

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

INSTITUTO DE BIOLOGIA



PAULA BALONI ANDRADE

**“ESTUDO DA ETIOLOGIA DA SURDEZ
NEUROSSENSORIAL EM RECÉM-NASCIDOS DE ALTO
RISCO”**

Este exemplar corresponde à redação final
da tese defendida pelo(a) candidato (a)
Paula Baloni Andrade
Edi L. Sartorato
e aprovada pela Comissão Julgadora.

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

Orientadora: Prof^a Dr^a Edi Lúcia Sartorato

Co-Orientadora: Prof^a Dr^a Marília Fontenele e Silva Câmara

Campinas, 2008

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

An24e

Andrade, Paula Baloni

Estudo da etiologia da surdez neurossensorial em recém-nascidos de alto risco / Paula Baloni Andrade. – Campinas, SP: [s.n.], 2008.

Orientadores: Edi Lucia Sartorato, Marília Fontenele e Silva Câmara.

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

1. Genética. 2. Surdez. 3. Recém-nascidos. 4. Alto risco. I. Sartorato, Edi Lucia. II. Câmara, Marília Fontenele e Silva. III. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. VI. Título.

(scs/lb)

Título em inglês: Etiological study of the sensorineural deafness in high risk newborns.

Palavras-chave em inglês: Genetics; Deafness; Newborn; High risk.

Área de concentração: Genética Animal e Evolução.

Titulação: Mestre em Genética e Biologia Molecular.

Banca examinadora: Edi Lucia Sartorato, Andréa Trevas Maciel-Guerra, Arthur Menino Castilho.

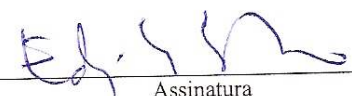
Data da defesa: 17/10/2008.

Programa de Pós-Graduação: Genética e Biologia Molecular.

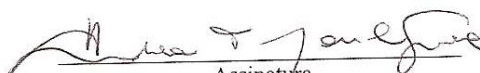
Campinas, 17 de Outubro de 2008

BANCA EXAMINADORA

Profª Drª Edi Lúcia Sartorato


Assinatura

Profª Drª Andréa Trevas Maciel-Guerra


Assinatura

Prof. Dr. Arthur Menino Castilho


Assinatura

Profª Drª Vera Lúcia Gil da Silva Lopes

Assinatura

Prof. Dr. Carlos Eduardo Steiner

Assinatura

*“A mente que se abre a uma nova idéia
jamais voltará ao seu tamanho original.”*

Albert Einstein

Aos meus pais, tia Tutu, meu irmão e David.

AGRADECIMENTOS

A Deus. Por tudo.

À Dra. Edi Lúcia Sartorato, pela orientação, dedicação e ótimos momentos de amizade.

À Dra. Marília Fontenele, pela co-orientação, simpatia e por toda a paciência com minhas dúvidas.

À minha amiga-irmã-gêmea Jessica por todo o apoio psicológico, pela ajuda nos experimentos e pela amizade constante e verdadeira.

Aos amigos do laboratório por estes 4 anos maravilhosos e pela ajuda: Sueli, Francine, Creidy, Pri-pequena, Priscila, Tercio, Tammy, Mari, Lucy, Lúcio, Frau, Camila, Thalita, Bruna, Fer 1, Fer 2, Fer 3, Fer 4, Daniel, Zélo, Creito, Vanessa, Diego, Carol (Paraná), Carolzinha, Carol (FCM) Paulo, Mara, Reginaldo, Flávia-flor, Flávia 2, Renan, Milena...

À Dra. Maricilda Palandi pelas conversas, conselhos e almoços diários, com muita descontração.

Aos funcionários do CBMEG: Madá, Cida, Sandra, Tânia...

À Dra. Anete Pereira, por permitir o uso do seqüenciador automático, fundamental para este trabalho.

Ao estatístico Cristiano Borges, por me ajudar tão prontamente, com tanta gentileza e capricho.

Aos indivíduos, enfermeiros, médicos e estudantes envolvidos nesta pesquisa.

Aos professores participantes da qualificação, pré-banca e banca, pela grande contribuição.

Às agências financiadoras CAPES, FAPESP e CNPq.

SUMÁRIO

Dedicatória	4
Agradecimentos.....	6
Lista de tabelas	10
Lista de figuras e gráficos	11
Lista de Abreviaturas e Símbolos	13
Resumo	15
Abstract	17
Introdução	19
I. A perda auditiva	19
II. Perda auditiva infantil	19
1. Recém-nascidos de alto risco	20
III. Causas e classificações da perda auditiva	21
IV. Genética da perda auditiva	23
1. As proteínas conexinas	23
1.1. <i>GJB2</i> : O gene que codifica Cx26	27
1.1.1. A mutação 35delG	28
1.1.2. Outras mutações no gene <i>GJB2</i>	29
1.2. <i>GJB6</i> : O gene que codifica Cx30	29
1.2.1. Δ (<i>GJB6</i> -D13S1830) e Δ (<i>GJB6</i> -D13S1854)	30
2. As mitocôndrias	31
2.1. O DNA mitocondrial	31
2.2. A ototoxicidade dos aminoglicosídeos	33
2.3. Genes mitocondriais e mutações	34
2.3.1. Gene <i>MT-RNR1</i> (ou gene <i>12S rRNA</i>)	34
2.3.1.1. A Mutação A1555G	34
2.3.1.2. A Mutação C1494T	36
2.3.1.3. A Mutação 961delT/insC	36
2.3.1.4. A Mutação T961G	37
2.3.1.5. A Mutação A827G	37

2.3.2. Gene <i>MT-TS1</i> (ou gene <i>tRNA^{Ser(UCN)}</i>)	37
2.3.2.1. A Mutação A7445G nos genes <i>CO1/tRNA^{Ser(UCN)}</i>	37
2.3.2.2. A Mutação G7444A nos genes <i>CO1/tRNA^{Ser(UCN)}</i>	38
3. Triagem auditiva neonatal	39
Objetivos	41
I – Objetivos Gerais	41
II – Objetivos Específicos	41
Material e Métodos	43
I – Casuística	43
II – Métodos	43
1. Etapas do Estudo	43
1.1 . Coletas de dados e exames auditivos	43
1.2. Consentimento do Indivíduo	44
1.3. Obtenção do DNA	44
1.3.1 Extração do DNA genômico de sangue periférico.....	44
1.3.2. Extração do DNA genômico de esfregaço bucal	45
1.3.3. Rastreamento de mutações	45
1.3.3.1. Rastreamento da mutação 35delG no gene <i>GJB2</i> ...	45
1.3.3.2. Rastreamento da mutação A1555G	46
1.3.3.3. Rastreamento da mutação C1494T	46
1.3.3.4. Rastreamento das mutações G7444A e A7445G....	47
1.3.3.5. Rastreamento das deleções Δ (<i>GJB6</i> -D13S1830) e Δ (<i>GJB6</i> -D13S1854)	47
1.3.3.6. Rastreamento de outras mutações no gene <i>GJB2</i> e das mutações A827G, T961G e 961delT/insC	48
1.3.4. Reação de seqüenciamento automático	48
1.3.5. Purificação dos produtos de PCR e seqüenciamento.....	49
1.3.6. Análise das seqüências obtidas	49
Resultados	51
1 – Resumo dos resultados obtidos	51
2 – Mutação 35delG no gene <i>GJB2</i>	56

3 – Mutação A1555G no gene mitocondrial 12S <i>rRNA</i>	57
4 – Mutação C1494T no gene mitocondrial 12S <i>rRNA</i>	58
5 – Mutações A827G, T961G e 961delT/insC no gene mitocondrial 12S <i>rRNA</i>	59
6 – Mutações G7444A e A7445G nos genes mitocondriais <i>CO1/tRNA^{SER(UCN)}</i>	61
7 – Mutações Δ (<i>GJB6</i> -D13S1830) E Δ (<i>GJB6</i> -D13S1854) no gene <i>GJB6</i>	62
8 – Outras mutações no gene <i>GJB2</i>	63
9 – Coleta de Dados	64
Discussão	72
Conclusões	82
Parecer comitê de ética UNIFOR	84
Parecer comitê de ética UNIFESP	87
Termo de consentimento	89
Referências Bibliográficas	94

Lista de Tabelas

Tabela 1 – Resultados moleculares do grupo A	52
Tabela 2 – Resultados moleculares do grupo B	53
Tabela 3 – Resultados moleculares do grupo C	54
Tabela 4 – Resultados moleculares do grupo D	55
Tabela 5 - Indivíduos de UTIN – Com perda auditiva (GRUPO A). dBNA : Nível Auditivo em Decibéis. Em vermelho : antibióticos aminoglicosídeos.....	67
Tabela 6 - Indivíduos de UTIN – Sem perda auditiva (GRUPO B). Em vermelho : antibióticos aminoglicosídeos	68
Tabela 7 - Indivíduos Nascidos a Termo – Com perda auditiva (GRUPO C). dBNA : Nível Auditivo em Decibéis	69
Tabela 8 - Indivíduos Nascidos a Termo – sem perda auditiva (GRUPO D)	70

Lista de Figuras e Gráficos

Figura 1 – Componentes das orelhas externa, média e interna. Modificado de <http://www.cabuloso.com/Anatomia-Humana> 22

Figura 2 – Posicionamento dos conéxons nas células mostrando a organização das conexinas. A seta **1** exemplifica um canal homomérico e homotípico. A seta **2** exemplifica um canal heteromérico e heterotípico. A seta **3** exemplifica um canal heteromérico e homotípico. Modificado de Korkiamäki, 2002 25

Figura 3 – Transporte e reciclagem de íons K^+ na cóclea. As setas pretas indicam o caminho feito pelos íons potássio (K^+) a partir de um estímulo sonoro. Figura modificada do site www.susmedicos.com 27

Figura 4 – DNA mitocondrial e localização dos genes. Modificado de www.mercksource.com 32

Figura 5 – Comparação de região do gene **12S rRNA**, onde se encontram as mutações A1555G e C1494T e a região do gene 16S rRNA da bactéria *E. coli*. Modificado de Zhao *et al.*, 2005 35

Figura 6 - Gel de agarose 1,5% mostrando os padrões de banda Controle, Mutante e Normal para a mutação **35delG** em 5 indivíduos. **A**: Controle Homozigoto mutante. **B**: Controle Heterozigoto. **1 e 2**: indivíduos com a mutação **35delG** em homozigose. **3, 4 e 5**: indivíduos homozigotos normais 56

Figura 7 - Fragmentos da digestão do gene **12S rRNA** com a enzima *BsmA* I, em gel de agarose 1,5%, corado com brometo de etídeo. **(L)** ladder de 1KB GIBCO BRL®; e **(N)** fragmentos de 1100pb, 516pb e 444pb, de um indivíduo normal para a mutação A1555G 57

Figura 8 - Fragmentos da digestão do gene **12S rRNA** com a enzima *BsmA* I, em gel de agarose 1,5%, corado com brometo de etídeo. **(L)** ladder de 1KB GIBCO BRL® e; **(M)** fragmentos de 1616pb e 444pb de um indivíduo mutante para a mutação A1555G 58

Figura 9 – Fragmentos da digestão do gene **12S rRNA** com a enzima *Hph* I, em gel de agarose 1,5%, corado com brometo de etídeo. **(L)** ladder de 1KB GIBCO BRL®; **(1)-(8)** fragmentos digeridos (indivíduos sem a mutação C1494T); **(9)** indivíduo controle positivo para a mutação C1494T 58

Figura 10 - Fragmentos da amplificação do gene **12S rRNA** em gel de agarose 1,5%, corado com brometo de etídeo. **(L)** ladder de 1KB GIBCO BRL® e; **(1), (2)** e **(3)** fragmentos de 800pb 59

Figura 11 – Eletroferograma mostrando indivíduo normal para A827G. A seta indica o ponto da mutação, com o nucleotídeo normal adenina (A) 60

Figura 12 - Eletroferograma mostrando indivíduo mutante para A827G. A seta indica o ponto da mutação (troca de adenina (A) por guanina (G)) 60

Figura 13 - Fragmento da digestão dos genes **CO1/tRNA^{SER(UCN)}** com a enzima *Xba*I, em gel de agarose 1,5%, corado com brometo de etídeo. **(L)** ladder de 1KB GIBCO BRL®; e **(N)** fragmentos de 846pb, 540pb e 435pb, de um indivíduo normal para as mutações G7444A e A7445G 61

Figura 14 - Fragmento da digestão dos genes **CO1/tRNA^{SER(UCN)}** com a enzima *Xba*I, em gel de agarose 1%, corado com brometo de etídeo. **(L)** ladder de 1KB GIBCO BRL®; e **(M)** fragmentos de 1386 bp e 435bp de um indivíduo mutante controle para A7445G 62

Figura 15 - Resultado da técnica de PCR para detecção das deleções $\Delta(GJB6-D13S1830)$ e $\Delta(GJB6-D13S1854)$. **(L)** marcador *ladder* 100pb Gibco BRL®; **(1)** indivíduo normal; **(2)** $\Delta(GJB6-D13S1830)/N$; **(3)** $\Delta(GJB6-D13S1830)/\Delta(GJB6-D13S1830)$; **(4)** e **(5)** $\Delta(GJB6-D13S1854)/N$ 62

Figura 16 - 3 fragmentos do gene **GJB2** resultantes do PCR. **(L)** ladder de 1KB GIBCO BRL®; **(1)** fragmento de 284pb; **(2)** fragmento de 328pb; **(3)** fragmento de 255pb 63

Gráfico 1 – Comparação da média do período de internação entre os indivíduos dos grupos A e C (em dias) 64

Gráfico 2 – Comparação do grau de perda auditiva das orelhas esquerda e direita entre os grupos A e C 65

Gráfico 3 - Frequência de indivíduos usuários de gentamicina, amicacina, vancomicina, furosemida e outros medicamentos nos grupos A, B, C e D 66

Lista de Abreviaturas e Símbolos

AS-PCR	Allele specif PCR (PCR alelo-específico)
CBMEG	Centro de Biologia Molecular e Engenharia Genética
CO1	Citocromo oxidase 1
dB	Decibéis
del	Deleção
DFNA	Perda Auditiva Genética não Sindrômica Autossômica Dominante
DFNB	Perda Auditiva Genética não Sindrômica Autossômica Recessiva
DNA	Ácido Desoxirribonucléico
EDTA	Ácido Etileno Diamono Tetracético
g	Gramma
GJB	Gap Junction Beta (Junção Comunicante Beta)
Gln	Glutamina
Lys	Lisina
MEAC	Maternidade Escola Assis Chateaubriand
mL	Microlitro
mM	Milimolar
mtDNA	DNA mitocondrial
ng	Nanograma
pb	Pares de Base
PCR	Polymerase Chain Reaction (Reação em Cadeia da Polimerase)
RNA	Ácido Ribonucléico
rRNA	RNA ribossômico
TBE	Tris, Base, Ácido Bórico, EDTA
UNICAMP	Universidade Estadual de Campinas
UNIFESP	Universidade Federal de São Paulo
UNIFOR	Universidade de Fortaleza
UTIN	Unidade de Terapia Intensiva Neonatal
SUS	Sistema Único de Saúde
μg	Micrograma
μL	Microlitro
Δ	Deleção

RESUMO

A perda auditiva em recém-nascidos de alto risco, varia de 20-40 em cada 1000 nascimentos. Em uma porcentagem variável de casos, a etiologia é ambiental, decorrente de fatores pré, peri ou pós-natais ou pode ainda ser de origem genética. O principal objetivo deste projeto foi determinar a etiologia da perda auditiva em crianças admitidas em unidades de terapia intensivas neonatais (UTIN) e avaliar a contribuição de outros fatores, principalmente medicamentos ototóxicos. Assim, foram selecionados 4 grupos: 25 crianças nascidas prematuras, de UTIN e com perda auditiva (**grupo A**), 25 crianças nascidas prematuras, de UTIN e sem perda auditiva (**grupo B**), 25 crianças nascidas a termo e com perda auditiva (**grupo C**) e 25 crianças nascidas a termo sem perda auditiva (**grupo D**), onde foram estudadas as principais mutações que levam à perda auditiva neurossensorial não-sindrômica: **35delG** (no gene **GJB2**), mutações mitocondriais **A7445G**, **G7444A** (no gene **CO1**), **A1555G**, **C1494T**, **A827G**, **T961G** e **961delT/insC** (no gene **12S rRNA** e, em geral, moduladas pelo uso de antibióticos aminoglicosídeos), deleções **Δ (GJB6-D13S1830)** e **Δ (GJB6-D13S1854)**, no gene **GJB6**. Em casos em que não se encontrou uma mutação que justificasse a perda, o gene **GJB2** foi sequenciado. Foram encontrados no grupo A 1 indivíduo com a mutação **V37I** (gene **GJB2**) em heterozigose e 2 com a mutação **A827G**. No grupo B foram encontrados 3 indivíduos com a mutação **A827G**. No grupo C foram encontrados 5 indivíduos com a mutação **A827G** e 5 com a mutação **35delG** em homozigose. No grupo D foi encontrado apenas 1 indivíduo com a mutação **A827G**. Estes resultados mostraram que a mutação **A827G** pode estar sendo modulada por mais de um fator, como aminoglicosídeos ou genes nucleares moduladores. A mutação **35delG** parece estar diretamente relacionada a perdas congênitas profundas e pré-linguais. Na comparação dos grupos A e B o *Teste de Mann-Whitney* mostrou significância na média do período de internação entre eles (p-valor = 0,003), mostrando que esta diferença pode ser a principal causa da perda auditiva no grupo A. E na comparação dos grupos A e C, o *Teste de Mood* mostrou diferença altamente significativa de perda auditiva de ambas orelhas entre estes grupos (Orelha esquerda: p-valor = 0,002 e Orelha direita: p-valor = 0,000), sendo as perdas no grupo A severas e no grupo C profundas, mostrando que no grupo C esta perda é provavelmente causada por fatores genéticos, que levam a perdas profundas, bilaterais e pré-linguais como mostram estudos prévios feitos com o gene **GJB2**. No caso de indivíduos com perda auditiva, onde não foram encontradas mutações, há a possibilidade de que esta tenha sido causada por fatores ambientais ou ainda por mutações não pesquisadas neste trabalho. Deste modo, é de extrema importância o rastreamento genético para o diagnóstico precoce, otimizando, assim, as chances de desenvolvimento da fala e linguagem.

ABSTRACT

The frequency of sensorineural hearing loss in high-risk newborns is 20-40 in 1000 births. In many cases, the cause is environmental, due to prenatal, perinatal and postnatal factors, or caused by genetic factors. The main objectives of this project were to determine the etiology of the hearing loss in children admitted into Neonatal Intensive Care Unit (NICU) and compare with other factors, mainly ototoxic medication. 4 different groups were selected: 25 pre-matures (from NICU) with sensorineural nonsyndromic hearing loss (**group A**), 25 pre-matures (from NICU) without hearing loss (**group B**); 25 full term children with sensorineural nonsyndromic hearing loss (**group C**) and 25 full term children without hearing loss (**group D**). The main mutations which cause hearing loss were studied: **35delG** (**GJB2** gene), **A7445G**, **G7444A** (**CO1** mitochondrial gene), **A1555G**, **C1494T**, **A827G**, **T961G** and **961delT/insC** (in the **12S rRNA** mitochondrial gene and, in general, modulated by aminoglycosides), **Δ(GJB6-D13S1830)** and **Δ(GJB6-D13S1854)** (in the **GJB6** gene). The complete **GJB2** gene was sequenced in cases where the 35delG mutation wasn't found, or where it was found in heterozygosis. 1 child was found with V37I in heterozygosis (**GJB2** gene) and 2 with the A827G mutation in group A. 3 children were found with the A827G mutation in group B. 5 children were found with the A827G mutation and 5 others with 35delG in homozygosis in group C. In group D only 1 child was found with the mutation A827G. These results show that A827G mutations might be modulated by more than one factor, like aminoglycosides or nuclear modifier genes. The 35delG mutation might be directly related to prelingual profound congenit losses. Comparing groups A and B, *Mann-Whitney's Test* showed significant results in the NICU period average (p-value = 0,003), indicating that this difference could be the major cause of hearing loss in group A. The *Mood Test* showed highly significant hearing loss difference in both ears between groups A and C (left ear p-value = 0,002 and right ear p-value = 0,000), showing severe loss in group A and profound loss in group C, indicating that in group C this loss is probably caused by genetic factors that induce prelingual bilateral profound loss, as related in previous **GJB2** studies. In cases of hearing loss where mutations couldn't be found, it is possible that it has been caused by other mutations not studied or environmental causes. Therefore, the screening of mutations is important because it could provide better chances of developing speech and language.

I. A perda auditiva

A perda auditiva é um dos distúrbios sensoriais mais comuns e pode se manifestar em qualquer faixa etária. De acordo com a Academia Americana de Pediatria (1999), a perda auditiva é uma das anormalidades mais comuns presentes já ao nascimento.

Em 2005, a Organização Mundial de Saúde estimou existir 278 milhões de indivíduos com problemas de audição, sendo mais de 15 milhões no Brasil. Em 1992, Simões & Maciel-Guerra encontraram uma frequência de 67% de fatores ambientais causando a perda auditiva, 15% de fatores hereditários e 15% dos casos com etiologia não esclarecida. Em 2007, Silva e colaboradores também encontraram predominância das causas ambientais, sendo estas correspondentes a 58,6% dos casos de perda auditiva; as causas genéticas foram encontradas em 20,7% dos casos e os 20,7% restantes apresentaram etiologia não esclarecida, podendo estes dados evidenciar uma melhora nas condições médico-sanitárias brasileiras.

II. Perda auditiva infantil

A prevalência média da perda auditiva já na infância é estimada em 1,5/1000, variando de 0,8 a 2/1000 em diferentes áreas do mundo industrializado. Entre as crianças com déficit permanente de audição cerca de 90% apresentam distúrbios neurossensoriais, 5% distúrbios de condução e 5% apresentam ambos (PARVING, 1994), sendo que em muitos casos é difícil estabelecer sua origem (MORTON, 1991).

A consequência mais comum da perda auditiva é o significativo prejuízo no desenvolvimento da linguagem e nas realizações escolares. A detecção da perda auditiva e a intervenção precoce na infância são fundamentais para o desenvolvimento da comunicação, cognição, relacionamento, sociabilidade, emotividade, aprendizagem e, futuramente, para oportunidades vocacionais (KARCHMER & ALLEN, 1999).

Os benefícios do diagnóstico da perda auditiva e intervenção precoce em

crianças são comprovados quando o processo de intervenção é iniciado antes dos seis meses de idade, mesmo nos casos de perda auditiva profunda. Quando assim acontece, aos cinco anos pode-se observar desenvolvimento de linguagem adequada às capacidades cognitivas (YOSHINAGA-ITANO *et al.*, 1998). O ideal é que haja um tratamento médico, iniciando-se antes dos 3 meses de idade, e intervenção antes dos 6 meses, além de profissionais especializados para a educação destas crianças (DECLAU *et al.*, 2005).

