diagnóstico é tardio. Além disso, os pais poderão ser orientados quanto ao risco de nascimento de outros filhos com DA.

Garantimos aos pacientes e suas famílias resposta a qualquer pergunta e esclarecimento de qualquer dúvida acerca dos assuntos relacionados com esta pesquisa, sendo proporcionadas ainda informações atualizadas durante o estudo.

Será mantido o sigilo e o caráter confidencial das informações, e a identificação dos pacientes não será exposta nas conclusões ou publicações.

Recusa ou descontinuação da participação

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

Caso seja necessário contactar-nos:

Comité de Ética	(019) 3788-8936
Profa. Dra. Edí Lúcia Sartorato	CBMEG - (019) 3788-1147
Profa. Dra. Andréa T. Maciel Guerra	Depto. de Genética Médica - (019) 3788-8907
Profa. Dra. Vanda Maria G. Gonçalves	Depto. Neurologia (019)-3788-7810

Local e data: _____
Ambulatório: _____

Paciente ou responsável: _____
Médico responsável: _____