1. Recém-nascidos de alto risco

A frequência das diversas causas da perda auditiva em crianças modificou-se nos últimos 30 anos e provavelmente continuarão se modificando em função das triagens auditivas estarem se tornando viáveis para todas as crianças, devendo-se assim, desenvolver diferentes formas de prevenção. A maior vitória da prevenção da perda auditiva em crianças encontra-se na área das doenças infecciosas. A rubéola congênita desapareceu dos Estados Unidos da América após a realização da imunização e os casos de perda auditiva ocasionados por seqüela de meningite bacteriana diminuíram enormemente após a administração da vacina *Haemophilus influenzae* B (KILE, 1993).

Dentre os recém-nascidos, são considerados de alto risco crianças com uma ou mais dentre estas características: infecções uterinas, histórico familiar de perda auditiva infantil, nascimento com baixo peso, anomalias craniofaciais, meningite bacteriana, hiperbillirrubinemia grave, medicamentos ototóxicos, baixos valores de Apgar, ventilação mecânica com duração de 5 dias ou mais, quimioterapia e uma possível síndrome conhecida por estar associada com perda auditiva (JOINT COMMITTEE ON INFANT HEARING, 2007). Estas crianças, então, permanecem por um período em UTIN (Unidade de Tratamento Intensivo Neonatal). Segundo Câmara (1999) existem altos índices de perda auditiva nestas crianças, uma vez que na UTIN são usadas drogas ototóxicas para terapêutica ou profilaxia. Alguns exemplos destas drogas são a gentamicina, ampicacina, kanamicina, entre muitas outras.

A surdez bilateral profunda se eleva de 1 a 2 em 1000 recém nascidos para 20 a 40 em 1000 se forem consideradas as crianças internadas em UTIN. Os números se elevam muito mais se forem considerados os casos menos graves, de surdez unilateral ou de perda auditiva adquirida durante a infância (OLIVEIRA *et al.*, 2002).

Chapchap (1996) constatou prevalência de perda auditiva sensorineural em neonatos com permanência em UTIN e que tinham indicador de risco, de 4,4% e para os que não tinham indicador de risco, de 1,1%.

III. Causas e classificações da perda auditiva

A perda auditiva pode ser classificada de acordo com alguns critérios. Com relação à localização do defeito ela pode ser **condutiva** quando a anomalia afeta a orelha média ou externa; **neurossensorial** (perceptiva ou neural), quando a anomalia está situada entre os receptores da orelha interna e as regiões auditivas do cérebro; ou **mista**, quando envolve ambos os casos (Figura 1).

A perda auditiva pode ser **pré-lingual**, se estiver presente ao nascimento ou antes da aquisição da linguagem; ou **pós-lingual**, quando se apresenta após a aquisição da linguagem. Ainda classifica-se a surdez em **sindrômica** se está associada com outros sinais clínicos (como associada a malformações craniofaciais ou cervicais, displasias esqueléticas, anomalias cutâneas ou oculares, doenças neurológicas e disfunções renais ou metabólicas, entre outras) ou **não-sindrômica** se é a única anormalidade encontrada. Pode ainda ser classificada de acordo com o grau de perda: **leve**, correspondendo a perda de 27-40dB; **moderada** (41-55dB); **moderada a grave (ou severa)** (56-70dB); **grave (ou severa)** (71-90dB) e **profunda** (>90dB) (KALATZIS & PETIT, 1998), no entanto, esta classificação varia entre os autores.

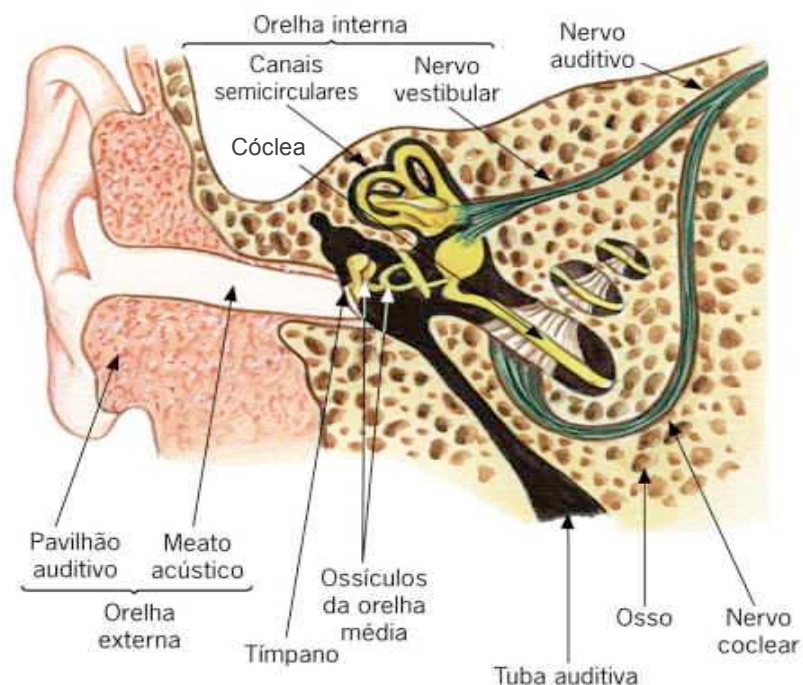


Figura 1 – Componentes das orelhas externa, média e interna. Modificado de <http://www.cabuloso.com/Anatomia-Humana>.

As causas da perda auditiva podem ser **genéticas** ou **ambientais**. Segundo Russo (2000) os principais fatores ambientais que contribuem para a perda auditiva, principalmente no Brasil, podem ser **pré-natais**: infecções da gestante (toxoplasmose, rubéola, citomegalovírus, etc) ou uso de medicamentos pela gestante; **peri-natais**: tocotraumatismo, icterícia, anóxia, etc; **pós-natais**: meningite, sarampo, caxumba além do uso de medicamentos ototóxicos.

Em países desenvolvidos, estima-se que cerca de 60% dos casos de surdez pré-lingual tenham bases genéticas. Além disso, 1 criança em 1000 torna-se surda após a aquisição da linguagem, ou seja, no período pós-lingual, forma de surdez que freqüentemente é progressiva. (CARRASQUILLO *et al.*, 1997; KALATZIS & PETIT, 1998). No entanto, infecções como a meningite podem levar à perda auditiva pós-lingual e subitamente.

IV. Genética da perda auditiva

O estudo das causas genéticas da perda auditiva avançou significativamente nos últimos anos, e nesse período vários genes relacionados a essa manifestação clínica têm sido identificados.

Estima-se que 30% dos casos genéticos de surdez pré-lingual sejam síndrômicos e 70% não-síndrômicos. A surdez não-sindrômica é quase exclusivamente monogênica e altamente heterogênea. Mais de 50 genes estão envolvidos na perda auditiva não-sindrômica (HEREDITY HEARING LOSS HOMEPAGE, 2008). Esta pode se apresentar em vários padrões de herança: ligadas ao cromossomo X em 1-3% dos casos; mitocondrial em cerca de 2%; em formas autossômicas dominantes (DFNA) em 15% e em formas autossômicas recessivas (DFNB) em 80% (KALATZIS & PETIT, 1998).

Um dos maiores empecilhos na localização de genes envolvidos na perda auditiva é a dificuldade de manuseio da cóclea e das demais estruturas da orelha interna. A construção de um banco de cDNA de material coclear fetal possibilitou o endereçamento de genes candidatos por uma abordagem tecido específica (ROBERTSON *et al.*, 1994; WILCOX *et al.*, 1992).

A cóclea é um dos órgãos mais complexos do ser humano. Como responsável pela audição, esta utiliza aproximadamente 16.000 células sensoriais ciliadas que dependem, para seu bom funcionamento, entre outros eventos, de despolarização da membrana celular, transdução mecanoelétrica, liberação da transmissão e transporte de íons (AVRAHAN, 1997; VAN CAMP *et al.*, 1997), assim como da repolarização da célula para que esta esteja apta a receber novos estímulos. Esta repolarização se dá pela ação das proteínas conexinas (Cx).

1. As proteínas conexinas

Quase todas as células de mamíferos se comunicam diretamente com suas células vizinhas através de junções comunicantes, ou *gap junctions*. Estas

junções são compostas por estruturas oligoméricas conhecidas como conéxons (formadas por proteínas chamadas conexinas), os quais compõem os canais que atravessam as duas membranas plasmáticas e estão alinhados formando uma passagem estreita que permite o movimento de íons inorgânicos e pequenas moléculas solúveis em água (peso molecular de até 1000 dáltons) no citoplasma de uma célula ao citoplasma da célula adjacente (Figura 2). Desta forma cria-se um acoplamento elétrico e metabólico entre as células (ALBERTS *et al.*, 1998) o qual é crucial para a homeostase dos tecidos, crescimento e diferenciação celulares, e para a resposta a estímulos (WILLECKE *et al.*, 2002).

Alguns tipos de proteínas conexinas apresentam maior expressão em determinadas células ou tecidos do que outras. Na epiderme e em seus anexos, nos epitélios da orelha interna e da córnea e em outros epitélios derivados do ectoderma, encontram-se cerca de dez conexinas diferentes, que são expressas durante o mesmo período de desenvolvimento embrionário e diferenciação epitelial. Um hemicanal do conéxon pode ser formado por diferentes tipos de conexinas e quando isto ocorre ele é chamado de **heteromérico**. Quando é formado por apenas um tipo de conexina chama-se **homomérico**. Além disto, estes hemicanais que se unem para formar um canal podem ser idênticos entre si, sendo chamados então de **homotípicos**, quando não, são chamados de **heterotípicos**. (DI *et al.*, 2001; FORGE *et al.*, 2002) (figura 2).

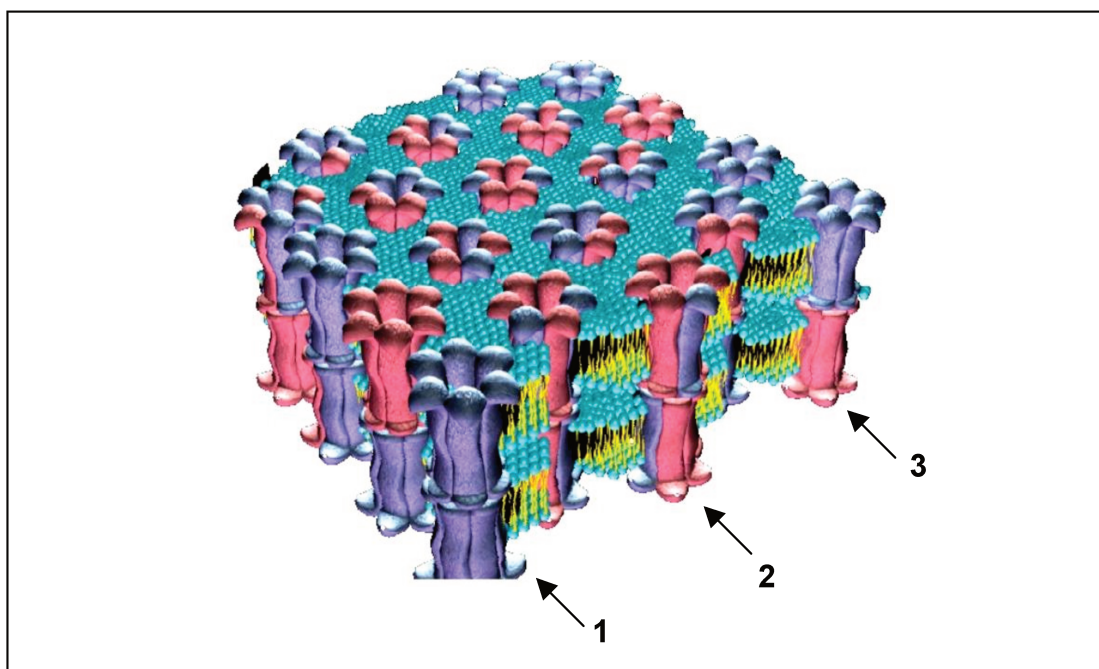


Figura 2 – Posicionamento dos conéxons nas células mostrando a organização das conexinas. A seta 1 exemplifica um canal homomérico e homotípico. A seta 2 exemplifica um canal heteromérico e heterotípico. A seta 3 exemplifica um canal homomérico e heterotípico. Modificado de Korkiamäki, 2002.

Mutações em genes de conexinas representam a principal causa de perda auditiva de origem genética. Podem determinar a perda apresentando um padrão de herança autossômica recessiva (**GJB2** e **GJB3**), autossômica dominante (**GJB2**, **GJB3** e **GJB6**) ou mesmo ligada ao cromossomo X (**GJB1**). Além disso, mutações nestes genes são responsáveis tanto por perda auditiva exibindo formas sindrômicas (**GJB2**, queratoderma palmoplantar; **GJB3**, eritrodermia *variabilis*; e **GJB1**, neuropatia periférica), quanto não-sindrômicas (**GJB2**, **GJB3** e **GJB6**) (RABIONET *et al.*, 2000). A inability de outras conexinas em compensar a perda da função da conexina mutada é uma característica dos distúrbios relacionados a defeitos nessas proteínas, e pode

representar uma necessidade entre a homeostasia dos tecidos e a comunicação celular mediada pelas *gap junctions* (GERIDO & WHITE, 2004).

As mudanças ocorridas no sistema *gap junction* devem interferir na reciclagem de potássio durante a transdução auditiva, resultando em falta de funcionamento das células ciliadas e distúrbio do potencial elétrico endococlear, ou ainda na sobrevivência das células sensoriais do epitélio coclear (KIKUCHI *et al.*, 1995).

A cóclea é o órgão que abriga as células sensoriais ciliadas responsáveis pela transdução das ondas sonoras em impulsos elétricos. Os estereocílios que estão presentes na superfície dessas células projetam-se na cavidade preenchida com um fluido chamado endolinfa. Quando o estímulo sonoro alcança a orelha interna, ocorre a deflexão dos estereocílios causando a abertura dos canais de potássio. A concentração de cátions na endolinfa é balanceada, de modo que a concentração de íons K^+ é alta e a de Na^+ é baixa. Os íons potássio fluem através da endolinfa e entram pelas células ciliadas, despolarizando as membranas celulares e iniciando os sinais elétricos que são propagados ao longo do nervo auditivo para o cérebro.

Dessa forma, após o estímulo sonoro, as células ciliadas ficam hiperpolarizadas, com alta concentração de potássio intracelular. Para que nova excitação das células seja possível, as mesmas têm que ser repolarizadas, e isso ocorre pela renovação do potássio do interior do citoplasma para as células de sustentação da cóclea, através de canais de potássio, situados na superfície basolateral das células ciliadas, regulados pelo gene *KCNQ4* (OLIVEIRA, 1994; KIKUCHI *et al.*, 2000).

Os íons potássio se difundem então, passivamente, pelas células de sustentação, pelos fibrócitos do ligamento espiral até a estria vascular e pelos fibrócitos do limbo espiral para as células interdentais, atingindo a endolinfa por meio das junções comunicantes (**conéxons**) (ALBERTS *et al.*, 1998) (figura 3).

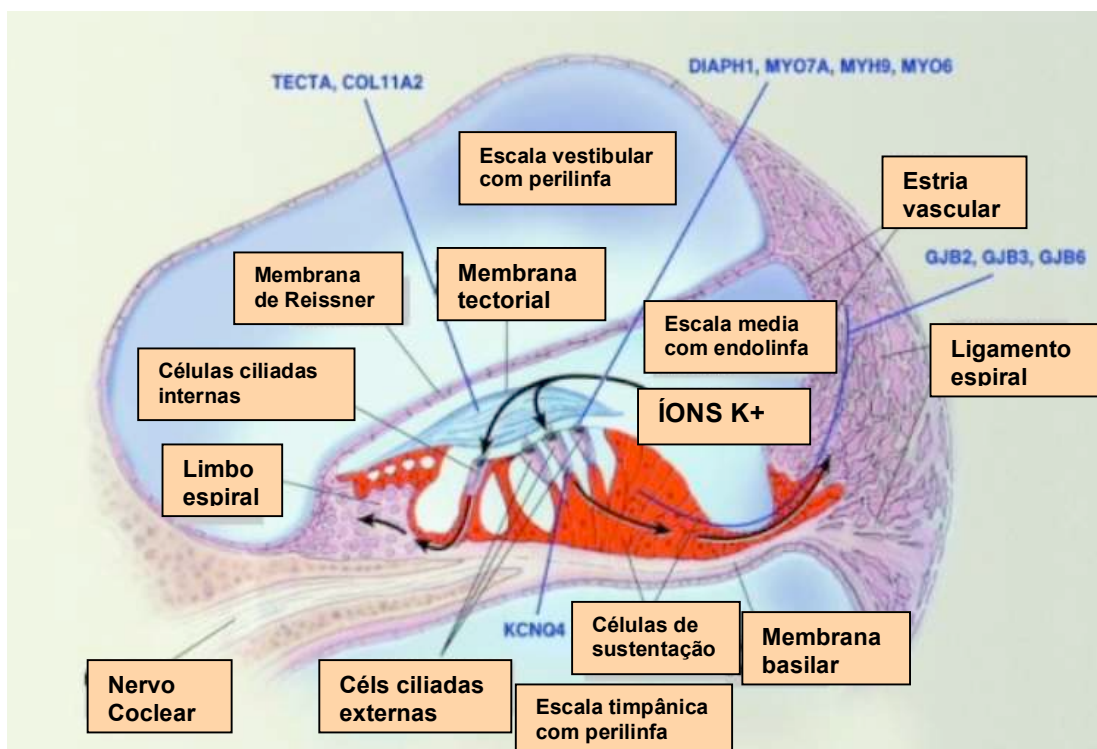


Figura 3 – Transporte e reciclagem de íons K^+ na cóclea. As setas pretas indicam o caminho feito pelos íons potássio (K^+) a partir de um estímulo sonoro. Figura modificada do site www.susmedicos.com.

1.1. **GJB2: O gene que codifica a proteína conexina 26 (Cx26)**

O gene **GJB2** foi o primeiro a ser identificado como envolvido na surdez neurossensorial não-sindrômica de padrão autossômico recessivo. Está localizado no cromossomo 13q11-q12, no *locus* DFNB1. A região codificante do gene da conexina 26 contém um único éxon de aproximadamente 682 nucleotídeos (*Gen Bank*, número de acesso: M86849). Hoje sabe-se que esse gene está envolvido em 80% dos casos de surdez de herança autossômica recessiva, e que mutações no gene da conexina 26 também podem determinar perda auditiva com padrão dominante de herança (DENOYELLE *et al.*, 1997). Acredita-se que mutações no gene da conexina 26 sejam responsáveis por 10 a 20% de todas as perdas auditivas neurossensoriais (WILCOX *et al.*, 2000).

1.1.1. A mutação 35delG

Antigamente chamada de 30delG, a mutação **35delG** é a deleção de uma guanina (G) na posição 35 do gene **GJB2**. Essa deleção leva à alteração no quadro de leitura de aminoácidos, provocando o aparecimento de um códon prematuro de terminação no aminoácido 13 da proteína Cx26 (DENOYELLE *et al.*, 1997; ZELANTE *et al.*, 1997). Deste modo, não há a formação correta da proteína e consequentemente há um prejuízo na formação dos conéxons, gerando o fenótipo da surdez.

A comprovação de que mutações no gene da conexina 26 (**GJB2**) estão envolvidas em 80% dos casos de surdez pré-lingual não-sindrômica de herança autossômica recessiva mudou as perspectivas do aconselhamento genético nessa área, principalmente considerando-se o fato de que a mutação **35delG** pode estar presente em até 70-80% dos casos em que esse gene está envolvido (DENOYELLE *et al.*, 1997; ZELANTE *et al.*, 1997; ESTIVILL *et al.*, 1998; KELLEY *et al.*, 1998). Como é o caso dos alelos mutados no Sul e Norte da Europa, assim como na população caucasóide americana, com uma frequência de portadores que varia de 2.3% a 4% (Roux *et al.*, 2004).

Os primeiros estudos no Brasil mostraram que a frequência de heterozigotos em uma amostra de recém-nascidos era de 0,97% (SARTORATO *et al.*, 2000). Estudos posteriores mostraram que entre 100 brasileiros caucasóides dois eram heterozigotos, resultando na frequência de 2%; entre brasileiros de descendência africana, a frequência foi de 1% , não sendo observada em brasileiros de origem asiática (OLIVEIRA *et al.*, 2004). Em 2007, Oliveira *et al.* rastrearam a mutação 35delG em recém nascidos de 10 cidades brasileiras, em diferentes regiões. A mutação foi encontrada em 25 indivíduos (1,35%), mostrando uma frequência de 1:74, sendo 1:47 no norte; 1:64 no sudeste; 1:85 no Sul; e 1:124 no nordeste.

1.1.2. Outras mutações no gene **GJB2**

Além da mutação 35delG, mais de 100 mutações no gene **GJB2** estão envolvidas no fenótipo de surdez. A mutação **35delG** é comum em populações brancas européias (ZELANTE *et al.*, 1997; DENOYELLE *et al.*, 1997), entretanto, em outras populações mutações diferentes são predominantes, como o caso da alta frequência da mutação **167delT** entre judeus Ashkenazitas, a **R143W** em africanos e a **235delC** em asiáticos (MOREL *et al.*, 1998; MARTIN *et al.*, 1999; PARK *et al.*, 2000).

Dentre as inúmeras mutações no gene **GJB2**, a mutação **V37I**, descrita por Kelley e colaboradores em 1998, foi, a princípio considerada como um polimorfismo neutro, não relacionado ao fenótipo de surdez, uma vez que, foi encontrado somente em um controle não afetado (KELLEY *et al.*, 1998). Posteriormente, Oliveira e colaboradores reportaram 2 casos com perda auditiva com as mutações V37I/V95M no Brasil e sugeriram se tratar de uma mutação autossômica de herança recessiva, ligada à surdez. (OLIVEIRA *et al.*, 1999). Rabionet e colaboradores em 2000 encontraram esta mutação em homozigose em um indivíduo, chegando assim à mesma conclusão (RABIONET *et al.*, 2000).

A partir da descoberta, identificação e clonagem do gene **GJB2**, muitos outros genes envolvidos no fenótipo da surdez neurossensorial não-sindrômica foram localizados e estão sendo estudados, como o gene **GJB6**, gene que codifica a proteína conexina 30 (Cx30).

1.2. **GJB6**: O gene que codifica a proteína conexina 30

O gene **GJB6** codifica a proteína conexina 30 e está localizado no mesmo *locus* do gene **GJB2** (DFNB1), na região cromossômica 13q12.

Uma das maiores dificuldades quando se trata do aconselhamento genético de indivíduos portadores de mutações no gene da conexina 26 é o fato de que em aproximadamente 10 a 50% dos casos de mutações no gene da conexina 26 são detectadas em apenas um dos alelos, tornando o aconselhamento genético dessas famílias extremamente problemático.

Entretanto, recentemente parte deste problema foi esclarecido. Foram encontradas duas deleções também situadas no *locus* DFNB1 (13q12), que se estendem à região proximal do gene **GJB2** indo até parte do gene que codifica a proteína conexina 30 (**GJB6**). Estas deleções foram denominadas **Δ (GJB6-D13S1830)** e **Δ (GJB6-D13S1854)** e referem-se à perda de 342 Kb e 232 Kb, respectivamente (DEL CASTILLO *et al.*, 2005).

1.2.1. As deleções **Δ (GJB6-D13S1830)** e **Δ (GJB6-D13S1854)**

As deleções **Δ (GJB6-D13S1830)** e **Δ (GJB6-D13S1854)** resultam no gene **GJB6** defectivo e conseqüente prejuízo na tradução da proteína conexina 30. São mutações autossômicas recessivas. Estas deleções podem ocorrer tanto em homozigose como em heterozigose juntamente com mutações do **GJB2**, sugerindo possível herança digênica na surdez neurosensorial não-sindrômica, sendo esta idéia suportada pelo fato de que Cx26 e Cx30 são expressas nas mesmas estruturas da orelha interna (LAUTERMANN *et al.*, 1998), além dos canais heterotípicos formados por eles (DAHL *et al.*, 1996). Desta forma ocorreria uma redução do número de hemicanais heteroméricos e heterotípicos formados pelas Cx26 e Cx30 (XIA *et al.*, 2001; FORGE *et al.*, 2002).

Em 2005, Del Castillo e colaboradores propuseram ainda outra hipótese: que estas deleções removeriam elementos cis afetando a expressão do gene **GJB2**.

Em um estudo multicêntrico, publicado em 2003 por Del Castillo e colaboradores, constatou-se que **Δ (GJB6-D13S1830)** é mais freqüente na Espanha, França, Reino Unido, Israel e Brasil (correspondendo a 7,1% de todos os alelos DFNB1 pesquisados no Brasil). Esta freqüência é menor na Bélgica e na Austrália (1,3 a 1,4%).

Em outro trabalho multicêntrico de Del Castillo e colaboradores de 2005, encontrou-se no Brasil 6,3% de indivíduos com mutações em heterozigose no **GJB2** e também com a deleção **Δ (GJB6-D13S1854)** no gene **GJB6**.

2. As mitocôndrias

Além de genes nucleares, mutações no DNA mitocondrial (mtDNA) estão também relacionados aos casos de surdez sindrômica e não-sindrômica. Como as mitocôndrias são responsáveis pela fosforilação oxidativa, que é o sistema primário de produção de energia (ATP) em todas as células eucarióticas, a disfunção mitocondrial tem efeitos pleiotrópicos (KOKOTAS, *et al.*, 2007). Além da fosforilação oxidativa, as mitocôndrias desempenham um papel importante na vida e morte celular (apoptose), além do controle do estresse oxidativo.

2.1. O DNA mitocondrial

As mitocôndrias possuem DNA próprio, e cada célula contém centenas de mitocôndrias com 2-10 moléculas de DNA cada. Seu genoma tem 2 funções principais: (1) codificar algumas das proteínas que constituem o sistema de fosforilação oxidativa e (2) codificar tRNA, rRNA e algumas proteínas usadas na síntese das proteínas mitocondriais (Griffiths *et al.*, 2002).

O genoma mitocondrial tem 16.569 pares de base (pb) (figura 4), e como cerca de 90pb são considerados como parte de região intercistrônica, não há íntrons. Contém 37 genes que codificam dois tipos de rRNA, 13 polipeptídeos relacionados à cadeia respiratória e 22 tipos de tRNA (JOHNS, 1995).

Mutações em genes mitocondriais têm sido implicadas em uma grande variedade de doenças. Muitas mutações no DNA mitocondrial podem levar a alterações multissistêmicas, tais como síndromes de Kearns-Sayre, NARP, MELAS e MERRF, que podem apresentar a perda auditiva. Mutações mitocondriais podem ainda levar o indivíduo a apresentar somente perda auditiva como sinal clínico (surdez não-sindrômica). Essas mutações têm um padrão de herança não mendeliana (herança materna).

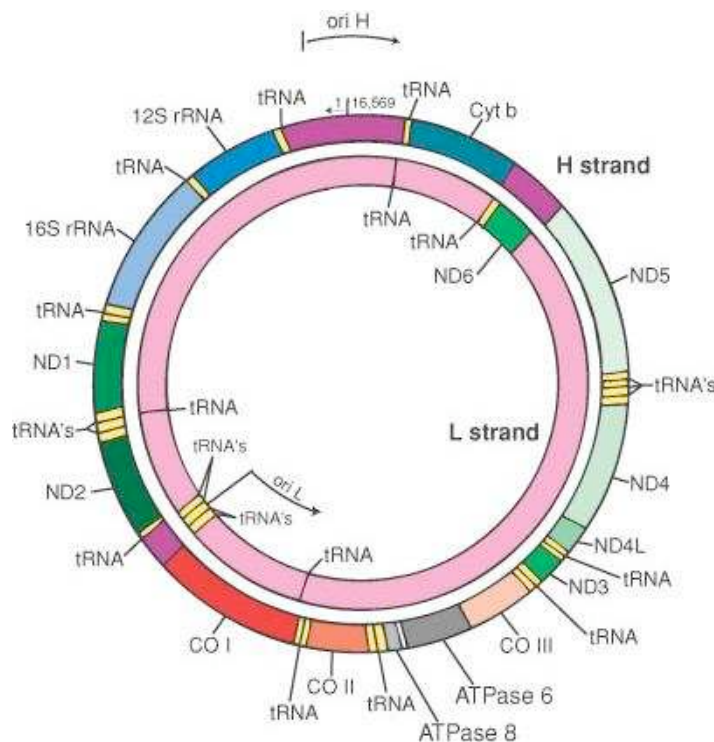


Figura 4 – DNA mitocondrial e localização dos genes. Modificado de www.mercksource.com

Uma célula normal possui apenas um tipo de mtDNA e é assim chamada de **homoplásmica**. As mutações patogênicas são geralmente **heteroplásmicas**, enquanto polimorfismos neutros no mtDNA são **homoplásmicos**. Somente algumas alterações são causadas por mutações em homoplasmia: a neuropatia óptica hereditária de Leber (LHON) e a surdez não-sindrômica, por causa da mutação **A1555G** (ROSSIGNOL *et al.*, 2003).

Na população caucasiana, pelo menos 5% das perdas auditivas pós-linguais não-sindrômicas são causadas por mutações mitocondriais conhecidas, representando a causa mais freqüente de perda auditiva depois da mutação 35delG, no gene **GJB2**, codificador da conexina 26 (KOKOTAS *et al.*, 2007).

2.2. A ototoxicidade dos aminoglicosídeos

Os aminoglicosídeos são drogas conhecidas por sua ação bactericida no sítio de decodificação da unidade pequena do ribossomo, causando perda de sentido ou terminos prematuros na síntese de proteínas das bactérias (CHAMBER *et al.* 1996).

Estes fármacos, principalmente a gentamicina e a ampicacina, são amplamente utilizados para tratamento de infecções em recém-nascidos, com objetivo terapêutico e profilático, proporcionando um decréscimo na mortalidade perinatal, resultado do incremento nos cuidados neonatais, aumentando a sobrevivência de crianças nascidas com baixo peso e muito baixo peso, porém aumentando a possibilidade de seqüelas, entre as quais a auditiva. O potencial tóxico dos aminoglicosídeos foi explicado pela tendência cumulativa no líquido linfático da orelha interna. A toxicidade acontece no momento em que a droga é administrada e persiste.

O tempo de utilização do fármaco, sua forma de administração e dosagem, apresentam influência na instalação do efeito lesivo (perda auditiva sensorineural), sendo que, quanto maior a dosagem, o tempo de utilização e quanto mais rápida a ação do medicamento, maiores as chances da perda auditiva.

Muitas vezes, indivíduos que adquirem perda auditiva após o uso de aminoglicosídeos não tem história de uso de grandes quantidades de aminoglicosídeos, sugerindo haver uma susceptibilidade genética. Sabe-se que a presença de determinadas mutações associadas ao uso destes medicamentos, aumentam a chance da perda.

Algumas mutações no gene **MT-RNR1**, que transcreve o 12S rRNA (**961delT/insC**, **T1095C**, **C1494T**, **A1555G** e possivelmente **A827G**, **T1005C** e **A1116G**) e a mutação **G7444A** nos gene **CO1/tRNA^{SER(UCN)}** podem contribuir para a perda auditiva, pelo uso de aminoglicosídeos (LI *et al.*, 2005).

Os aminoglicosídeos ocasionam uma significativa redução nas EOAs (emissões otoacústicas) nos indivíduos que perderam a audição. A administração combinada de aminoglicosídeos e diuréticos de alça causa

redução das EOAPDs (emissões otoacústicas por produto de distorção) em todos os níveis de estímulos em respostas auditivas de animais (LONSBURY-MARTIN *et al.*, 2001).

2.3. Genes mitocondriais e mutações

2.3.1. Gene *MT-RNR1* (ou gene *12S rRNA*)

O gene **12S rRNA** transcreve a subunidade 12S do rRNA. Diferentes mutações neste gene podem causar surdez não-sindrômica de herança materna, o que em muitos casos é induzida ou agravada pelo uso de aminoglicosídeos.

2.3.1.1. A Mutação **A1555G**

A mutação **A1555G** do gene ribossomal **12S rRNA** é a troca de uma adenina (A) por uma guanina (G) na posição 1555. Ela foi a primeira alteração molecular identificada como causa de surdez não-sindrômica. Esta mutação foi descrita em 1993 em uma grande família árabe-israelita (PREZANT *et al.*, 1993). A mutação **A1555G** pode predispor indivíduos à surdez pelo uso de medicamentos aminoglicosídeos e estão associadas à surdez não-sindrômica na maioria dos casos (ESTIVILL *et al.*, 1998; USAMI, 1997). Ela está presente em 0.5-1% de caucasianos (KUPKA *et al.*, 2002 e LI *et al.*, 2004) com perda auditiva e uma prevalência ainda maior foi descrita entre espanhóis (DEL CASTILLO *et al.*, 2003) e asiáticos (USAMI, *et al.*, 2000). Esta mutação tem sido reportada em muitas famílias com herança materna de surdez neurossensorial não-sindrômica e também em indivíduos que usaram aminoglicosídeos.

Esta mutação altera a estrutura secundária da molécula 12S rRNA, tornando-o mais semelhante à molécula 16S rRNA da *Escherichia coli* e aumentando a susceptibilidade ao aminoglicosídeo (figura 5). Em 1993, HUTCHIN e colaboradores propuseram que esta mutação aumenta a força de ligação do

aminoglicosídeo. A mutação causa perda auditiva após o tratamento com aminoglicosídeos a concentrações que normalmente não afetariam a audição.

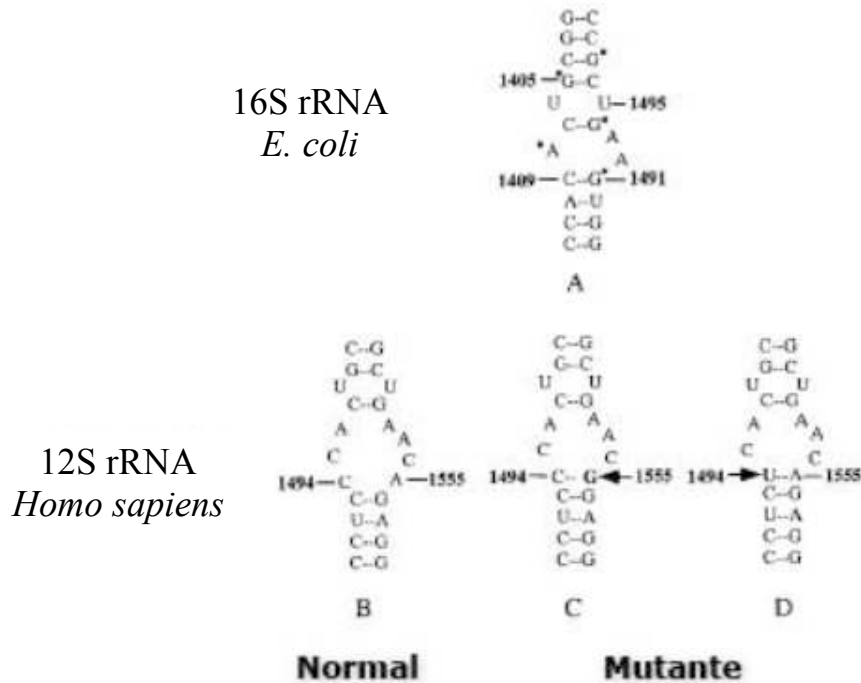


Figura 5 – Comparação de região do gene **12S rRNA**, onde se encontram as mutações A1555G e C1494T e a região do gene 16S rRNA da bactéria *E. coli*. Modificado de ZHAO *et al.*, 2005.

A mutação **A1555G**, assim como outras mutações mitocondriais, pode ser modulada por genes nucleares modificadores, além do uso de aminoglicosídeos. Isto explicaria parte da expressividade e penetrância variáveis dentro de uma mesma família com esta mutação.

Na maior parte dos casos de surdez não-sindrômica associada com esta mutação, esta se apresenta no estado de homoplasmia, no entanto, em 1997, el-Schahawi e colaboradores descreveram uma família com a mutação A1555G em heteroplasmia, associada à surdez (EL-SCHAHAWI, M. *et al*, 1997).

Apesar das mutações mitocondriais aparentemente não serem tão freqüentes no Brasil, Abreu e Silva *et al.* encontraram uma freqüência de 2% da mutação mitocondrial **A1555G** em indivíduos brasileiros surdos, freqüência esta, semelhante à da Europa (ABREU-SILVA *et al.*, 2006). Se for considerada a administração de aminoglicosídeos a recém-nascidos de alto-risco, somada à sugerida susceptibilidade à perda auditiva, o rastreamento torna-se de grande relevância nessas situações.

2.3.1.2. A Mutação C1494T

A mutação **C1494T** é a troca de uma citosina (C) por uma timina (T) na posição 1494 do gene **12S rRNA**. Ela foi encontrada em uma família Chinesa grande (ZHAO *et al.*, 2004) e em 3 famílias espanholas (RODRIGUEZ-BALLESTEROS *et al.*, 2006) com surdez não-sindrômica. A penetrância foi incompleta, porém mais alta quando os indivíduos tiveram exposição a aminoglicosídeos. A mutação fica na mesma região conservada codificadora do **12S rRNA** e é estruturalmente equivalente à mutação **A1555G**. Ela também parece ser modulada pelo uso de aminoglicosídeos, pelo mesmo mecanismo da mutação A1555G (figura 5).

2.3.1.3. A Mutação 961delT/insC

Esta mutação é uma deleção de uma única timina (T) , com uma inserção de um número variável de citosinas (C) no gene **12S rRNA**. Esta mutação foi encontrada em casos esporádicos em indivíduos chineses (BACINO *et al.*, 1995) e duas famílias italianas com ototoxicidade por aminoglicosídeos (FISCHEL-GHODSIAN, 1999 & CASANO *et al.*, 1999). Em um estudo recente, Kobayashi *et al.*, 2005, encontraram uma freqüência de 2% entre indivíduos com perda auditiva neurossensorial, aumentando a possibilidade de uma freqüência relativamente alta desta mutação entre populações com perda auditiva.

2.3.1.4. A Mutação T961G

Esta mutação é a troca de uma timina (T) por uma guanina (G) na posição 961 do gene **12S rRNA**. Ela foi encontrada na forma homoplásmica em 5 crianças com surdez neurossensorial não-sindrômica, em famílias diferentes americanas (Tang *et al.*, 2002).

2.3.1.5. A Mutação A827G

Esta mutação foi descrita por Li *et al.*, em 2005 e por Xing *et al.*, em 2006. Ela está localizada no sítio A do gene **12S rRNA** mitocondrial, altamente conservado evolutivamente em mamíferos e é a troca de uma adenina (A) por uma guanina (G) na posição 827 do gene. A ocorrência da mutação **A827G** nos chineses sugeriu que esta mutação está envolvida com a perda auditiva. No entanto, também se constatou que a mutação **A827G** sozinha não é suficiente para levar o indivíduo à perda auditiva, pois houve apenas 43.5% de penetrância nestas famílias chinesas (XING *et al.*, 2006). Ou seja, ela parece depender de fatores modificadores para a expressão deste fenótipo, como diferentes haplótipos, genes nucleares modificadores ou aminoglicosídeos.

2.3.2. Gene **MT-TS1** (ou gene **tRNA^{Ser(UCN)}**)

Este gene transcreve o tRNA^{Ser(UCN)} e foi detectado em associação com a perda auditiva neurossensorial em famílias de várias regiões e descendências diferentes. Cinco mutações associadas à surdez não sindrômica foram identificadas neste gene: **G7444A**, **A7445G**, **7472insC**, **T7510C**, **T7511C**.

2.3.2.1. A Mutação **A7445G** nos genes **CO1/tRNA^{Ser(UCN)}**

A mutação **A7445G** é uma troca de uma adenina (A) por uma guanina (G) na posição 7445 do gene **tRNA^{Ser(UCN)}**. Foi primeiramente detectada em uma família de descendência escocesa e mais tarde também encontrada em famílias

de Nova Zelândia, Japão, França, Ucrânia, Portugal e Hungria (Reid *et al.*, 1994; FISCHER-GHODSIAN *et al.*, 1995; SEVIER *et al.*, 1998; Martin *et al.*, 2000; Hutchin *et al.*, 2001; Caria *et al.*, 2005).

A perda auditiva em algumas destas famílias era não-sindrômica, mas em alguns casos estava associada à queratodermia palmoplantar. Esta mutação estava presente nas famílias em homoplasmia, heteroplasmia ou em formas combinadas de homo e heteroplasmia. A penetrância também variou bastante (MARTIN *et al.*, 2000).

A mutação A7445G esta localizada no *stop* códon (AGA) do mRNA que codifica o citocromo C oxidase (CO1), na fita pesada H. Porém, como o *stop* códon AGA normal é mutado para um *stop* códon AGG, a mutação A7445G não tem efeito na expressão da CO1. A posição 7445 flanqueia a região terminal 3' mas não faz parte do gene *tRNA*^{Ser(UCN)} localizado na fita leve L. A mutação deixa a estrutura do tRNA intacta, mas afeta a taxa do processamento do precursor do tRNA, resultando em uma redução no nível de tRNA (KOKOTAS *et al.*, 2007).

2.3.2.2. A Mutação G7444A nos genes CO1/*tRNA*^{Ser(UCN)}

A mutação **G7444A** é uma troca de uma guanina (G) por uma adenina (A) na posição 7444 do gene CO1, precursor do *tRNA*^{Ser(UCN)}. Foi primeiramente descrita por Yuan e colaboradores em 2005, como uma co-segregação com a mutação A1555G em alguns membros de uma família chinesa com perda auditiva, induzida pelo uso de aminoglicosídeos. Em 2006, Zhu e colaboradores também rastrearam a mutação **G7444A** em 2 famílias chinesas e concluíram que ela pode ser modulada pelo uso de aminoglicosídeos.

A mutação G7444A resulta em uma leitura errada do *stop* códon AGA da mensagem CO1 da fita H do mtDNA, adicionando três aminoácidos (Lys-Gln-Lys) a região C terminal do polipeptídeo (PANDYA *et al.*, 1999; YUAN *et al.*, 2005). Porém, o polipeptídeo mutado pode permanecer parcialmente funcional. Alternativamente, a mutação G7444A é adjacente ao sitio terminal 3' do

processo endonucleolítico da fita L do RNA precursor, transpondo o tRNA^{Ser(UCN)} e o mRNA ND6, reduzindo a quantidade destes (LEVINGER *et al.*, 2004; GUAN *et al.*, 1998).

3. Triagem auditiva neonatal

Os testes audiológicos associados às técnicas de biologia molecular podem gerar resultados rápidos e mais precisos, além de aumentarem a possibilidade de se descobrir a etiologia da perda. Desta forma, o indivíduo poderá receber o acompanhamento necessário precocemente, de modo que seu desenvolvimento educacional, psicológico e social seja otimizado. Segundo Ruben (1993) a demora entre a suspeita e o diagnóstico da perda auditiva diminui irremediavelmente as possibilidades de tratamento e reabilitação dessas crianças, pois se a intervenção não ocorrer precocemente haverá danos na área da comunicação com significativa morbididade, que pode se manifestar no prejuízo das atividades sociais e perda de oportunidades profissionais.

O rastreamento das mutações mais frequentes é importante porque pode proporcionar o aconselhamento genético para a família, assim como o tratamento precoce adequado, e, conseqüentemente, melhorar chances de desenvolvimento da fala e linguagem. Uma única gota de sangue, na ocasião do teste do pezinho, é suficiente para rastrear muitas das mutações descritas anteriormente.

O presente estudo teve como objetivos apontar os principais fatores que ocasionam a perda auditiva em recém-nascidos de alto-risco, e a necessidade de testes genéticos associados aos testes audiológicos.

OBJETIVOS

I – Objetivos Gerais

Investigação da etiologia da perda auditiva em recém-nascidos de alto risco.

II – Objetivos Específicos

a) Rastrear e estabelecer a frequência das seguintes mutações:

- **35delG** no gene **GJB2**;
- **A1555G**, **C1494T**, **A827G**, **T961G** e **961delT/insC** no gene mitocondrial **MT-RNR1 (12S rRNA)**;
- **G7444A** e **A7445G** nos genes mitocondriais **COI/MT-TS1 (tRNA^{ser(UCN)})**;
- **Δ(GJB6-D13S1830)** e **Δ(GJB6-D13S1854)** no gene **GJB6**;
- Outras mutações no gene **GJB2**, nos indivíduos normais para as mutações anteriores ou heterozigotos para **35delG** ou heterozigotos para as deleções do gene **GJB6**.

b) Investigar a participação de fatores ambientais:

Análise dos resultados genéticos e investigação de fatores ambientais, focando o uso de aminoglicosídeos e outros medicamentos, na tentativa de se estabelecer uma possível etiologia.

MATERIAL E MÉTODOS

I – 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 Universidade de Fortaleza/CE (UNIFOR) (anexo 1), assim como ao Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP) (anexo 2).

Foram atendidos pelo Sistema Único de Saúde (SUS), 250 recém-nascidos prematuros (alto-risco), provenientes da Maternidade Escola Assis Chateaubriand (MEAC), da Universidade Federal do Ceará, do hospital César Cals e do Hospital Waldemar Alcântara, todos de Fortaleza, Ceará. Deste total, 25 apresentaram perda auditiva neurossensorial (formando o **Grupo A**).

Entre os 225 indivíduos ouvintes restantes, foram escolhidos 25 (**Grupo B**) baseando-se apenas no sexo e idade. Também fizeram parte desse estudo, 25 crianças, nascidas a termo e com perda auditiva congênita (**Grupo C**), e 25 crianças nascidas a termo e sem perda auditiva (**Grupo D**). Os quatro grupos foram atendidos pela clínica particular Fono Áudio Clínica (Fortaleza – CE).

II – Métodos

1. Etapas do Estudo

1.1 . Coletas de dados e exames auditivos

Foram feitas coletas de dados para a pesquisa, obtendo-se informações do prontuário, nos serviços de arquivo médico de cada hospital e com as mães ou responsáveis pela criança. Todos os testes audiológicos foram realizados na clínica particular Fono Áudio Clínica (Fortaleza/CE).

Na primeira etapa do estudo, logo após a alta hospitalar (dos grupos de alto-risco), além das coletas de dados, foi feita a triagem auditiva por emissões otoacústicas – produto de distorção, timpanometria, pesquisa do reflexo cócleo-palpebral e coleta de sangue para estudo genético.

Na segunda etapa do estudo, 3 meses após a alta hospitalar, foi realizada outra coleta de dados, a respeito das intercorrências neste período, triagem auditiva por emissões otoacústicas – produto de distorção, pesquisa do reflexo cócleo-palpebral e timpanometria.

Na terceira etapa do estudo, 6 meses após a alta, foi realizada mais uma coleta de dados quanto às intercorrências neste período, triagem auditiva por emissões otoacústicas – produto de distorção, pesquisa do reflexo cócleo-palpebral e audiometria com reforço visual. Nos casos com suspeita de perda auditiva foram realizados também o potencial evocado de tronco encefálico (estímulo acústico clique) e emissões otoacústicas por estímulos transientes.

Ao final destas etapas, também compareceram à clínica particular os 25 indivíduos do grupo C, além dos 25 indivíduos do grupo D. Estes indivíduos também passaram pela coleta de dados e informações úteis à pesquisa, além de serem submetidos aos exames audiológicos que comprovaram a perda auditiva neurossensorial e estabeleceram o grau de perda. Estes indivíduos tinham sexo e idade próximos aos grupos A e B.

1.2. Consentimento do Indivíduo

Para cada indivíduo foi assinado um termo de consentimento para participar das investigações, conforme a Declaração de Helsinque (anexo 3).

1.3. Obtenção do DNA

1.3.1 Extração do DNA genômico de sangue periférico

A extração do DNA genômico foi feita a partir de leucócitos obtidos em 10 a 15mL de sangue periférico coletado em tubos *Vacutainer* contendo EDTA 10%, de acordo com o método fenol-clorofórmio adaptado pelo laboratório de Genética Humana do CBMEG.

1.3.2. Extração do DNA genômico de esfregaço bucal

Para o grupo **D** de indivíduos foi feita a extração de DNA a partir de células da mucosa bucal dos indivíduos, conseguidas através do uso de uma haste (swab).

1.3.3. Rastreamento de mutações

Os exames moleculares foram realizados nos 4 grupos de indivíduos. Em todos os indivíduos onde alguma mutação foi observada, os pais foram convocados para exames moleculares e confirmação dos resultados, assim como para aconselhamento genético.

1.3.3.1. Rastreamento da mutação 35delG no gene *GJB2*

A partir do DNA extraído do sangue dos indivíduos, a mutação **35delG** foi analisada pela técnica de AS-PCR (*allele specific polymerase chain reaction* - reação em cadeia da polimerase alelo-específica) padronizada pelo laboratório.

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 ou MUT. Com essas duas reações (NOR e MUT) analisa-se cada indivíduo como sendo homozigoto normal para a mutação 35delG, homozigoto mutante para esta ou heterozigoto. E *primers* “A” e “B” foram usados como controles internos da amplificação.

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

1.3.3.2. Rastreamento da mutação A1555G no gene mitocondrial 12S *rRNA*

De cada indivíduo foi amplificada por PCR uma região do DNA mitocondrial de 2060pb que contém o nucleotídeo 1555.

O produto amplificado foi testado em gel de agarose 1,5% em tampão TBE 1x, corado com brometo de etídeo (na concentração final 0,5µg/mL) e, então, digerido com a enzima de restrição *BsmAI*, a 55°C por 2 horas, da seguinte forma: 17,5µL de produto de PCR; 2,0µL de tampão da enzima; 0,5µL da enzima *BsmA I* (5000U/µL) e visualizado sob luz ultravioleta.

Os produtos da digestão foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1,5% em tampão TBE 1x, corado com brometo de etídeo (na concentração final 0,5µg/mL) e visualizado sob luz ultravioleta. A sequência normal apresenta as bandas dos fragmentos de **1100, 516 e 444pb**, ao passo que na mutante perde-se um sítio de *BsmA I* apresentando fragmentos de **1616 e 444pb**.

1.3.3.3. Rastreamento da mutação C1494T no gene mitocondrial 12S *rRNA*

De cada indivíduo foi amplificada por PCR uma região do DNA mitocondrial de **441pb** que contém o nucleotídeo 1494. O produto amplificado foi testado em gel de agarose 1,5% em tampão TBE 1x, corado com brometo de etídeo (na concentração final 0,5µg/mL), então, digerido com a enzima de restrição *Hph I*, a 37° C por 2 horas, da seguinte forma: 17,5µL de produto de PCR; 2,0µL de tampão da enzima; 0,5µL da enzima *Hph I* (5000U/µL) e visualizado sob luz ultravioleta.

Os produtos da digestão foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1,5% em tampão TBE 1x, corado com brometo de etídeo (na concentração final 0,5µg/mL) e visualizado sob luz ultravioleta. A sequência normal apresenta as bandas dos fragmentos de **370 e 71pb**, ao passo que na

mutante há a perda de um sítio de *Hph* I apresentando apenas o fragmento de **441pb**.

1.3.3.4. Rastreamento das mutações **G7444A** e **A7445G** nos genes mitocondriais ***COI/tRNA^{SER(UCN)}***

De cada indivíduo foi amplificada por PCR uma região do DNA mitocondrial de **1822pb** que contém os nucleotídeos 7444 e 7445.

O produto amplificado foi testado em gel de agarose 1,5% em tampão TBE 1x, corado com brometo de etídeo (na concentração final 0,5µg/mL), então, digerido com a enzima de restrição *Xba* I, a 37°C por 2 horas, da seguinte forma: 17,5µL de produto de PCR, 2,0µL de tampão da enzima, 0,5µL da enzima *Xba* I (10.000U/µL) e visualizado sob luz ultravioleta.

Os produtos da digestão foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1,5% em tampão TBE 1x, corado com brometo de etídeo (na concentração final 0,5µg/mL) e visualizado sob luz ultravioleta. A seqüência normal apresenta as bandas dos fragmentos de **846**, **541** e **435pb**, ao passo que na mutante há a perda de um sítio de *Xba* I apresentando os fragmentos de **1387** e **435pb**. No caso de haver mutação, o indivíduo é submetido ao seqüenciamento automático para verificar qual das duas mutações está presente.

1.3.3.5. Rastreamento das deleções $\Delta(\textbf{GJB6-D13S1830})$ e $\Delta(\textbf{GJB6-D13S1854})$ no gene ***GJB6***

A estratégia de análise destas deleções foi previamente descrita por del Castillo e colaboradores (2005), que desenvolveu um único teste diagnóstico envolvendo as duas deleções em um mesmo PCR. O gene ***GJB6*** possui um éxon codificante com **786pb**.

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 das deleções. Um conjunto de três pares de *primers* resulta em dois produtos diferentes de amplificação de PCR: **333pb** referente controle; **460pb** e **564pb** relacionados às deleções $\Delta(GJB6-D13S1830)$ e $\Delta(GJB6-D13S1854)$, respectivamente.

O produto amplificado foi testado em gel de agarose 1,5% em tampão TBE 1x, corado com brometo de etídeo (na concentração final 0,5 μ g/mL) e visualizado sob luz ultravioleta.

1.3.3.6. Rastreamento de outras mutações no gene *GJB2* e das mutações A827G, T961G e 961delT/insC no gene mitocondrial 12S *rRNA*

O gene ***GJB2*** é composto por apenas um éxon codificante, que foi amplificado por PCR. Para esta reação foram usados 3 pares de *primers* de modo que o éxon fosse dividido em 3 regiões de amplificação, para que nenhum pedaço fosse perdido.

Para as mutações mitocondriais **A827G, T961G e 961delT/insC** foi amplificada também por PCR uma região do DNA mitocondrial de **800pb** que contém os nucleotídeos 827 e 961.

Os produtos amplificados do ***GJB2* e 12S *rRNA*** foram testados em gel de agarose 1,5% em tampão TBE 1x, corado com brometo de etídeo (na concentração final 0,5 μ g/mL) e visualizado sob luz ultravioleta, então, foram realizadas as reações de seqüenciamento diretamente dos produtos de PCR.

1.3.4. Reação de seqüenciamento automático

As reações de seqüenciamento foram realizadas utilizando-se o *BigDyeTM Terminator Cycle Sequencing Kit V2.0 Ready Reaction* (ABI PRISM/PE Biosystems) e, constituíram-se de:

40-80ng de DNA

3 μ L do *mix BigDye*

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

H₂O deionizada para completar 10 μ L.

1.3.5. Purificação dos produtos de PCR e seqüenciamento

As purificações foram feitas com o uso de isopropanol 75%, seguido de centrifugação por 30 minutos e descarte do sobrenadante. Em seguida, adicionou-se etanol 70% seguindo-se outra centrifugação por mais 10 minutos e descarte do sobrenadante. Depois de secas adicionou-se 3 μ L de Blue Dextran e foi feita a desnaturação a 95°C por 5 minutos. 1 μ L de cada amostra foi aplicado em 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, H₂O para completar 1 litro), no seqüenciador automático ABI PRISM™ 377 (*Perkin Elmer*), numa corrida de 4 horas.

1.3.6. Análise das seqüências obtidas

As seqüências obtidas foram analisadas e comparadas com a seqüência normal com o auxílio dos softwares Chromas e Gene Runner.

RESULTADOS

1 – Resumo dos resultados obtidos:

Os resultados das análises moleculares dos 100 indivíduos, pertencentes aos grupos A, B, C e D estão resumidos nas tabelas 1, 2, 3 e 4.

Tabela 1 – Resultados moleculares do grupo A

Nº/ sexo	GJB2		GJB6		Mutações mitocondriais				
	35delG	outras	Δ(GJB6-D13S1830)	Δ(GJB6-D13S1854)	A1555G	C1494T	A827	T961G	A7445G
1 M	N/N	N/N	N/N	N/N	N	N	N	N	N
2 M	N/N	V37I/N	N/N	N/N	N	N	N	N	N
3 F	N/N	N/N	N/N	N/N	N	N	N	N	N
4 M	N/N	N/N	N/N	N/N	N	N	N	N	N
5 M	N/N	N/N	N/N	N/N	N	N	N	N	N
6 M	N/N	N/N	N/N	N/N	N	N	N	N	N
7 M	N/N	N/N	N/N	N/N	N	N	M	N	N
8 M	N/N	N/N	N/N	N/N	N	N	N	N	N
9 F	N/N	N/N	N/N	N/N	N	N	N	N	N
10 F	N/N	N/N	N/N	N/N	N	N	N	N	N
11 M	N/N	N/N	N/N	N/N	N	N	N	N	N
12 M	N/N	N/N	N/N	N/N	N	N	N	N	N
13 M	N/N	N/N	N/N	N/N	N	N	N	N	N
14 M	N/N	N/N	N/N	N/N	N	N	N	N	N
15 M	N/N	N/N	N/N	N/N	N	N	N	N	N
16 F	N/N	V27I/V27I	N/N	N/N	N	N	N	N	N
17 F	N/N	N/N	N/N	N/N	N	N	N	N	N
18 M	N/N	N/N	N/N	N/N	N	N	N	N	N
19 F	N/N	N/N	N/N	N/N	N	N	N	N	N
20 M	N/N	N/N	N/N	N/N	N	N	M	N	N
21 M	N/N	N/N	N/N	N/N	N	N	N	N	N
22 F	N/N	N/N	N/N	N/N	N	N	N	N	N
23 M	N/N	N/N	N/N	N/N	N	N	N	N	N
24 F	N/N	N/N	N/N	N/N	N	N	N	N	N
25 M	N/N	N/N	N/N	N/N	N	N	N	N	N

N/N = Homozigoto normal**V27I/V27I** = Homozigoto para V27I**V37I/N** = Heterozigoto para V37I**N** = Normal**M** = Mutante

Tabela 2 – Resultados moleculares do grupo B

Nº/ sexo	GJB2		GJB6		Mutações mitocondriais				
	35delG	outras	Δ(GJB6-D13S1830)	Δ(GJB6-D13S1854)	A1555G	C1494T	A827	T961G	A7445G
1 M	N/N	V27I/N	N/N	N/N	N	N	N	N	N
2 M	N/N	N/N	N/N	N/N	N	N	N	N	N
3 M	N/N	N/N	N/N	N/N	N	N	M	N	N
4 F	N/N	N/N	N/N	N/N	N	N	N	N	N
5 F	N/N	N/N	N/N	N/N	N	N	N	N	N
6 F	N/N	N/N	N/N	N/N	N	N	N	N	N
7 M	N/N	N/N	N/N	N/N	N	N	M	N	N
8 M	N/N	N/N	N/N	N/N	N	N	N	N	N
9 F	N/N	N/N	N/N	N/N	N	N	N	N	N
10 M	N/N	N/N	N/N	N/N	N	N	N	N	N
11 M	N/N	N/N	N/N	N/N	N	N	N	N	N
12 M	N/N	V27I/N	N/N	N/N	N	N	N	N	N
13 M	N/N	N/N	N/N	N/N	N	N	N	N	N
14 F	N/N	N/N	N/N	N/N	N	N	N	N	N
15 M	N/N	N/N	N/N	N/N	N	N	N	N	N
16 M	N/N	V27I/N	N/N	N/N	N	N	N	N	N
17 M	N/N	N/N	N/N	N/N	N	N	N	N	N
18 M	N/N	N/N	N/N	N/N	N	N	N	N	N
19 M	N/N	N/N	N/N	N/N	N	N	N	N	N
20 F	N/N	N/N	N/N	N/N	N	N	M	N	N
21 F	N/N	N/N	N/N	N/N	N	N	N	N	N
22 F	N/N	N/N	N/N	N/N	N	N	N	N	N
23 M	N/N	N/N	N/N	N/N	N	N	N	N	N
24 M	N/N	N/N	N/N	N/N	N	N	N	N	N
25 M	N/N	N/N	N/N	N/N	N	N	N	N	N

N/N = Homozigoto normal

V27I/N = Heterozigoto para V27I

N = Normal

M = Mutante

Tabela 3 – Resultados moleculares do grupo C

Nº/ sexo	GJB2		GJB6		Mutações mitocondriais				
	35delG	outras	Δ(GJB6-D13S1830)	Δ(GJB6-D13S1854)	A1555G	C1494T	A827	T961G	A7445G
1 M	N/N	27I/N	N/N	N/N	N	N	N	N	N
2 F	N/N	N/N	N/N	N/N	N	N	M	N	N
3 M	N/N	N/N	N/N	N/N	N	N	M	N	N
4 F	N/N	N/N	N/N	N/N	N	N	N	N	N
5 M	N/N	N/N	N/N	N/N	N	N	N	N	N
6 F	M/M	N/N	N/N	N/N	N	N	N	N	N
7 M	M/M	N/N	N/N	N/N	N	N	N	N	N
8 M	N/N	N/N	N/N	N/N	N	N	N	N	N
9 M	N/N	N/N	N/N	N/N	N	N	N	N	N
10 M	N/N	N/N	N/N	N/N	N	N	M	N	N
11 M	N/N	N/N	N/N	N/N	N	N	N	N	N
12 F	N/N	N/N	N/N	N/N	N	N	N	N	N
13 M	M/M	N/N	N/N	N/N	N	N	N	N	N
14 M	N/N	N/N	N/N	N/N	N	N	N	N	N
15 F	N/N	N/N	N/N	N/N	N	N	N	N	N
16 M	N/N	N/N	N/N	N/N	N	N	M	N	N
17 F	N/N	N/N	N/N	N/N	N	N	N	N	N
18 M	N/N	N/N	N/N	N/N	N	N	N	N	N
19 F	N/N	N/N	N/N	N/N	N	N	M	N	N
20 M	N/N	N/N	N/N	N/N	N	N	N	N	N
21 M	N/N	N/N	N/N	N/N	N	N	N	N	N
22 M	M/M	N/N	N/N	N/N	N	N	N	N	N
23 M	N/N	N/N	N/N	N/N	N	N	N	N	N
24 F	M/M	N/N	N/N	N/N	N	N	N	N	N
25 F	N/N	N/N	N/N	N/N	N	N	N	N	N

N/N = Homozigoto normal
M/M = Homozigoto mutante

V27I/N = Heterozigoto para V27I

N = Normal
M = Mutante

Tabela 4 – Resultados moleculares do grupo D

Nº/ sexo	GJB2		GJB6		Mutações mitocondriais				
	35delG	outras	Δ (GJB6-D13S1830)	Δ (GJB6-D13S1854)	A1555G	C1494T	A827	T961G	A7445G
1 M	N/N	N/N	N	N	N	N	N	N	N
2 F	N/N	N/N	N	N	N	N	N	N	N
3 F	N/N	N/N	N	N	N	N	N	N	N
4 F	N/N	N/N	N	N	N	N	N	N	N
5 M	N/N	N/N	N	N	N	N	N	N	N
6 M	N/N	N/N	N	N	N	N	N	N	N
7 F	N/N	N/N	N	N	N	N	N	N	N
8 F	N/N	N/N	N	N	N	N	N	N	N
9 M	N/N	N/N	N	N	N	N	N	N	N
10 M	N/N	N/N	N	N	N	N	N	N	N
11 F	N/N	N/N	N	N	N	N	N	N	N
12 M	N/N	N/N	N	N	N	N	N	N	N
13 F	N/N	N/N	N	N	N	N	M	N	N
14 F	N/N	N/N	N	N	N	N	N	N	N
15 M	N/N	N/N	N	N	N	N	N	N	N
16 M	N/N	N/N	N	N	N	N	N	N	N
17 M	N/N	N/N	N	N	N	N	N	N	N
18 M	N/N	N/N	N	N	N	N	N	N	N
19 M	N/N	N/N	N	N	N	N	N	N	N
20 M	N/N	N/N	N	N	N	N	N	N	N
21 M	N/N	N/N	N	N	N	N	N	N	N
22 M	N/N	N/N	N	N	N	N	N	N	N
23 M	N/N	N/N	N	N	N	N	N	N	N
24 M	N/N	N/N	N	N	N	N	N	N	N
25 M	N/N	N/N	N	N	N	N	N	N	N

N/N = Homozigoto normal

N = Normal

M = Mutante

No presente estudo, entre os recém-nascidos de alto risco, a frequência de perda auditiva foi de 10%, sendo 25 entre os 250 que passaram por UTIN. E dentre os 25 indivíduos (grupo A), 17 são do sexo masculino, correspondendo a 68% do grupo.

2 – Mutação 35delG no gene *GJB2*

Dentre os 100 indivíduos foram encontrados **5** indivíduos mutantes em homozigose, sendo estes do grupo **C**, correspondendo a 20% dos pacientes deste grupo e a 83% das mutações encontradas no gene ***GJB2*** neste estudo.

A figura 6 exemplifica os resultados, mostrando um indivíduo homozigoto normal, heterozigoto e homozigoto mutante para **35delG**.

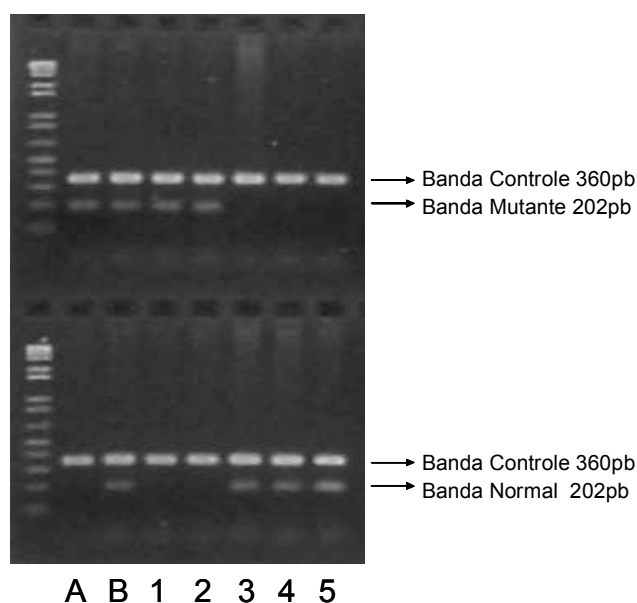


Figura 6 - Gel de agarose 1,5% mostrando os padrões de banda Controle, Mutante e Normal para a mutação **35delG** em 5 indivíduos. **A**: Controle Homozigoto mutante. **B**: Controle Heterozigoto. **1 e 2**: indivíduos com a mutação **35delG** em homozigose. **3, 4 e 5**: indivíduos homozigotos normais.

Os 5 pacientes com esta mutação apresentaram perda auditiva profunda e bilateral. No entanto, o *Teste de Independência de Fisher* foi usado para

comparar os graus de perda auditiva de ambas as orelhas (subdivididos em <90 dB e >90dB) com a presença da mutação 35delG no grupo C e esta mostrou não ser significativa (p-valor = 0,27 para ambas as orelhas).

3 – Mutação A1555G no gene mitocondrial *12S rRNA*

Nenhum indivíduo apresentou a mutação A1555G neste estudo. Desta forma, o padrão de bandas encontrado para todos os indivíduos está ilustrado na figura 7. Na ausência da mutação, o fragmento de 2060pb é cortado em 3 fragmentos: 1100pb, 516pb e 444pb.

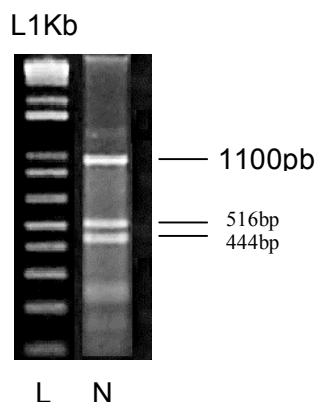


Figura 7 - Fragmentos da digestão do gene *12S rRNA* com a enzima *BsmA* I, em gel de agarose 1,5%, corado com brometo de etídeo. **(L)** ladder de 1KB GIBCO BRL®; e **(N)** fragmentos de 1100pb, 516pb e 444pb, de um indivíduo normal para a mutação A1555G.

Quando a mutação A1555G está presente, há a perda de um sítio de restrição de *BsmA* I e o fragmento de 2060pb é cortado em dois fragmentos: 1616pb e 444pb. A figura 8 ilustra o padrão de bandas de um controle positivo para esta mutação, após digestão.

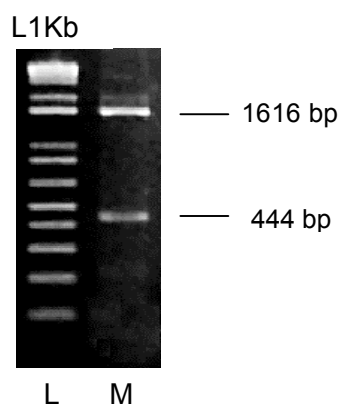


Figura 8 - Fragmentos da digestão do gene **12S rRNA** com a enzima *BsmA* I, em gel de agarose 1,5%, corado com brometo de etídeo. **(L)** ladder de 1KB GIBCO BRL® e; **(M)** fragmentos de 1616pb e 444pb de um indivíduo mutante para a mutação A1555G.

4 – Mutação C1494T no gene mitocondrial 12S rRNA

Quando a mutação C1494T está presente, há a perda do sítio de restrição de *Hph* I e o fragmento de 441pb não é digerido. Na ausência da mutação o fragmento de 441pb é cortado em 2 fragmentos: 370pb e 71pb (figura 9).

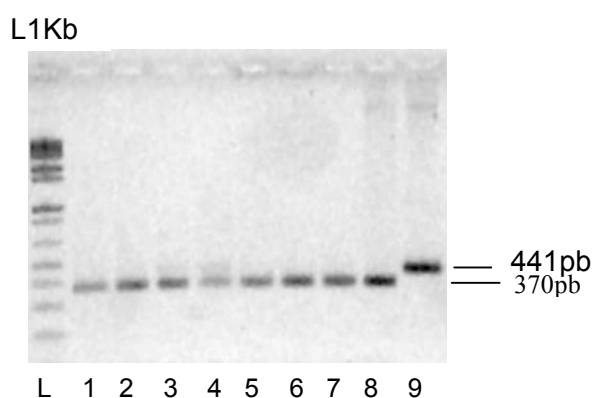


Figura 9 – Fragmentos da digestão do gene **12S rRNA** com a enzima *Hph* I, em gel de agarose 1,5%, corado com brometo de etídeo. **(L)** ladder de 1KB GIBCO BRL®; **(1)-(8)** fragmentos digeridos (indivíduos sem a mutação C1494T); **(9)** indivíduo controle positivo para a mutação C1494T.

Nenhum indivíduo foi encontrado com esta mutação neste estudo.

5 – Mutações A827G, T961G e 961delT/insC no gene mitocondrial 12S *rRNA*

A figura 10 mostra os fragmentos amplificados por PCR, onde estão localizadas as mutações A827G, T961G e 961delT/insC

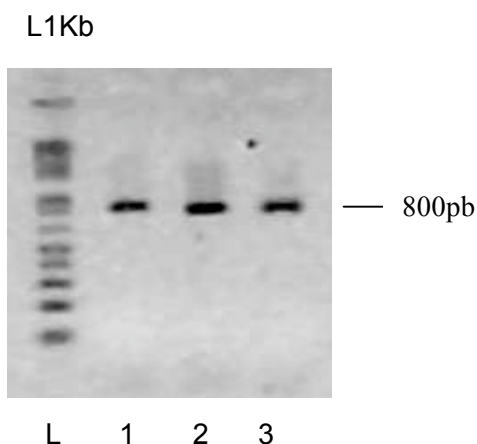


Figura 10 - Fragmentos da amplificação do gene **12S *rRNA*** em gel de agarose 1,5%, corado com brometo de etídeo. **(L)** ladder de 1KB GIBCO BRL® e; **(1)**, **(2)** e **(3)** fragmentos de 800pb.

Este fragmento foi submetido ao sequenciamento automático e 11 indivíduos apresentaram a mutação **A827G** em homoplasma, sendo **2** indivíduos do grupo A; **3** indivíduos do grupo B; e **5** indivíduos do grupo C e **1** do grupo D. No entanto, pelo *Teste de Independência de Fisher* não houve significância na comparação dos 11 indivíduos que têm a mutação A827G e que também têm algum grau de perda auditiva na amostra total de 100 indivíduos (p-valor = 0,3178).

A figura 11 exemplifica um indivíduo normal para **A827G**. A figura 12 exemplifica um indivíduo mutante para **A827G**, em homoplasma.

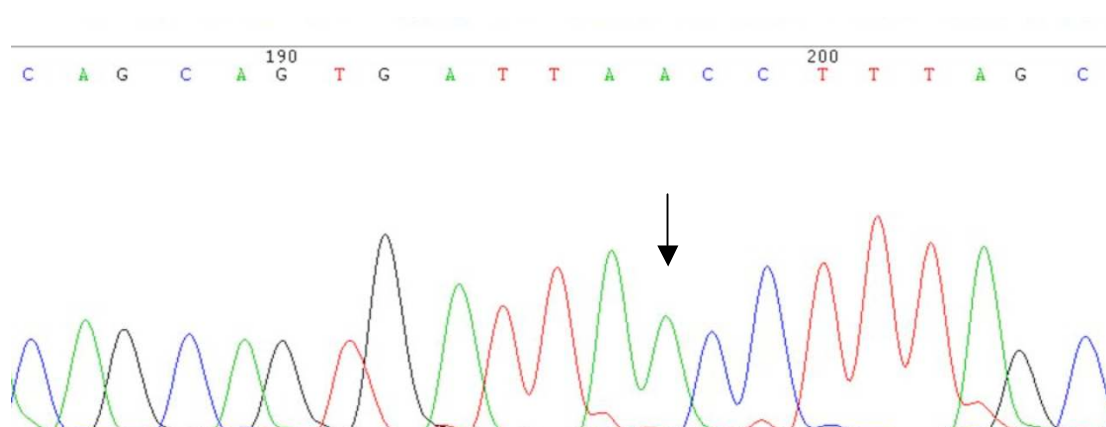


Figura 11 – Eletroferograma mostrando Indivíduo normal para A827G. A seta indica o ponto da mutação, com o nucleotídeo normal adenina (A).

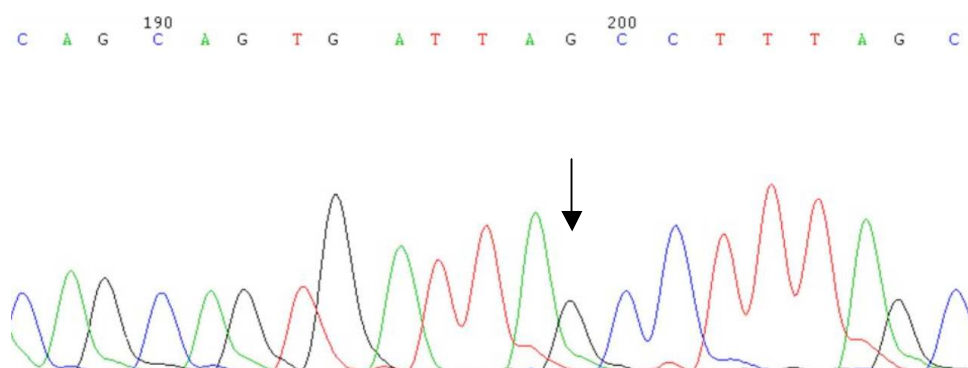


Figura 12 - Eletroferograma mostrando Indivíduo mutante para A827G. A seta indica o ponto da mutação (troca de adenina (A) por guanina (G)).

Neste estudo nenhum indivíduo apresentou as mutações **T961G** ou **961delT/insC**.

6 – Mutações G7444A e A7445G nos genes mitocondriais *CO1/tRNA^{SER(UCN)}*

Nenhum indivíduo apresentou estas mutações neste estudo, desta forma, a figura 13 ilustra o padrão de bandas encontrado, após digestão com a enzima *Xba* I: 846pb, 540pb, 435pb.

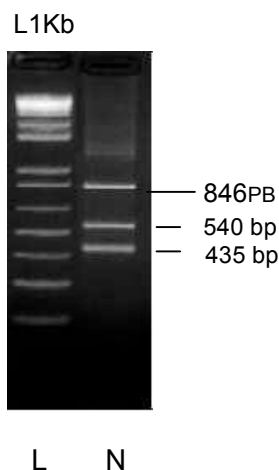


Figura 13 - Fragmento da digestão dos genes *CO1/tRNA^{SER(UCN)}* com a enzima *Xba*I, em gel de agarose 1,5%, corado com brometo de etídeo. **(L)** ladder de 1KB GIBCO BRL®; e **(N)** fragmentos de 846pb, 540pb e 435pb, de um indivíduo normal para as mutações G7444A e A7445G.

Quando uma destas mutações está presente, há a perda de um sítio de restrição de *Xba* I e o fragmento se divide em duas bandas: 1386pb e 435pb. Quando este padrão de banda é encontrado, é necessário que esta região seja sequenciada para que se descubra qual das duas mutações está presente. A figura 14 ilustra o padrão de bandas de um controle positivo para a mutação A7445G após digestão com a enzima *Xba* I.

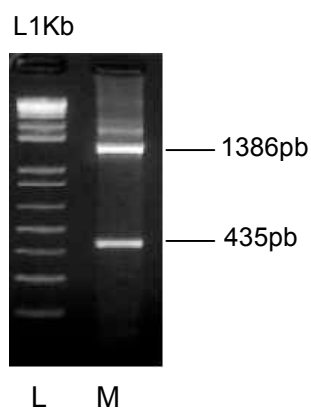


Figura 14 - Fragmento da digestão dos genes *CO1/tRNA^{SER(UCN)}* com a enzima *XbaI*, em gel de agarose 1%, corado com brometo de etídeo. **(L)** ladder de 1KB GIBCO BRL®; e **(M)** fragmentos de 1386 bp e 435bp de um indivíduo mutante controle para A7445G.

7 – Mutações $\Delta(GJB6-D13S1830)$ e $\Delta(GJB6-D13S1854)$ no gene *GJB6*

A figura 15 mostra os padrões de bandas para ambas as mutações.

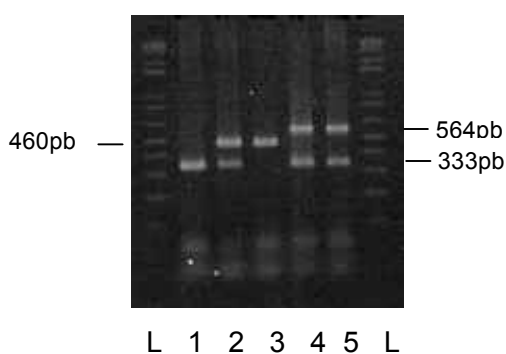


Figura 15 - Resultado da técnica de PCR para detecção das deleções $\Delta(GJB6-D13S1830)$ e $\Delta(GJB6-D13S1854)$. **(L)** marcador *ladder* 100pb Gibco BRL®; **(1)** indivíduo normal; **(2)** heterozigoto para $\Delta(GJB6-D13S1830)$; **(3)** homozigoto para $\Delta(GJB6-D13S1830)$; **(4)** e **(5)** heterozigoto para $\Delta(GJB6-D13S1854)$.

Neste estudo nenhum indivíduo apresentou estas mutações.

8 – Outras mutações no gene *GJB2*

A figura 16 mostra os fragmentos amplificados do éxon codificante do gene *GJB2*.

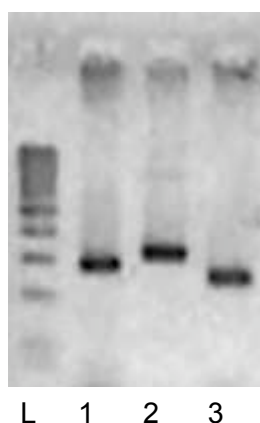


Figura 16 - 3 fragmentos do gene *GJB2* resultantes do PCR. (L) ladder de 1KB GIBCO BRL®; (1) fragmento de 284pb; (2) fragmento de 328pb; (3) fragmento de 255pb.

O produto do PCR foi sequenciado e os resultados encontrados foram:

- *Mutação V37I*

Apenas 1 indivíduo do grupo A apresentou esta mutação, em heterozigose.

- *Polimorfismo V27I*

Este polimorfismo foi encontrado em homozigose em 1 indivíduo do grupo A; em heterozigose em 3 indivíduos do grupo B e em 1 indivíduo do grupo C, correspondendo a 5% do total de indivíduos.

9 – Coleta de Dados:

- Consangüinidade:

Entre os 100 indivíduos pesquisados, 4 são filhos de pais aparentados, sendo 2 do grupo A (indivíduos 12 e 13), 1 pertence ao grupo D (paciente 18) e um pertencente ao grupo C (indivíduo 22), sendo este o único caso associado a mutação (35delG em homozigose). o *Teste Exato de Fisher* não mostrou significância para o cruzamento destas duas variáveis entre os 100 indivíduos pesquisados (p -valor = 0,19).

- Período de Internação:

Para todos os indivíduos do grupo A e B obteve-se a informação da quantidade de tempo que permaneceram em UTIN (Gráfico 1).

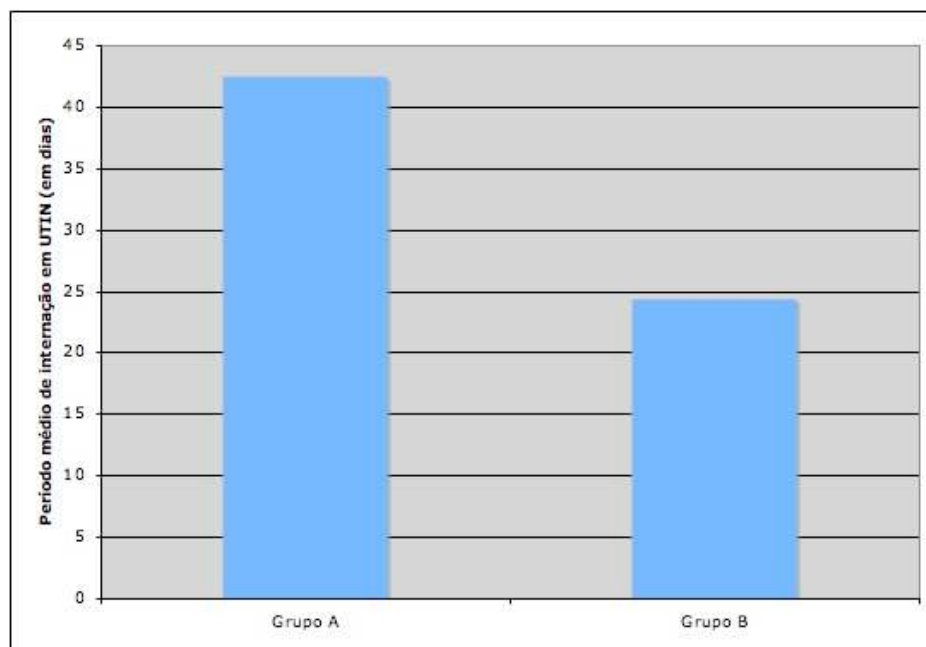


Gráfico 1 – Comparação da média do período de internação entre os indivíduos dos grupos A e B (em dias).

Segundo o *Teste de Mann-Whitney* para comparação entre medianas, há evidências estatisticamente significativas de que o tempo de internação médio ou mediano para indivíduos do grupo A foi maior que para os indivíduos do grupo B ($p\text{-valor} = 0,003$).

- Grau de perda auditiva

Para todos os grupos foram obtidos os graus de perda auditiva, e calculadas as médias, como mostra o gráfico 2.

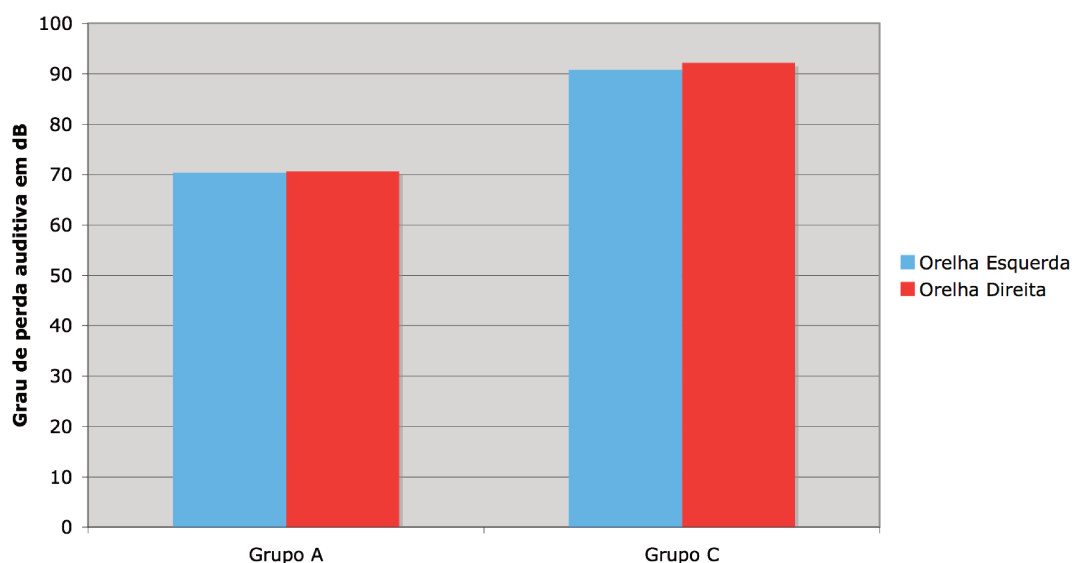


Gráfico 2 – Comparação do grau de perda auditiva das orelhas esquerda e direita entre os grupos A e C, em dB.

Segundo o *Teste de Mood* para igualdade de medianas houve uma diferença altamente significativa entre o grau de perda de ambas as orelhas entre os grupos A (mediana = 72,5) e C (mediana = 95), sendo $p\text{-valor}$ orelha esquerda = 0,002; $p\text{-valor}$ orelha direita = 0,000.

As médias de perda auditiva do grupo A foram de 70,4 (severa) dB para a orelha esquerda e 70,6 dB (severa) para a orelha direita. Já do grupo C as

médias de perda auditiva foram de 90,8 dB (profunda) para a orelha esquerda e 92,2 dB (profunda) para a orelha direita.

As perdas auditivas neste trabalho foram classificadas em: **leve** (27-40dB); **moderada** (41-55dB); **moderada a grave/severa** (56-70dB); **grave/severa** (71-90dB) e **profunda** (>90dB).

- Uso de medicamentos ototóxicos:

As tabelas 5, 6, 7 e 8 mostram os medicamentos administrados por cada indivíduo dos 4 grupos estudados.

Com o *Teste Exato de Fisher* foram feitas comparações do uso de cada medicamento com o tempo de internação dos grupos A e B (subdividido em: < 3 semanas e > 3 semanas) e houve significância para amicacina (p-valor = 0,0038), vancomicina (p-valor = 0,0002) e furosemida (p-valor = 0,0016).

O gráfico 3 mostra a frequência de indivíduos que fizeram uso de aminoglicosídeos e outros medicamentos ototóxicos em cada grupo.

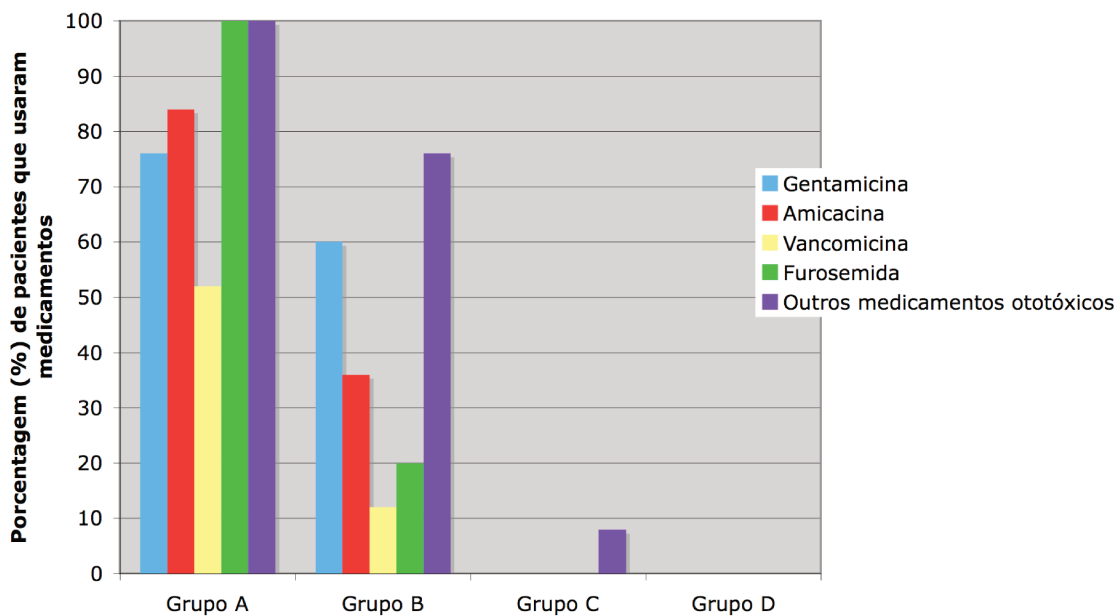


Gráfico 3 - Frequência de indivíduos usuários de gentamicina, amicacina, vancomicina, furosemida e outros medicamentos nos grupos A, B, C e D.

Tabela 5 - Indivíduos de UTIN – Com perda auditiva (GRUPO A). **dBNA**: Nível Auditivo em Decibéis. **Em vermelho**: antibióticos aminoglicosídeos.

Nº/sexo	TEMPO DE INTERNAÇÃO UTIN (Dias)	MUTACÃO	Grau de perda auditiva Orelhas		MEDICAMENTOS ADMINISTRADOS
			Esquerda	Direita	
1 M	32	-	80 dBNA	80 dBNA	GENTAMICINA, AMICACINA, OXACILINA, PENICILINA, VANCOMICINA, FUROSEMIDA
2 M	12	V37I/N	95 dBNA	95 dBNA	GENTAMICINA, NEOMICINA, PENICILINA,
3 F	93	A827G	60 dBNA	60 dBNA	GENTAMICINA, AMICACINA, OXACILINA, CEFOTAXIMA, PENICILINA, FUROSEMIDA VANCOMICINA
4 M	22	-	50 dBNA	50 dBNA	AMICACINA, OXACILINA, CEFOTAXIMA, FUROSEMIDA
5 M	66	-	70 dBNA	75 dBNA	GENTAMICINA, AMICACINA, OXACILINA, CEFOTAXIMA, PENICILINA, VANCOMICINA FUROSEMIDA
6 M	10	-	80 dBNA	80 dBNA	GENTAMICINA, PENICILINA
7 M	60	-	80 dBNA	80 dBNA	GENTAMICINA, AMICACINA, OXACILINA, CEFOTAXIMA, PENICILINA, VANCOMICINA FUROSEMIDA
8 M	28	-	40 dBNA	40 dBNA	GENTAMICINA, AMICACINA, OXACILINA, VANCOMICINA, FUROSEMIDA
9 F	23	-	65 dBNA	95 dBNA	GENTAMICINA, PENICILINA
10 F	50	-	50 dBNA	50 dBNA	GENTAMICINA, AMICACINA, OXACILINA, CEFOTAXIMA, PENICILINA, VANCOMICINA FUROSEMIDA
11 M	50	-	60 dBNA	60 dBNA	GENTAMICINA, AMICACINA, OXACILINA, CEFOTAXIMA, FUROSEMIDA
12 M	21	-	95 dBNA	70 dBNA	GENTAMICINA, AMICACINA, OXACILINA, CEFOTAXIMA, PENICILINA, FUROSEMIDA
13 M	15	-	100 dBNA	80 dBNA	GENTAMICINA, AMICACINA, OXACILINA, PENICILINA FUROSEMIDA
14 M	24	-	95 dBNA	95 dBNA	AMICACINA, OXACILINA, CEFOTAXIMA, VANCOMICINA, FUROSEMIDA
15 M	59	-	65 dBNA	75 dBNA	GENTAMICINA, AMICACINA, OXACILINA, CEFOTAXIMA, PENICILINA, VANCOMICINA FUROSEMIDA, IMIPENEM
16 F	65	V27I/V27I	55 dBNA	60 dBNA	GENTAMICINA, AMICACINA, OXACILINA, CEFOTAXIMA, IMIPENEM, VANCOMICINA FUROSEMIDA
17 F	58	-	30 dBNA	30 dBNA	AMICACINA, OXACILINA, CLAFORAN, FENTANIL, DEXAMETAZONA
18 M	16	-	85 dBNA	80 dBNA	GENTAMICINA, AMICACINA, OXACILINA, CEFOTAXIMA, PENICILINA, FUROSEMIDA
19 F	47	-	>100 dBNA	>100 dBNA	GENTAMICINA, AMICACINA, OXACILINA, CEFOTAXIMA, PENICILINA, VANCOMICINA FUROSEMIDA CEFTAZIDIMA, IMIPENEM
20 M	104	A827G	35 dBNA	30 dBNA	GENTAMICINA, AMICACINA, OXACILINA, CEFOTAXIMA, IMIPENEM, VANCOMICINA FUROSEMIDA
21 M	75	-	50 dBNA	50 dBNA	AMICACINA, AMPICILINA, FUROSEMIDA
22 F	29	-	60 dBNA	60 dBNA	AMICACINA, OXACILINA, CEFOTAXIMA, FUROSEMIDA
23 M	32	-	95 dBNA	100 dBNA	GENTAMICINA, AMICACINA, OXACILINA, IMIPENEM, VANCOMICINA, FUROSEMIDA
24 F	51	-	70 dBNA	75 dBNA	GENTAMICINA, AMICACINA, OXACILINA, CEFOTAXIMA, IMIPENEM, VANCOMICINA FUROSEMIDA
25 M	19	-	95 dBNA	95 dBNA	AMICACINA, OXACILINA, CEFOTAXIMA, FUROSEMIDA, PENICILINA

Tabela 6 - Indivíduos de UTIN – Sem perda auditiva (GRUPO B). **Em vermelho:** antibióticos aminoglicosídeos.

Nº/Sexo	TEMPO DE INTERNAÇÃO UTIN (Dias)	MUTAÇÃO	MEDICAMENTOS ADMINISTRADOS
1 M	25	-	GENTAMICINA, AMICACINA, OXACILINA, PENICILINA, CEFOTAXIMA
2 M	23	-	GENTAMICINA, AMICACINA, OXACILINA, PENICILINA, FUROSEMIDA
3 M	46	A827G	GENTAMICINA, FUROSEMIDA, PENICILINA
4 F	7	-	GENTAMICINA, PENICILINA
5 F	24	-	AMICACINA, OXACILINA
6 F	80	-	AMICACINA, VANCOMICINA, FUROSEMIDA, OXACILINA
7 M	17	A827G	-
8 M	8	-	PENICILINA
9 F	7	-	-
10 M	13	-	GENTAMICINA, PENICILINA
11 M	18	-	GENTAMICINA, PENICILINA
12 M	20	V27I/N	-
13 M	30	-	GENTAMICINA, AMICACINA, PENICILINA, OXACILINA, FUROSEMIDA
14 F	42	-	-
15 M	28	-	GENTAMICINA, AMICACINA, PENICILINA
16 M	20	V27I/N	GENTAMICINA, PENICILINA
17 M	30	-	-
18 M	59	-	AMICACINA, OXACILINA, VANCOMICINA, FUROSEMIDA
19 M	7	-	GENTAMICINA, PENICILINA
20 F	8	A827G	GENTAMICINA, PENICILINA
21 F	5	-	GENTAMICINA, PENICILINA
22 F	18	-	GENTAMICINA, AMICACINA, PENICILINA, OXACILINA E CEFOTAXIMA
23 M	21	-	GENTAMICINA, AMICACINA, PENICILINA, OXACILINA, CEFOTAXIMA, VANCOMICINA, FUROSEMIDA
24 M	32	-	GENTAMICINA, PENICILINA
25 M	20	-	-

Tabela 7 - Indivíduos Nascidos a Termo – Com perda auditiva (GRUPO C). **dBNA**: Nível Auditivo em Decibéis.

Nº/Sexo	MUTAÇÃO	Grau de perda auditiva Orelhas		MEDICAMENTOS
		Esquerda	Direita	
1 M	-	60 dBNA	60 dBNA	-
2 F	A827G	95 dBNA	95 dBNA	-
3 M	A827G	95 dBNA	95 dBNA	uso de fármacos ototóxicos
4 F	-	100 dBNA	100 dBNA	-
5 M	-	95 dBNA	95 dBNA	-
6 F	35delG/35delG	95 dBNA	95 dBNA	-
7 M	35delG/35delG	100 dBNA	100 dBNA	-
8 M	-	95 dBNA	95 dBNA	-
9 M	-	95 dBNA	95 dBNA	-
10 M	A827G	100 dBNA	100 dBNA	-
11 M	-	85 dBNA	85 dBNA	-
12 F	-	90 dBNA	90 dBNA	uso de fármacos ototóxicos
13 M	35delG/35delG	95 dBNA	95 dBNA	-
14 M	-	60 dBNA	95 dBNA	-
15 F	-	95 dBNA	95 dBNA	-
16 M	A827G	95 dBNA	95 dBNA	-
17 F	-	85 dBNA	85 dBNA	-
18 M	-	85 dBNA	85 dBNA	-
19 F	A827G	100 dBNA	100 dBNA	-
20 M	-	100 dBNA	100 dBNA	-
21 M	-	65 dBNA	65 dBNA	-
22 M	35delG/35delG	95 dBNA	95 dBNA	-
23 M	-	95 dBNA	95 dBNA	-
24 F	35delG/35delG	95 dBNA	95 dBNA	-
25 F	-	100 dBNA	100 dBNA	-

Tabela 8 - Indivíduos Nascidos a Termo – sem perda auditiva (GRUPO D)

Nº/ sexo	MUTAÇÃO	MEDICAMENTOS
1 M	-	-
2 F	-	-
3 F	-	-
4 F	-	-
5 M	-	-
6 M	-	-
7 F	-	-
8 F	-	-
9 M	-	-
10 M	-	-
11 F	-	-
12 M	-	-
13 F	A827G	-
14 F	-	-
15 M	-	-
16 M	-	-
17 M	-	-
18 M	-	-
19 M	-	-
20 M	-	-
21 M	-	-
22 M	-	-
23 M	-	-
24 M	-	-
25 M	-	-

DISCUSSÃO

Este estudo foi realizado com indivíduos provenientes da cidade de Fortaleza e região, no estado do Ceará, Brasil. A população brasileira é uma das mais heterogêneas do mundo, como resultado de 5 séculos de mistura étnica entre pessoas de três continentes: o colonizador europeu, representado principalmente pelos portugueses; escravos africanos; e os ameríndios nativos, que possuem uma ancestralidade asiática distante (Alves-Silva *et al.*, 2000; Parra *et al.*, 2003). Os holandeses invadiram o Brasil duas vezes, primeiramente em 1624 ocuparam Salvador por um ano; em 1630 invadiram Pernambuco e durante 24 anos controlaram quase todo o Nordeste, devido ao comércio do açúcar (www.infoescola.com).

Pode-se dizer, então, que a região Nordeste, onde está localizado o município de Fortaleza, é uma miscigenação principalmente de descendentes africanos, nativos e europeus.

A prevalência de perda auditiva neurossensorial em recém-nascidos de alto-risco encontrada neste estudo foi de 10%. Abramovich *et al.*, 1979 encontraram prevalência de 9% em grupo de crianças de alto risco na Inglaterra. Watkin *et al.*, 1991 constatarem prevalência de 4% em grupo de crianças com média de idade gestacional de 35 semanas, também na Inglaterra. Câmara, em 1999, encontrou prevalência de 5% em recém nascidos de alto risco no Ceará. Assim, a frequência encontrada nesta pesquisa foi superior a todos estes estudos. Porém foi inferior aos achados de Valkama *et al.*, 2000 em recém-nascidos de alto risco (de 12%) na Finlândia, de Martín *et al.*, 2000 (de 14%) na Espanha e de Sergi *et al.*, 2001 (de 13,5%) na Itália. Dos 25 indivíduos de alto risco com perda auditiva deste trabalho, 17 são do sexo masculino (68%), concordando com o trabalho de Vohr *et al.*, 2000, onde o grupo de crianças de UTIN com perda auditiva era formado por uma maioria do sexo masculino (55,9%).

Em prévios estudos, foi observada uma frequência de 22% de mutações no gene **GJB2** (conexina 26) em indivíduos com surdez neurossensorial com

etiologia não esclarecida (Oliveira *et al.*, 2002). O grupo de indivíduos nascidos a termo com perda auditiva (grupo C) apresentou uma frequência de 20% de mutações no **GJB2** (5 indivíduos com a mutação 35delG em homozigose), se aproximando a estes dados. No grupo de alto-risco com perda auditiva (grupo A) esta frequência foi de 4% (1 indivíduo com a mutação V37I em heterozigose). No grupo de alto-risco sem perda auditiva (grupo B) e no grupo de nascidos a termo sem perda auditiva (grupo D) nenhum indivíduo apresentou mutações neste gene. Assim, o total de indivíduos com perda auditiva neurossensorial e com mutações no **GJB2** foi de 12%.

Ainda que, dezenas de genes tenham sido descritos como relacionados à perda auditiva recessiva não-sindrômica (PETERSEN AND WILLEMS, 2006), o *locus* DFNB1, contendo os genes **GJB2** e **GJB6** somam aproximadamente 50% das causas deste tipo de perda (KENNESON, *et al.*, 2002), e entre todas as mutações descritas, a 35delG é a mais freqüente (60-85% dos casos). 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 62 indivíduos com perda auditiva, mutações no gene **GJB2** foram encontradas em 33,5% dos casos, sendo que somente a mutação 35delG foi identificada em 84,2% dos alelos mutantes deste gene (OLIVEIRA *et al.*, 2002).

Neste estudo 6% dos indivíduos estudados apresentaram mutações no gene **GJB2** (1% com a mutação V37I e 5% apresentaram a mutação 35delG, sendo esta a segunda mutação mais freqüente neste trabalho). A mutação mitocondrial A827G (encontrada em 11% dos indivíduos) foi a mais freqüente, seguida pela mutação 35delG. Dentre os indivíduos com mutações no gene **GJB2**, a frequência da mutação 35delG foi de 83% (sendo em todos os casos em homozigose). A frequência de alelos mutantes para 35delG, entre os alelos mutantes do **GJB2**, foi de 90%, maior que o estudo de Oliveira *et al.*, 2002.

Entre os 100 indivíduos estudados, apenas 4 são filhos de pais consangüíneos, representando, assim 4% do total. Destes, 2 pertencem ao grupo A (indivíduos 12 e 13), 1 pertence ao grupo D (paciente 18) e um

pertencente ao grupo C (indivíduo 22), sendo este o único encontrado com mutação (35delG em homozigose). Por apresentar apenas esse caso de consangüinidade e mutação, o *Teste Exato de Fisher* não mostrou significância para o cruzamento destas duas variáveis entre os 100 indivíduos pesquisados (p -valor = 0,19). No entanto, com tantos genes expressos na cóclea é possível que os 2 indivíduos do grupo A tenham mutações não estudadas, que levem ao fenótipo da surdez.

A mutação 35delG se mostrou com frequência alta e diretamente relacionada com a perda auditiva congênita, pois foi exclusivamente encontrada no grupo de indivíduos nascidos a termo, que tiveram perda congênita (grupo C). Estes indivíduos ainda apresentaram perda auditiva profunda bilateral e pré-lingual. Estes resultados discordaram de alguns estudos, onde estavam também presentes mutações do **GJB2** e houve perda progressiva (DENOYELLE *et al.*, 1999; JANECKE, *et al.*, 2002; COHN, *et al.*, 1999; MARLIN *et al.*, 2005). No entanto, concorda com estudos que mostraram que indivíduos com 35delG em homozigose, assim como outras mutações do **GJB2**, estavam relacionados à perda auditiva neurosensorial profunda, surgida na fase pré-lingual e na maioria não-progressiva (DENOYELLE, *et al.*, 1999; COHN, *et al.*, 1999; COHN AND KELLEY, 1999b; MUELLER, *et al.*, 1999; WALCH, *et al.*, 2000; WILCOX, *et al.*, 2000; ENGEL-YEGER, *et al.*, 2002; CRYNS, *et al.*, 2004).

Ainda em relação ao gene **GJB2**, 5 indivíduos foram encontrados com o polimorfismo V27I, correspondendo assim a 5% dos indivíduos deste estudo. No passado a alteração V27I foi descrita como uma mutação, e mais tarde como um polimorfismo. Há evidências substanciais que esta alteração, de fato, represente uma variante normal, porque foi encontrada em muitos indivíduos normais em heterozigose, homozigose ou em heterozigotos compostos (KELLEY *et al.*, 1998; ABE *et al.*, 2000; KUDO *et al.*, 2000; PARK *et al.*, 2000). Neste estudo a forma homozigótica foi encontrada em um indivíduo com perda auditiva do grupo A e as formas heterozigóticas foram encontradas em 3 indivíduos sem perda (do grupo B) e em 1 indivíduo com perda (do grupo C). Desta forma, não se pode afirmar qualquer influência deste polimorfismo no fenótipo da surdez.

A mutação V37I do **GJB2** encontrada em heterozigose em 1 indivíduo do grupo A por si só não seria capaz de justificar a perda auditiva neste indivíduo, pois se trata de uma mutação com padrão de herança autossômica recessiva, como sugerido por publicações prévias (KELLEY *et al.*, 1998; OLIVEIRA, *et al.*, 1999; RABIONET *et al.*, 2000; WILCOX *et al.*, 2000; MARLIN *et al.*, 2001; KENNA *et al.*, 2001; BASON *et al.*, 2002). Sabe-se que mutações em heterozigose no gene **GJB2** podem, em muitos casos, estar associadas às mutações em heterozigose no gene vizinho **GJB6** e desta forma levar à perda auditiva. As mutações mais freqüentes neste gene são as deleções **Δ (GJB6-D13S1830)** e **Δ (GJB6-D13S1854)** e referem-se à perda de 342 Kb e 232 Kb, respectivamente (DEL CASTILLO *et al.*, 2005). No entanto, neste trabalho todos os indivíduos foram rastreados para ambas e nenhuma delas foi encontrada.

Com a comparação do grupo A e grupo B esperava-se encontrar diferenças no genótipo, principalmente mutações mitocondriais moduladas pelo uso de aminoglicosídeos, no grupo A. Isto, pelo fato de que os indivíduos de ambos os grupos passaram por UTIN e, em geral, fizeram uso de aminoglicosídeos, mas somente os indivíduos do grupo A têm perda auditiva. Dentre todas as mutações mitocondriais pesquisadas, apenas a mutação A827G foi encontrada, em 2 indivíduos do grupo A e 3 do grupo B. No entanto, os indivíduos no grupo A (com perda auditiva) com esta mutação, foram usuários de gentamicina e amicacina. E, entre os 3 indivíduos de UTIN sem perda auditiva (grupo B) e com esta mutação, 1 deles não fez uso de medicamentos durante o período de internação e os outros 2 apenas usaram gentamicina. Desta forma, parece possível que a mutação A827G tenha sido modulada pelo uso de aminoglicosídeos no grupo A.

No grupo A 100% dos indivíduos utilizaram furosemida, 76% utilizaram gentamicina, 84% utilizaram amicacina e 52% utilizaram vancomicina. Sendo que 22% dos indivíduos utilizaram pelo menos 2 destes medicamentos combinados, além de outros medicamentos considerados ototóxicos. Já no grupo B, 60% utilizaram gentamicina, 36% utilizaram amicacina, 12%

vancomicina e 20% furosemida, sendo que 36% utilizaram pelo menos 2 destes medicamentos combinados além de outros medicamentos considerados ototóxicos. Ainda neste grupo, 24% dos indivíduos não utilizaram nenhum tipo de antibiótico ou medicamento ototóxico, durante o período de internação. Salamy *et al.*, 1989 relataram que, o uso de aminoglicosídeos em grandes dosagens e por tempo prolongado, quando associado à furosemida, decorre crescimento do risco de aquisição da perda auditiva neurossensorial.

Além de ser encontrada nos grupos A e B, a mutação mitocondrial A827G também foi encontrada em 5 indivíduos do grupo C e 1 indivíduo do grupo D, mostrando-se freqüente nestes grupos e também evidenciando que ela pode estar presente sem gerar o fenótipo de surdez.

Além disto, os indivíduos mutantes para A827G do grupo C podem indicar a modulação por outro fator, diferente dos aminoglicosídeos, pois entre os 5 indivíduos com esta mutação, nenhum fez uso de aminoglicosídeos, no entanto, todos eles tiveram perda auditiva. A partir desta observação, pode-se dizer que a A827G parece realmente ser modulada por outros fatores, como haplótipos mitocondriais e/ou genes nucleares modificadores, concordando com os trabalhos de Li, R. *et al.*, 2004 e Li, Z. *et al.*, 2005.

Apesar de estes resultados indicarem que é possível haver uma modulação da mutação A827G, também não se pode descartar o fato de que ela vem se mostrando muito freqüente em indivíduos sem o fenótipo de surdez e isto também pode indicar que as perdas auditivas nos indivíduos deste trabalho podem não estar relacionadas diretamente a essa mutação mas simplesmente a fatores ambientais. Poucos trabalhos foram publicados a respeito da A827G e ainda não está completamente elucidada a ação desta mutação no fenótipo da surdez.

Por meio da comparação do grupo A com o grupo C esperava-se destacar a influência do período de internação e uso de medicamentos. Os resultados encontrados foram médias de perda auditiva do grupo A de 70,4

(severa) dBNA para a orelha esquerda e 70,6 dBNA (severa) para a orelha direita. Já do grupo C as médias de perda auditiva foram de 90,8 dBNA (profunda) para a orelha esquerda e 92,2 dBNA (profunda) para a orelha direita. Deste modo, as médias de perda auditiva do grupo C são bem maiores que as médias do grupo A e significativas, como comprovado pelo *Teste Estatístico de Mood* (p-valor orelha esquerda = 0,002; p-valor orelha direita = 0,000). No grupo C estão os 5 indivíduos mutantes para 35delG em homozigose, evidenciando mais uma vez que mutações no gene **GJB2** geralmente levam a perdas profundas pré-linguais. Estes resultados também podem induzir à hipótese de que a perda auditiva nestes pacientes do grupo C pode realmente se dever a mutações não estudadas.

Comparando indivíduos do grupo C com o grupo D esperava-se evidenciar o possível efeito das mutações no grupo C, caso fossem encontradas, pois ambos os grupos são formados por crianças nascidas a termo, porém só o grupo C é formado por indivíduos com perda auditiva. E comparado ao grupo D, encontrou-se 10 vezes mais indivíduos com mutações no grupo C.

No Brasil, a maior parte dos casos de perda auditiva, possíveis de serem diagnosticados, são devidos a fatores ambientais, tais como infecções congênicas (principalmente rubéola), anóxia perinatal, hiperbilirrubinemia grave e meningite (SIMÕES & MACIEL-GUERRA, 1992; SILVA *et al.*, 2007). Porém, esta proporção de causas ambientais tende a diminuir, como resultado das melhorias na área de saúde. Os recém-nascidos de alto risco (grupos A e B) deste trabalho passaram por um período internados em UTIN, devido a infecções e/ou complicações pré, peri e pós-natais e durante este período a maioria deles teve algum tipo de complicação como outras infecções ou problemas respiratórios necessitando de ventilação mecânica. Na década de 70, iniciou-se o uso de ventilação efetiva para problemas respiratórios e o uso de medicamentos complexos, fazendo com que crianças de risco sobrevivessem. De 1983 a 1992,

a porcentagem de crianças com perda auditiva neurosensorial atingiu 19%, sendo em 8% associada a fatores peri-natais. Ainda no mesmo estudo o autor concluiu que há muitos fatores associados à perda auditiva em UTIN, incluindo anoxia, hiperbilirrubinemia grave, uso de drogas ototóxicas e doenças.

Desde 1972 o Comitê de Audição Infantil (*JOINT COMMITTEE ON INFANT HEARING*) tem pesquisado fatores de risco que estão proximamente associados com perda auditiva e vários estudos têm revisto a validade dos fatores de risco (Kountakis *et al.*, 1997; Vohr *et al.*, 2000; Bárbara *et al.*, 2000). Os fatores de risco descritos incluem: checagem de possível histórico de infecção intra-uterina atentando-se para citomegalovirus, rubéola, sífilis, herpes e toxoplasmose; investigação de anomalias crânio faciais, incluindo anormalidades morfológicas da pina e do canal auditivo; atenção para peso ao nascer inferior ao 1.500g; checagem de hiperbilirrubinemia num nível seroso que requisitou transfusão exsangüínea; história de meningite bacteriana; registro de Apgar de 0 a 4 no primeiro minuto ou 6 aos cinco minutos; uso de ventilação mecânica por cinco dias ou mais; sinais clínicos ou outros achados associados a síndromes que reconhecidamente incluem perda auditiva neurosensorial ou condutiva e, por fim, relato do uso de substâncias ototóxicas, incluindo os aminoglicosídeos. (JOINT COMMITTEE ON INFANT HEARING, 2007).

Hoje, em países desenvolvidos, os aminoglicosídeos são menos utilizados, porém, no Brasil eles ainda são amplamente administrados em UTIN, para combater diversos tipos de infecções. São prescritos por serem altamente eficazes para infecções graves por bactérias gram-negativas em recém-nascidos.

A gentamicina é cocleotóxica e vestibulotóxica, utilizada no combate à sepse bacteriana. A amicacina, exclusivamente cocleotóxica, apresenta o maior espectro antibacteriano entre todos os aminoglicosídeos. Essas substâncias podem danificar ou destruir as células ciliadas da cóclea, sendo as células ciliadas externas basais as mais vulneráveis, resultando em perda auditiva neurosensorial.

Assim, a etiologia de perda auditiva nos indivíduos onde não foram encontradas mutações, pode dever-se a outras mutações não pesquisadas neste estudo ou ainda a mutações desconhecidas. Porém, o mais provável é que fatores ambientais, como baixo peso, infecções e o uso exacerbado de aminoglicosídeos e/ou medicamentos ototóxicos nestes indivíduos tenham sido as maiores causas da perda auditiva. Com o *Teste Exato de Fisher* foram feitos cruzamentos para cada medicamento com o tempo de internação dos grupos A e B (subdividido em: < 3 semanas e > 3 semanas) e houve significância para amicacina (p-valor = 0,0038), vancomicina (p-valor = 0,0002) e furosemida (p-valor = 0,0016), mostrando que os usuários destes 3 medicamentos foram também os que permaneceram mais tempo em UTIN. Borradori *et al.*, 1997 também observaram significância estatística para o uso de medicamentos ototóxicos, sendo o uso de aminoglicosídeos de 100% nos casos estudados e 62,5% no grupo-controle. Esse mesmo autor também encontrou significância quanto à duração do tratamento e dose cumulativa total, em relação aos aminoglicosídeos.

Câmara (1999) constatou, em pesquisa realizada com neonatos de alto-risco, também no estado do Ceará, que a prevalência da perda auditiva neurossensorial foi de 5%; que 60% da casuística total e 85% no grupo de casos eram usuários de aminoglicosídeos. Roizen (1999) relatou que nos últimos 25 anos aumentou bastante a porcentagem de crianças com perda auditiva que permaneceram em UTIN.

A média do tempo de internação em UTIN para o grupo A foi de 42,44 dias e para o grupo B foi de 24,32 dias, mostrando assim, significância pelo *Teste de Mann-Whitney* (p-valor = 0,003) para comparação entre medianas. Borradori *et al.*, 1997 também consideraram fator significativo para perda auditiva neurossensorial a permanência em UTIN (p-valor = 0,005).

Quando uma criança é diagnosticada com perda auditiva, ela precisa começar a receber tratamento especial tanto psicológico, pedagógico, quanto médico, para que seu desenvolvimento seja otimizado.

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 ou pós-lingual bilateral profunda. O implante coclear torna possível a reabilitação oral do indivíduo. 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).

Alguns trabalhos publicados recentemente propuseram que o implante coclear realizado em crianças 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, citomegalovírus (Green *et al.*, 2002; Sinnathuray *et al.*, 2004). Nos casos com mutação do gene **GJB2** o implante coclear é muito indicado, pois a macroestrutura da cóclea para implantação não está comprometida como ocorre nos casos de causa traumática ou de determinadas infecções que lesam a estrutura física da cóclea, impedindo que um número maior de eletrodos sejam introduzidos. Estudos relacionados a testes genéticos em indivíduos com surdez, principalmente em recém-nascidos, permitem esta identificação precoce da perda, além de indicar mais um dos pré-requisitos ao implante coclear.

Estudos futuros devem ser feitos para que o perfil completo da perda auditiva em UTIN brasileiras seja traçado, e, desta forma, surjam melhorias médico-sanitárias, focando a diminuição do alto índice de perda auditiva. Espera-se, assim, que alguns medicamentos possam ser evitados, utilizados em menor escala ou substituídos por outros de efeitos similares e menos ototóxicos.

Na área molecular outros genes e mutações ainda devem ser rastreados para que a etiologia se torne completa e conclusiva. No entanto, deve-se salientar a importância do rastreamento genético em maternidades, principalmente de mutações tão frequentes, como a 35delG e de mutações moduladas pelo uso de aminoglicosídeos.

CONCLUSÕES

- 1) A perda auditiva nos indivíduos do grupo A pode ter sido causada predominantemente pelo tempo significativamente maior de internação em UTIN que o grupo B ($p\text{-valor} = 0,003$) e/ou pela quantidade de aminoglicosídeos administrados.
- 2) Não foi possível comprovar que a mutação A827G tenha sido modulada pelo uso de aminoglicosídeos no grupo A, no entanto, não se pode descartar o background genético dos indivíduos e o tamanho da amostra.
- 3) A mutação V37I foi encontrada em heterozigose em 1 indivíduo do grupo A, o que não justifica a perda auditiva neste indivíduo, por se tratar de uma mutação de herança autossômica recessiva, porém, pode fazer parte de uma herança digênica com um gene não estudado.
- 4) A mutação A827G apresentou-se freqüente tanto em indivíduos surdos, quanto ouvintes, assim, sem significância para a perda auditiva ($p\text{-valor} = 0,3178$).
- 5) A mutação 35delG foi encontrada em 83% dos casos de mutações no gene **GJB2**, concordando com estudos prévios.
- 6) A mutação 35delG foi encontrada em homozigose em 5 indivíduos do grupo C, justificando a perda auditiva nestes indivíduos e correspondendo a 20% deste grupo.
- 7) A importância deste estudo foi traçar um perfil parcial da UTIN, além de incentivar melhorias médico-sanitárias e estimular a redução e/ou substituição de aminoglicosídeos, quando possível.

ANEXO 1
PARECER COMITÊ DE ÉTICA UNIFOR

DECLARAÇÃO

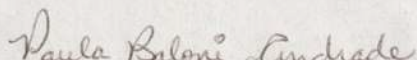
Declaro para os devidos fins que o conteúdo de minha dissertação/ tese de mestrado/doutorado intitulada Estudo da Etiologia da Surdez Neurosensorial em Recém –Nascidos de Alto Risco:

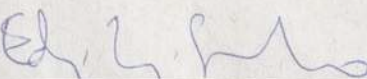
() não se enquadra no Artigo 1º, § 3º da Informação CCPG 002/06, referente a bioética e biossegurança.

() está inserido no Projeto CIBio (Protocolo nº _____), intitulado _____

() tem autorização da Comissão de Ética em Experimentação Animal (Protocolo nº _____).

(X) tem autorização do Comitê de Ética para Pesquisa com Seres Humanos (Protocolo nº 265/2005).

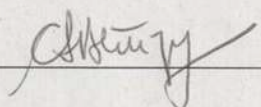

Aluna: Paula Baloni Andrade


Orientadora: Edi Lúcia Sartorato

Para uso da Comissão ou Comitê pertinente:

☒ Deferido () Indeferido

Nome:
Função:


Prof. Dra. Carmen Silvia Bertuzzo
Matrícula 17484-0
Presidente do Comitê de Ética em Pesquisa
Faculdade de Ciências Médicas - UNICAMP



**UNIVERSIDADE DE FORTALEZA
VICE-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
Comitê de Ética em Pesquisa – COÉTICA**

PARECER Nº. 265/2005

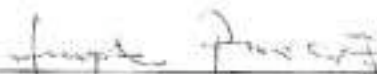
Projeto de Pesquisa: Frequência da mutação genética 35delG em crianças com perda auditiva sensorioneural nascidas a termo

Pesquisador Responsável: Marília Fontenele e Silva Câmara

Data de apresentação ao COÉTICA: 07/06/2005

Registro no COÉTICA: 05-202

Parecer: APROVADO *ad referendum* na data de 08/08/2005



Prof. Dr. Haroldo Rodrigues de Albuquerque Júnior
Presidente do Comitê de Ética em Pesquisa da UNIFOR – COÉTICA



Universidade Federal de São Paulo
Escola Paulista de Medicina

Comitê de Ética em Pesquisa
Universidade Federal de São Paulo/Hospital São Paulo

São Paulo, 30 de abril de 2003

CEP Nº 0484/03

Ilmo(a). Sr(a).

Pesquisador(a): MARÍLIA FONTENELE E SILVA CÂMARA

Disciplina/Departamento: Distúrbios da Comunicação Humana/Otorrinolaringologia

Ref.: Projeto de Pesquisa

Efeito fármaco ototóxicos em recém-nascidos de alto risco

O Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de São Paulo/Hospital São Paulo
ANALISOU e APROVOU o projeto acima.

Conforme resolução 196/96 do Conselho Nacional de Saúde são deveres do pesquisador:

1. Comunicar toda e qualquer alteração do projeto e do termo de consentimento. Nestas circunstâncias a inclusão de pacientes deve ser temporariamente interrompida até a resposta do Comitê, após análise das mudanças propostas.
2. Comunicar imediatamente ao Comitê qualquer evento adverso ocorrido durante o desenvolvimento do estudo.
3. Os dados individuais de todas as etapas da pesquisa devem ser mantidos em local seguro por 5 anos para possível auditoria dos órgãos competentes.
4. Apresentar primeiro relatório parcial em 27/10/03

Atenciosamente,

Prof. Dr. José Osmar Medina Pestana
Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa da
Universidade Federal de São Paulo/Hospital São Paulo

ANEXO 3
TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E
ESCLARECIDO

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Título do Estudo: Efeito de Fármacos Ototóxicos na Audição de Recém-nascidos de Alto Risco.

Essas informações estão sendo fornecidas para sua participação voluntária neste estudo, que tem como objetivo estudar a associação entre fármacos ototóxicos e a perda auditiva sensorineural em recém-nascidos de alto risco.

Para isso, será realizada avaliação da audição, estudo genético em seu filho e serão aplicados questionários para construir a história da criança.

Nesta avaliação, a criança será submetida a testes de audição e coleta de sangue no consultório particular da pesquisadora.

Para tanto, deverão ser realizados os seguintes procedimentos:

- coleta de dados dos prontuários sobre intercorrências no parto e no período de internação da criança;
- questionário com perguntas sobre o nível sócio econômico da família e a saúde da criança após a alta hospitalar;
- exame de emissões otoacústicas evocadas- produto de distorção, pesquisa do reflexo cócleo-palpebral, timpanometria, audiometria com reforço visual e nível de detecção de voz, em todas as crianças;
- pesquisa dos potenciais evocados auditivos e emissões otoacústicas transientes nas crianças do grupo de casos;
- coleta de uma amostra de 1 a 2ml de sangue que será encaminhada para análise genética no Laboratório de Genética Humana da Unicamp-SP; e

- encaminhamento para adaptação de aparelho auditivo e terapia fonoaudiológica para todas as crianças portadoras de perda auditiva.

Nos testes de emissões otoacústicas, a criança permanecerá no colo da mãe e, por meio de uma sonda, colocada no canal auditivo externo, serão apresentados estímulos sonoros e realizada análise da capacidade auditiva da criança.

No exame de timpanometria, apresenta-se variação de pressão e estímulo sonoro por meio de sonda para análise do funcionamento da orelha média.

Para a realização da audiometria com reforço visual e nível de detecção de voz, a criança deverá permanecer no colo da mãe e responder a estímulos sonoros apresentados em campo livre.

A Pesquisa do Reflexo Cócleo-Palpebral será realizada por meio do estímulo sonoro do agogô.

Na avaliação dos potenciais evocados auditivos serão fixados três eletródios e utilizados fones de inserção, para emissão de sons e captação das respostas do nervo auditivo.

No caso do diagnóstico de perda auditiva sensorioneural, as crianças serão encaminhadas ao programa de doação de aparelho auditivo, para iniciarem o uso da amplificação, e ingressarão no tratamento fonoaudiológico com o objetivo de receber estimulação auditiva e de linguagem.

Estes métodos de avaliação auditiva não causam nenhum desconforto ou risco para a saúde da criança, havendo um grande benefício para as crianças diagnosticadas com perda auditiva, pois receberão aparelho auditivo e acompanhamento fonoaudiológico, proporcionando um adequado desenvolvimento de linguagem. Trata-se de um estudo de caso-controle, testando a hipótese de que o uso de fármacos ototóxicos e presença de mutação genética aumentam o risco de lesão auditiva em neonatos de alto risco. Neste estudo, os objetivos são identificar e descrever os danos causados à audição dos recém-nascidos de alto risco pelo uso de

fármacos ototóxicos, estudar as características dos recém-nascidos de alto risco com perda auditiva em relação ao uso de fármacos ototóxicos, calcular prevalência da perda auditiva em recém-nascidos de alto risco usuários de ototóxicos e avaliar a presença das mutações genéticas nesta população.

Em qualquer etapa do estudo, o (a) responsável pela criança terá acesso ao profissional responsável pela pesquisa para esclarecimento de eventuais dúvidas. A pesquisadora é a fonoaudióloga Marília Fontenele e Silva Câmara, que pode ser encontrada na Avenida Washington Soares, 1321, telefones: 4773166, 32216348 ou 99869779. Caso tenha alguma consideração ou dúvida sobre a ética da pesquisa, entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) – Rua Botucatu, 572 – 1º andar – cj 14, telefone: 5571 1062, fax: 5539 7162 – e-mail: cepunifesp@epm.br.

É garantida a liberdade da retirada de consentimento a qualquer momento e de deixar de participar do estudo, sem qualquer prejuízo à continuidade de seu tratamento na Instituição.

Todas as informações obtidas serão analisadas em conjunto com outros pacientes, não sendo divulgada a identificação de nenhum deles.

V. S^a, tem o direito de se manter atualizado (a) sobre os resultados parciais da pesquisa, não havendo despesas pessoais em qualquer fase do estudo, incluindo os exames. Também não há compensação financeira relacionada à sua participação. Se houver qualquer despesa adicional, ela será absorvida pelo orçamento da pesquisa.

Acredito, pois, ter sido suficientemente informado a respeito das informações que li ou que foram lidas para mim, descrevendo o estudo "Efeito de Fármacos Ototóxicos na Audição de Recém-nascidos de Alto Risco".

Eu discuti com a fonoaudióloga Marília Fontenele e Silva Câmara, sobre minha decisão em participar desse estudo. Ficaram claros para mim quais são os propósitos do estudo, os procedimentos a serem realizados, seus desconfortos e riscos, as garantias de confidencialidade e de esclarecimentos permanentes. Ficou

claro também que minha participação é isenta de despesas e que tenho garantia do acesso a tratamento hospitalar quando necessário. Concordo voluntariamente em participar deste estudo e poderei retirar o meu consentimento a qualquer momento, antes ou durante o mesmo, sem penalidades ou prejuízo ou perda de qualquer benefício que eu possa ter adquirido, ou no meu atendimento neste Serviço.

Assinatura do paciente

Data: __/__/__

Assinatura da testemunha

Data: __/__/__

Declaro que obtive de forma apropriada e voluntária o Consentimento Livre e Esclarecido deste paciente ou representante legal para a participação neste estudo.

Marília Fontenele e Silva Câmara

Fortaleza, Ce

Data: __/__/__

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABE, S.; USAMI, S.; SHINKAWA, H.; KELLEY, P.M.; KIMBERLING, W.J. Prevalent connexin-26 gene (*GJB2*) mutations in Japanese. **J Med Genet.** **37**:41-43, 2000.
- ABRAMOVICH, S.J.; GREGORY, S.; SLEMICK, M.; STEWART A. hearing loss in very low birthweight infants with neonatal intensive care. **Arch. Dis. Child.** **(54)**: 421-426, 1979.
- ABREU-SILVA, R.S; LEZIROVITZ, K.; BRAGA, M.C.; SPINELLI, M.; PIRANA, S.; DELLA-ROSA, V.A.; OTTO, P.A.; MINGRONI-NETTO, R.C. Prevalence of the A1555G (12S rRNA) and tRNA Ser^(UCN) mitochondrial mutations in hearing-impaired Brazilian patients. **Braz. J. Med. Biol. Res., Feb; 39 (2)**: 219-26, 2006.
- ALBERTS, B.; BRAY, D.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WATSON, J.D. – Molecular biology of the cell. Barcelona, **Ediciones Omega S.A.**, 1998.
- ALVES-SILVA, J.; GUIMARÃES, P.E.M.; FERREIRA, A.C.S.; BANDELT, H.J.; PENA, S.D.J.; PRADO, V.F.; The ancestry of brazilian mtDNA lineages. **Am. J. Hum. Genet.** **(67)**: 444-461, 2000.
- AVRAHAN, K.B. Motors, channels and sounds of silence. **Nat. Med.** **3(6)**:608-609, 1997.
- AZEVEDO, M.F. Avaliação Audiológica no primeiro ano de vida. In: LOPES FILHO, O. Ed- **Tratado de fonoaudiologia**. São Paulo, Roca, p239-67, 1997.
- BACINO, C; PREZANT, T.R.; BU, X e tal. Susceptibility mutations in the mitochondrial small ribosomal RNA gene in aminoglycoside induced deafness. **Pharmacogenetics 5**: 165-172, 1995.
- BARBARA, C.W.; BETTY, R.V.; YVONNE, S.S.; JUDITH, E.W.; RICHARD, C.F.; MICHAEL, P.G. *et al.* Identificatio of neonatal hearing impairment: infants with hearing loss. **Ear. Hear.** **21(5)**: 488-507, 2000.
- BASON L.; DUDLEY, T.; LEWIS, K.; SHAH, U.; POTSIC, W.; FERRARIS, A.; FORTINA, P.; RAPPAPORT, E.; KRANTZ, I.D. Homozigosity for the V37I connexin 26 mutation in three unrelated children with sensorineural hearing loss. **Clin. Genet.** **(61)**: 459-464, 2002.
- BEVILACQUA, M.C.; FORMIGONI, G.M.P. Audiologia educacional: Uma opção terapêutica para as crianças deficiente auditiva. Carapicuíba, **pró-Fono**, 86p, 1997.
- BORRADORI, C.; FAWER, C.L.; BUCLIN, T.; CALAME, A. Risk factors of sensorineural hearing loss in preterm infants. **Biol. Neonate** **(71)**: 1-10, 1997.
- CÂMARA, M.F.S. **Audição de recém-nascidos de alto risco**. 1ª edição. Fortaleza-CE. Gráfica Unifor, 1999.
- CARIA, H.; MATOS, T.; OLIVEIRA-SOARES, R.; SANTOS, A.R.; GALHARDO, I.; SOARES-ALMEIDA, L.; et al. A7445G mtDNA mutation present in a Portuguese family exhibiting hereditary deafness and palmoplantar keratoderma. **J Eur Acad Dermatol Venereol.** **Jul;19(4)**:455-8, 2005.
- CARRASQUILLO, M.M.; ZLOTOGORA, J.; BARGES, S.; CHAKRAVARTI, A. Two different connexin 26 mutations in an inbred kindred segregating non-syndromic recessive deafness: implications for genetic studies in isolated populations. **Hum Mol Genet.** **Nov;6(12)**:2163-72. 1997.

- CASANO, R.A; JOHNSON, D.F; BYKHOVSKAYA, Y et al. Inherited susceptibility to aminoglycoside ototoxicity: genetic heterogeneity and clinical implications. **Am J Otolaryngol** **20**: 151-156, 1999.
- CHAMBER HF, SANDE MA. THE AMINOGLYCOSIDES. IN: HARDMAN JG, LIMBIRD LE, MOLINO. PB, RUDDON RW, GILMAN AG (eds). The pharmacological basis of therapeutic, 9th edn. **McGraw-Hill, New York**, pp 1103–1221, 1996.
- CHAPCHAP, M.K. Potencial evocado auditivo de tronco cerebral (PEATC) e das emissões otoacústicas evocadas (EOAE) em unidade neonatal. In: ANDRADE, C.R.F. organizadora. Fonoaudiologia em berçário normal e de risco. São Paulo: LOVISE, p. 169-199, 1996.
- COHN, E.S.; KELLEY, PM.; FOWLER, T.W.; GORGA, M.P.; LEFKOWITZ, D.M., *et al.* Clinical studies of families with hearing loss attributable to mutations in the connexin 26 gene (*GJB2* / *DFNB1*). **Pediatrics** (**103**): 546- 550, 1999.
- COHN E.S.; KELLEY, PM. Clinical phenotype and mutations in connexin 26 (*GJB2* / *DFNB1*), the most common cause of childhood hearing loss. **Am. J. Med. Genet.** (**89**): 130-136, 1999b.
- CRYNS, K.; ORZAN, E.; MURGIA, A.; HUYGEN, P.L.M.; MORENO, F.; DEL CASTILLO, I., *et al.* Genotype-phenotype correlation for *GJB2* (connexin 26) deafness. **J. Med. Genet.** (**41**): 147-154, 2004.
- DAHL, E.; MANTHEY, D.; CHEN, Y.; SCHWARZ, H.J.; CHANG, Y.S.; LALLEY, P.A. Molecular cloning and function expression of mouse connexin 30, a gap junction gene highly expressed in adult brain and skin. **J Biol Chem** **271**: 17903-17910, 1996.
- DECLAU, F.; DOYEN, A.; ROBILLARD, T.; DE VEREBEKE, S.J. Universal Newborn Hearing Screening. **B-ENT. 2005; Suppl 1:16-21; quiz 22-3**, 2005.
- 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. F. Hum. Genet.**, **73(6)**: 1452-8, 2003.
- DEL CASTILLO, 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.; SARTORATO, 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.
- DENOYELLE, F.; WEIL, D.; MAW, M.A.; WILCOX, A.S.; LENCH, N.J.; ALLEN-POWELL, D.R.; OSBORN, A.H.; DAHL, H.H.M.; MIDDLETON, A.; HOUSEMAN, M.J.; DODÉ, C.; MARLIN, S.; BOULILA-ELGAÏED, A.; GRATI, M.; AYADI, H.; BENARAB, S.; BITOUN, P.; LINA-GRANAE, G.; GODET, J.; MUSTAPHA, M.; LOISELET, J.; EL-ZIR, É.; AUBOIS, A.; JOANNARD, A.; LEVILLIERS, J.; GARABÉDIAN, E.N.; MUELLER, R.F. Prelingual deafness: high prevalence of a

- 35delG mutation in the connexin 26 gene. **Hum. Mol. Genet.** **6(12)**:2173-77, 1997.
- DENOYELLE, F.; MARLIN, S.; WEIL, D.; MOATTI, L.; CHAUVIN, P.; GARABEDIAN, E.N.; PETIT, C. Clinical features of the prevalent form of childhood deafness, DFNB1, due to a connexin 26 gene defect: implication for genetic counseling. **Lancet (17)**: 1298- 1303, 1999.
- DI, W.L.; RUGG, E.L.; LEIGHT, I.M.; KELSELL, D.P. Multiple epidermal connexins are expressed in different keratinocyte subpopulations including connexin 31. **Invest Dermatol**, 117: 958-964, 2001.
- EL-SCHAHAWI M, LÓPEZ DE MUNAIN A, SARRAZIN AM, SHANSKE AL, BASIRICO M, SHANSKE S, DIMAURO S. Two large Spanish pedigrees with nonsyndromic sensorineural deafness and the mtDNA mutation at nt 1555 in the 12s rRNA gene: evidence of heteroplasmy. **Neurology. Feb;48(2)**:453-6, 1997.
- ENGEL-YEGER, B.; ZAAROURA, S.; ZLOTOGORA, J.; SHALEV, S.; HUJEIRAT, Y.; CARRASQUILLO, M.; BARGES, S.; PRATT, H. The effects of a connexin 26 mutation – 35delG- on oto-acoustic emissions and brainstem evoked potentials: homozygotes and carriers. **Hearing Res. (163)**: 93-100, 2002.
- ESTIVILL, X.; FORTINA, P.; SURREY, S.; RABIONET, R.; MELCHIONDA, S.; D'AGRUMA, L.; MANSFIELD, E.; RAPPAPORT, E.; GOVEA, N.; MILÀ, M.; ZELANTE, L.; GASPARINI, P. Connexin-26 mutations in sporadic and inherited sensorineural deafness. **Lancet.** **351**:394-98, 1998.
- FISCHEL-GHODSIAN, N.; PREZANT, T.R.; FOURNIER, P.; STEWART, I.A.; MAW, M. Mitochondrial mutation associated with nonsyndromic deafness. **Am. J. Otolaryngol.** **16(6)**:403-8, 1995.
- FISCHEL-GHODSIAN, N. Mitochondrial deafness mutations reviewed. **Hum. Mutat** **13**: 261-270, 1999.
- FORGE, A.; BECKER, D.; CASALOTTI, S.; EDWARDS, J.; MARZIANO, N.; NICKEL, R. – Connexins and gap junctions in the inner ear. **Audiol Neuro-Otol**, 7: 141-145, 2002.
- FORTNUM, H.; DAVIS, A. Epidemiology of permanent childhood hearing impairment in Trent region. **Br. J. Audiol. (31)**: 409-446, 1997.
- GERIDO, D.A. & WHITE, T.W. Connexin disorders of the ear, skin, and lens. **Biochim Biophys Acta**, 1662: 159-170, 2004.
- GREEN, G.E.; SCOTT, D.A.; MCDONALD, J.M.; TEAGLE, H.F.B. *et al.* Performance of cochlear implant recipients with GJB2-related deafness. **Am J Med Genet (109)**:167-70, 2002.
- GRIFFITHS, A.J.F.; MILLER, J.H.; SUZUKI, D.T.; LEWONTIN, R.C.; GELBART, W.M. Introdução à Genética. **Ed. Guanabara Koogan S.A., R. de Janeiro**, P.586-587, 2002.

GUAN, M.X.; ENRIQUEZ, J.A.; FISCHER-GHODSIAN, N.; PURANAM, R.S.; LIN, C.P.; MAW, M.A.; ATTARDI, G. The deafness-associated mitochondrial DNA mutation at position 7445, which affects tRNA^{Ser}(UCN) precursor processing, has long-range effects on NADH dehydrogenase subunit ND6 gene expression. **Mol Cell Biol.** Oct;18(10):5868-79, 1998.

HEREDITY HEARING LOSS HOMEPAGE. <http://webh01.ua.ac.be/hhh/>, consultado em Fevereiro de 2008.

HUTCHIN, T.; HAWORTH, I.; HIGASHI, K.; FISCHER-GHODSIAN, N.; STONEKING, M.; SAHA, N.; ARNOS, C.; CORTOPASSI, G. A molecular basis for human hypersensitivity to aminoglycoside antibiotics. **Nucleic Acids Res. Sep 11;21(18):4174-9**, 1993.

HUTCHIN, T.P.; LENCH, N.J.; ARBUZOVA, S.; MARKHAM, A.F.; MUELLER, R.F. Maternally inherited hearing impairment in a family with the mitochondrial DNA A7445G mutation. **Eur J Hum Genet. Jan;9(1):56-8**, 2001.

JANECKE, A.R.; HIRST-STADLMANN, B.; GUNTHER, B.; UTERMANN, T.; MULLER, T.; LOFFLER, J. Progressive hearing loss associated with GJB2 mutations-phenotypic spectrum and frequencies of GJB2 mutations in Austria. **Hum. Genet. (111): 145-153**, 2002.

JOHNS, DR.R. Mitochondrial and disease. **N. Engl. Med. 333: 638-644**, 1995.

JOINT COMMITTEE ON INFANT HEARING. Year 1994 Position Statement. **ASHA (36): 38-41**, 1994.

JOINT COMMITTEE ON INFANT HEARING. Year 2007 Position Statement: principles and guidelines for early hearing detection and intervention programs. **Pediatrics 120 (4): 898-921**, October 2007.

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.

KARCHMER, M. & ALLEN, T. The functional assessment of deaf and hard of hearing students. **144:68-70**, 1999.

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

KENNA, M.A.; WU, B.L.; COTANCHE, D.A.; KORF, B.R.; REHM, H.L. Connexin 26 studies in patients with sensorineural hearing loss. **Arch. Otolaryngol., Head Neck Surg. (127): 1037-1042**, 2001.

KENNESON, A.; VAN NAARDEN BRAUN, K.; BOYLE, C. GJB2 (connexin 26) variants and nonsyndromic sensorineural hearing loss: a HuGE review. **Genet. Med. (4): 258-274**, 2002.

KIKUCHI, T.; KIMURA, R.S.; PAUL, D.L.; ADAMS, J.C. Gap junctions in the rat cochlea: immunohistochemical and ultrastructural analysis. **Anat. Embryol. (Berl.). 191(2):101-18**, 1995.

- 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(2)**:51-6, 2000.
- KILE, J.E. Identification of hearing impairment in children: a 25-year review. **Infant Todler Intervention.** **3**:155, 1993.
- KOBAYASHI, K.; OQUCI, T.; ASAMURA, K. et al. Genetic features, clinical phenotypes, and prevalence of sensorineural hearing loss associated with the 961delT mitochondrial mutation. **Auris Nasus Larynx** **32**: 119-124, 2005.
- KOKOTAS, H.; PETERSEN, M.B.; WILLEMS, P.J. Mitochondrial deafness. **Clin Genet.** **May**;**71(5)**:379-91. Review, 2007.
- KORKIAMÄKI, T.; YLÄ-OUTINEN, H.; KOIVUNEN, J.; KARVONEN, S.L.; PELTONEN J. Altered calcium-mediated cell signaling in keratinocytes cultured from patients with neurofibromatosis type 1. **Am J Pathol.** **160(6)**:1981-1990, 2002.
- KOUNTAKIS, S.E.; PSIFIDIS, A.; CHANG, C.J.; STIERNBERG, C.M. Risk factors associated with hearing loss in neonates. **Am. J. Otol** **18(2)**: 90-93, 1997.
- KUDO, T.; IKEDA, K.; KURE, S. et al. Novel mutations in the connexin 26 gene (*GJB2*) responsible for childhood deafness in the Japanese population. **Am J Med Genet.**;**90**:141-145, 2000.
- KUPKA, S.; TÓTH, T.; WRÓBEL, M.; ZEISSLER, U.; SZYFTER, W.; SZYFTER, K.; NIEDZIELSKA, G.; BAL, J.; ZENNER, H.P.; SZIKLAI, I.; BLIN, N.; PFISTER, M. Mutation A1555G in the 12S rRNA gene and its epidemiological importance in German, Hungarian, and Polish patients. **Hum Mutat.** **Mar**;**19(3)**:308-9, 2002.
- LAUTERMANN, J.; FRANK, TEN CATE, W.J.; ALTENHOFF, P.; GRUMMER, R.; TRAUB, O., et al. Expression of the gap-junction connexins 26 and 30 in the rat cochlea. **Cell Tissue Res** **294**: 415-420, 1998.
- LEVINGER, L.; MÖRL, M.; FLORENTZ, C. Mitochondrial tRNA 3' end metabolism and human disease. **Nucleic Acids Res** **32(18)**: 5430-41, 2004.
- LI, R.; XING, G.; YAN, M.; CAO, X.; LIU, X.Z.; BU, X.; GUAN, M.X. Cosegregation of C-insertion at position 961 with the A1555G mutation of the mitochondrial 12S rRNA gene in a large Chinese family with maternally inherited hearing loss. **Am J Med Genet A.** **Jan** **15**;**124(2)**:113-7, 2004.
- LI, Z.; LI, R.; CHEN, J.; LIAO, Z.; ZHU, Y.; QIAN, Y.; XIONG, S.; HEMAN-ACKAH, S.; WU, J.; CHOO, D.I.; GUAN, M.X. Mutational analysis of the mitochondrial 12S rRNA gene in Chinese pediatric subjects with aminoglycoside-induced and non-syndromic hearing loss. **Hum Genet.** **Jun**;**117(1)**:9-15, 2005.
- LONSBURY-MARTIN, B.L.; MARTIN, G.K. Serial monitoring for ototoxicity. In: Special Topics in Bases and Applications of Measurements of Otoacoustic Emissions, **Durrant JD (ed), Sem Hear** **22**:377-392, 2001.
- MARLIN, S.; GARABEDIAN, E.N.; ROGER, G.; MOATI, L.; MATHA, N.; LEWIN, P.; PETIT, C.; DENOYELLE, F. Connexin 26 genes mutations in congenitally deaf children: pitfalls for genetic counseling. **Arch. Otolaryngol., Head Neck Surg.** **(127)**: 927-933, 2001.

- MARLIN, S.; FELDMANN, D.; BLONS, H.; LOUNDON, N.; ROUILLON, I.; ALBERT, S. GJB2 and GJB6 mutations. **Arch. Otolaryngol. Head Neck Surg.** (131): 481-487, 2005.
- MARTIN, P.E.M.; COLEMAN, S.L.; CASALOTTI, S.O.; FORGE, A.; EVANS, W.H. - Properties of connexin 26 gap junctional proteins derived from mutations associated with non-syndromal hereditary deafness. **Hum. Mol. Genet.**, 8(13):2369-76, 1999.
- MARTIN, L.; TOUTAIN, A.; GUILLEN, C.; HAFTEK, M.; MACHET, M.C.; TOLEDANO, C.; ARBEILLE, B.; LORETTE, G.; ROTIG, A.; VAILLANT, L. Inherited palmoplantar keratoderma and sensorineural deafness associated with A7445G point mutation in the mitochondrial genome. **Br J Dermatol.** Oct;143(4):876-83, 2000.
- 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. NY Acad. Sci.** 630:16-31, 1991.
- MUELLER, R.F.; NEHAMMER, A.; MIDDLETON, A.; HOUSEMAN, M.; TAYLOR, G.R.; BITNER-GLINDZCIZ, M.; VAN CAMP, G.; PARKER, M.; YOUNG, I.D.; DAVIS, A.; NEWTON, V.E.; LENCH, N.J. Congenital non-syndromal sensorineural hearing impairment due to connexin 26 gene mutations--molecular and audiological findings. **Int J Pediatr Otorhinolaryngol.**50(1): 3-13, 1999.
- OLIVEIRA, J.A.A. Fisiologia Clínica da Audição – Cóclea Ativa In: Lopes Filho O & Campos C.A.H. **Tratado de ORL.** São Paulo: Rocca; p. 510-530, 1994.
- OLIVEIRA, C.A.; CASTRO, S. C. P.; MACIEL-GUERRA, A. T.; SARTORATO, E. L. Report of two siblings with progressive sensorineural hearing loss bearing V37I/V95M mutations in the connexin 26 gene (GJB2). **The Braz. J. Dysmorph. Speech Hear. Disord., Bauru, São Paulo, Brazil** (2) n. 3: 15-18, 1999.
- OLIVEIRA, P.; CASTRO, F.; RIBEIRO, A. Surdez Infantil. **Rev Bras Otorrin** 68(3): 417-423, 2002.
- OLIVEIRA, C.A.; MACIEL-GUERRA, A.T.; SARTORATO, E.L. Deafness resulting from mutations in the GJB2 (connexin 26) gene in Brazilian patients. **Clin Genet** (61): 354-358, 2002.
- OLIVEIRA, C.A.; ALEXANDRINO, F.; SANDES, K.A.; 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. **Human Biology, Detroit** (76) n. 2: 313-316, 2004.
- OLIVEIRA, C.A.; ALEXANDRINO, F.; CHRISTIANI, T.V.; STEINER, C.E.; CUNHA, J.L.; GUERRA, A.T.; SARTORATO, E.L. Molecular genetics study of deafness in Brazil: 8-year experience. **Am J Med Genet A.** 143A(14):1574-9, 2007.
- PANDYA, A.; XIA, X.J.; ERDENETUNGALAG, R.; AMENDOLA, M.; LANDA, B.; RADNAABAZAR, J.; DANGAASUREN, B.; VAN TUYLE, G.; NANCE, W.E.

- Heterogenous point mutations in the mitochondrial tRNA^{Ser(UCN)} precursor coexisting with the A1555G mutation in deaf students from Mongolia. **Am J Hum Genet.** **65(6)**:1803-6, 1999.
- PARK, H.; HOUN HAHN, S.; CHUN, Y.; PARK, K.; KIM, H. Connexin 26 mutations associated with non-syndromic hearing loss. **Laryngoscope**, **110(9)**:1535-1538, 2000.
- PARRA, F.C.; AMADO, F.C.; LAMBERTUCCI, J.R.; ROCHA, J.; ANTUNES, C.; PENA, S.D.J. Color and genomic ancestry in brazilians. **PNAS** **100**: 177-182, 2003.
- PARVING, A. & HAUCH, A.M. The causes of profound hearing impairment in a school for the deaf a longitudinal study. **Br. J. Audiol.** **28(2)**:63-69, 1994.
- PETERSEN, M.B.; WILLEMS, P.J. Non-syndromic, autosomal-recessive deafness. **Clin. Genet.** **(69)**: 371-392, 2006.
- PREZANT, T.R.; AGAPIAN, J.V.; BOHLMAN, M.C.; BU, X.; OZTAS, S.; QIU, W.Q.; ARNOS, K.S.; CORTOPASSI, G.A.; JABER, L.; ROTTER, J.I. Mitochondrial ribosomal RNA mutation associated with both antibiotic - induced and non-syndromic deafness. **Nat. Genet.** **4(3)**:289-294, 1993.
- RABIONET, R.; GASPARINI, P.; ESTIVILL, X. Molecular genetics of hearing impairment due to mutation in gap junction genes encoding beta connexins. **Hum. Mutat.** **16**: 190-202, 2000.
- RABIONET R, ZELANTE L, LOPEZ-BIGAS N, D'AGRUMA L, MELCHIONDA S, RESTAGNO G, ARBONES ML, GASPARINI P, ESTIVILL X. Molecular basis of childhood deafness resulting from mutations in the GJB2 (connexin 26) gene. **Hum Genet.** Jan;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. Mutat.** **3(3)**:243-7, 1994.
- ROBERTSON, N.G.; KHETARPAL, U.; GUTIERREZ-ESPELETA, G.A.; BIEBER, F.R.; MORTON, C.C. Isolation of novel and known genes from a human fetal cochlear cDNA library using subtractive hybridization and differential screening. **Genomics**, **23(1)**:42-50, 1994.
- RODRIGUEZ-BALLESTEROS, M.; OLARTE, M.; AGUIRRE, L.A. et al. Molecular and clinical characterization of three Spanish families with maternally inherited non-syndromic hearing loss caused by the 1494C-T mutation in the mitochondrial 12S rRNA gene. **J. Med. Genet.** **43**: e54, 2006.
- ROIZEN, N.J. Etiology of hearing loss in children. Nongenetic causes. **Pediatr Clin North Am.** **46(1)**:49-64, x. Review, 1999.
- ROSSIGNOL, R.; FAUSTIN, B.; ROCHER, C.; MALGAT, M.; MAZAT, J.; LETELLIER, T. Mitochondrial threshold effects. **Biochem. J.** **370**:751-762, 2003.

- ROUX, A.F.; PALLARES-RUIZ, N.; VIELLE, A.; FAUGERE, V.; TEMPLIN, C.; LEPREVOST, D. et al. Molecular epidemiology of DFNB1 deafness in France. **BMC Med Genet**, 5(5): 1-10, 2004.
- RUBEN, R.J. Communication disorders in children: a challenge for health care. **Prev Med**, 22(4): 585-588, 1993.
- RUSO, ICP. Overview of audiology in Brazil: state of the art. **Audiology**, 39(4):202-206, 2000.
- SALAMY, A.; ELDREDGE, L.; TOOLEY, W.H. Neonatal status and hearing loss in high-risk infants. **J. Pediatr.** (114): 847, 1989.
- SARTORATO, E.L.; GOTTARDI, E.; OLIVEIRA, C.A.; MAGNA, L.A.; ANNICHINO-BIZZACHI, J.M.; SEIXAS, C.A.; MACIEL-GUERRA, A.T. Determination of carrier frequency of the 35delG mutation in Brazilian neonates. **Clinical Genetics**. 58(4):339, 2000.
- SERGI, P.; PASTORINO, G.; RAVAZZANI, P.; TOGNOLA, G.; GRANDORI, F. A hospital based universal neonatal hearing screening programme using click-evoked otoacoustic emissions. **Scand. Audiol.** 30 suppl. (52): 18-20, 2001.
- SEVIOR, K.B.; HATAMUCHI, A.; STEWART, I.A.; BYKHOVSKAYA, Y.; ALLEN-POWELL, D.R.; FISCHER-GHODSIAN, N.; MAW, M. Mitochondrial A7445G mutation in two pedigrees with palmoplantar keratoderma and deafness. **Am. J. Med. Genet.** 75:179-185, 1998.
- SILVA, E.J.C.; LLERENA JR., J.C.; CARDOSO, M.H.C.A. Cad. Saúde Pública, **Rio de Janeiro**, 23(3):627-636, mar, 2007.
- SIMÕES, A.M & MACIEL-GUERRA, A.T. A surdez evitável: predominância de fatores ambientais na etiologia da surdez neurossensorial profunda. **Jornal de Pediatria**. 68:254-257, 1992.
- SINNATHURAY, A.R.; TONER, J.G.; CLARKE-LYTTLE, J.; GEDDIS, A.; PATTERSON, C.C.; HUGHES, A.E. Connexin 26 (GJB2) gene-related deafness and speech intelligibility after cochlear implantation. **Otol. Neurotol.** 25(4): 935-42, 2004.
- TANG, H.Y.; HUTCHESON, E.; NEILL, S.; DRUMMOND-BORG, M.; SPEER, M.; ALFORD, R.L. Genetic susceptibility to aminoglycoside ototoxicity: how many are at risk? **Genet. Med.** 4: 336-345, 2002.
- USAMI, S.; ABE S.; KASAI, M.; SHINKAWA, H.; MOELLER, B.; KENYON, J.B.; KIMBERLING, W.J. Genetic and clinical features of sensorineural hearing loss associated with the 1555 mitochondrial mutation. **Laryngoscope**. 107(4):483-90, 1997.
- USAMI, S.; ABE, S.; AKITA, J.; NAMBA, A.; SHINKAWA, H.; ISHII, M.; IWASAKI, S.; HOSHINO, T.; ITO, J.; DOI, K.; KUBO, T.; NAKAGAWA, T.; KOMIYAMA, S.; TONO, T.; KOMUNE, S. Prevalence of mitochondrial gene mutations among hearing impaired patients. **J Med Genet.** Jan;37(1):38-40, 2000.

- VALKAMA, A.M.; LAITAKARI, K.T.; TOLONEN, E.U.; VAYRYNEN, M.R.; VAINIONPAA, L.K.; KIOVISTO, M.E. Prediction of permanent hearing loss in high-risk preterm infants at term age. **Eur. J. Pediatr.** **159 (6)**: 459-464, 2000.
- VAN CAMP, G.; WILLEMS, P.J.; SMITH, R.J.H. Nonsyndromic hearing impairment: unparalleled heterogeneity. **Am. J. Hum. Genet.** **60**:758-764, 1997.
- VOHR, B.R.; WIDEN, J.E.; CONE-WESSON, B.; SININGER, Y.S.; GORGA, M.P.; FOLSON, R.C. *et al.* Identification of neonatal hearing impairment: characteristics of infants in the neonatal intensive care unit and well-baby nurse. **Ear hear** **21(5)**: 373-382, 2000.
- WALCH, C.; ANDERHUBER, W.; KÖLE, W.; BERGHOLD, A. Bilateral sensorineural hearing disorders in children: etiology of deafness and evaluation of hearing tests. **Int. J. Ped. Otorhinolaryngol** (**53**): 31-38, 2000.
- WATKIN, P.M.; BALDWIN, M.; MACENERY, G. Neonatal at risk screening and the identification of deafness. **Arch. Dis. Child.** (**66**): 1130-1135, 1991.
- WILCOX, S.A.; SAUNDERS, K.; OSBORN, A.H.; ARNOLD, A.; WUNDERLICH, J.; KELLY, T.; COLLINS, V.; WILCOX, L.J.; MCKINLAY GARDNER, R.J.; KAMARINOS, M.; CONE-WESSON, B.; WILLIAMSON, R.; DAHL, H.H. High Frequency Hearing Loss Correlated with mutations in the GJB2 Gene. **Hum. Genet.** **106**: 399-405, 2000.
- WILCOX, E.R.; FEX, J. Construction of a cDNA library from microdissected guinea pig organ of Corti. **Hear Res**, 62(1): 124-6, 1992.
- WILLECKE, K.; EIBERGER, J.; DEGEN, J.; ECKARDT, D.; ROMUALDI, A.; GULDENAGEL, M.; *et al.* Structural and functional diversity of connexin genes in the mouse and human genome. **Biol Chem**, 383: 725-737, 2002.
- XIA, A.; KATORI, Y.; OSHIMA, T.; WATANABE, K.; KIKUCHI, T.; IKEDA, K. Expression of connexin 30 in the developing mouse cochlea. **Brain Res. Apr** **20;898(2)**:364-7, 2001.
- XING, G.; CHEN, Z.; WEI, Q. *et al.* Maternally inherited non-syndromic hearing loss associated with mitochondrial 12S rRNA A827G mutation in a Chinese family. **Biochem. Biophys Res Commun** **344**: 1253-1257, 2006.
- YOSHINAGA-ITANO, C.; SEDEY, A.; COULTER, D.K.; MEHL, A.L. Language of early and later identified children with hearing loss. **Pediatrics.** **102**:1161-1171, 1998.
- YUAN H, QIAN Y, XU Y, CAO J, BAI L, SHEN W, JI F, ZHANG X, KANG D, MO JQ, GREINWALD JH, HAN D, ZHAI S, YOUNG WY, GUAN MX. Cosegregation of the G7444A mutation in the mitochondrial COI/tRNA(Ser(UCN)) genes with the 12S rRNA A1555G mutation in a Chinese family with aminoglycoside-induced and nonsyndromic hearing loss. **Am J Med Genet A.** Oct 1; **138A(2)**:133-40, 2005.
- ZHAO, H.; LI, R.; WANG, Q.; YAN, Q.; DENG, J.H.; HAN, D.; BAI, Y.; YOUNG, W.Y.; GUAN, M.X. Maternally inherited aminoglycoside-induced and nonsyndromic deafness is associated with the novel C1494T mutation in the mitochondrial 12S

- rRNA gene in a large Chinese family. **Am J Hum Genet.** Jan;**74(1)**:139-52. Epub 2003 Dec 12, 2004.
- ZHAO, L.; WANG, Q.; QIAN, Y.; LI, R.; CAO, J.; HART, L.C.; ZHAI, S.; HAN, D.; YOUNG, W.Y.; GUAN, M.X. Clinical evaluation and mitochondrial DNA sequence analysis in two Chinese families with aminoglycoside-induced and non-syndromic hearing loss. **Biochem Biophys Res Commun.** Oct **28**;**336(3)**:967-73, 2005.
- ZHU, Y.; QIAN, Y.; TANG, X.; WANG, J.; YANG, L.; LIAO, Z.; LI, R.; JI, J.; LI, Z.; CHEN, J.; CHOO, D.I.; LU, J.; GUAN, M.X. Aminoglycoside-induced and non-syndromic hearing loss is associated with the G7444A mutation in the mitochondrial COI/tRNA^{Ser(UCN)} genes in two Chinese families. **Biochem Biophys Res Commun.** **342(3)**:843-50, 2006.
- ZELANTE, L.; GASPARINI, P.; ESTIVILL, X.; MELCHIONDA, S.; D'AGRUMA, L.; GOVEA, N.; MILÁ, M.; DELLA MONICA, M.; LUTFI, J.; SHOHAT, M.; MANSFIELD, E.; DELGROSSO, K.; RAPPAPORT, E.; SURREY, S.; FORTINA, P. Connexin 26 mutations associated with the most common form of non syndromic neurosensory autosomal recessive deafness (DFNB1) in Mediterranean. **Hum. Mol. Genet.** **6(9)**:1605-9, 1997.