

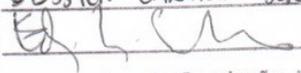


UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

INSTITUTO DE BIOLOGIA

**Jessica Carvalho Bergmann**

**“ESTUDO GENÉTICO EM INDIVÍDUOS  
COM SURDEZ SÚBITA”**

Este exemplar corresponde à redação final  
da tese defendida pelo(a) candidato (a)  
JESSICA CARVALHO BERGMANN  
  
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: Profa. Dra. Edi Lucia Sartorato**

**Co-Orientadora: Profa. Dra. Norma de Oliveira Penido**

Campinas

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

**B454e**

Bergmann, Jessica Carvalho  
Estudo genético em indivíduos com surdez súbita /  
Jessica Carvalho Bergmann. – Campinas, SP: [s.n.], 2008.

Orientadores: Edi Lucia Sartorato, Norma de Oliveira  
Penido.

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

1. Perda auditiva súbita. 2. Genética. 3. Mutação  
35delG . I. Sartorato, Edi Lucia. II. Penido, Norma de  
Oliveira. III. Universidade Estadual de Campinas. Instituto  
de Biologia. VI. Título.

(scs/ib)

**Título em inglês:** Molecular studies of sudden deaf.

**Palavras-chave em inglês:** Hearing loss, sudden; Genetic; 35delG mutation.

**Área de concentração:** Genética Animal e Evolução.

**Titulação:** Mestre em Genética e Biologia Molecular.

**Banca examinadora:** Edi Lucia Sartorato, Manoel de Nóbrega, Mônica Barbosa de Melo.

**Data da defesa:** 20/10/2008.

**Programa de Pós-Graduação:** Genética e Biologia Molecular.

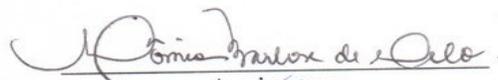
**Campinas, 20 de Outubro de 2008**

**BANCA EXAMINADORA**

Profa. Dra. Edi Lucia Sartorato (Orientadora)

  
Assinatura

Profa. Dra. Mônica Melo

  
Assinatura

Prof. Dr. Manoel de Nóbrega

  
Assinatura

Prof. Dr. Arthur Menino Castilho

\_\_\_\_\_  
Assinatura

Profa. Dra. Vera Lucia Gil da Silva Lopes

\_\_\_\_\_  
Assinatura

“Não sou nada.  
Nunca serei nada.  
Não posso querer ser nada.  
À parte isso, tenho em mim todos os sonhos do mundo...  
... Falhei em tudo.  
Como não fiz propósito nenhum, talvez tudo fosse nada.  
A aprendizagem que me deram,  
Desci dela pela janela das traseiras da casa.  
Fui até ao campo com grandes propósitos.  
Mas lá encontrei só ervas e árvores,  
E quando havia gente era igual à outra.  
Saio da janela, sento-me numa cadeira. Em que hei de pensar?  
Que sei eu do que serei, eu que não sei o que sou?  
Ser o que penso? Mas penso tanta coisa!  
E há tantos que pensam ser a mesma coisa que não pode haver tantos!  
Gênio? Neste momento  
Cem mil cérebros se concebem em sonho gênios como eu,  
E a história não marcará, quem sabe?, nem um,  
Nem haverá senão estrume de tantas conquistas futuras.  
Não, não creio em mim.  
Em todos os manicômios há doidos malucos com tantas certezas!  
Eu, que não tenho nenhuma certeza, sou mais certo ou menos certo?  
Não, nem em mim...  
Em quantas mansardas e não-mansardas do mundo  
Não estão nesta hora gênios-para-si-mesmos sonhando?  
Quantas aspirações altas e nobres e lúcidas -  
Sim, verdadeiramente altas e nobres e lúcidas -,  
E quem sabe se realizáveis,  
Nunca verão a luz do sol real nem acharão ouvidos de gente?  
O mundo é para quem nasce para o conquistar  
E não para quem sonha que pode conquistá-lo, ainda que tenha razão.  
Tenho sonhado mais que o que Napoleão fez.  
Tenho apertado ao peito hipotético mais humanidades do que Cristo,  
Tenho feito filosofias em segredo que nenhum Kant escreveu.  
Mas sou, e talvez serei sempre, o da mansarda,  
Ainda que não more nela;  
Serei sempre o que não nasceu para isso;  
Serei sempre só o que tinha qualidades;  
Serei sempre o que esperou que lhe abrissem a porta ao pé de uma parede sem porta,  
E cantou a cantiga do Infinito numa capoeira,  
E ouviu a voz de Deus num poço tapado.  
Crer em mim? Não, nem em nada.  
Derrame-me a Natureza sobre a cabeça ardente  
O seu sol, a sua chuva, o vento que me acha o cabelo,  
E o resto que venha se vier, ou tiver que vir, ou não venha.  
Escravos cardíacos das estrelas,  
Conquistamos todo o mundo antes de nos levantar da cama;  
Mas acordamos e ele é opaco,  
Levantamo-nos e ele é alheio,  
Saímos de casa e ele é a terra inteira,  
Mais o sistema solar e a Via Láctea e o Indefinido.”  
Fernando Pessoa

## AGRADECIMENTOS

À Profa Dra Edi Lucia Sartorato pela grande oportunidade e confiança e também pela amizade construída nos últimos anos.

À Profa. Dra. Norma de Oliveira Penido pela ajuda e paciência nas terças feiras na UNIFESP, além do incentivo e amizade construída neste período.

À Profa Dra. Marília F. S. Câmara e a Georgia Salles pelo fornecimento de material para a tese e pelo acolhimento em Fortaleza.

Ao Prof. Dr. Carlos Steinner e a Profa. Monica Melo por terem gentilmente aceito participar da pré banca examinadora e contribuído para finalizar este trabalho.

Ao Prof. Manoel de Nóbrega e a Profa. Mônica Melo por terem aceitado participar da banca e fazerem parte do encerramento deste processo.

À todos os funcionários do CBMEG.

À Paula Baloni Andrade (minha irmã gêmea por consideração) pela força e principalmente pela companhia durante todo o meu trajeto no mestrado. Estudamos, começamos e estamos terminando juntas.

À todos do laboratório da genética humana: Frau, Fer II, Fer III, Vanessa, Sueli, Daniboy, Zelo, Paulo, Flavia I, Flavia II, Carol I, Carol II, Carol III, Diego, Francine, Renan, Bruna, Reginaldo, Creyto, Thalita. Pessoal, vocês são demais!!!!

À todos da Escola Paulista de Medicina que me ajudaram: Flavia, Daniel, Nina, Maria Catarina, Maria Auxiliadora. Obrigada pela ajuda.

Aos meus pacientes e a todos os colaboradores responsáveis pelo centro de coleta, que com certeza sem eles, este trabalho não poderia ter sido realizado.

À minha família pela ajuda e suporte: minha mãe que sempre me guiou e a qual sou grata por tudo que sou hoje, a minha avó Octacília que me ajudou a conseguir pacientes, ao meu irmão que mesmo longe trocava experiência e me acalmava, ao meu pai que mesmo sem entender sempre esteve ao meu lado.

Aos meus amigos de São Paulo, pelos momentos gloriosos de descontração.

Aos meus amigos de Campinas, em especial a Isabella que esteve presente em todas as alegrias e angustias e da qual a amizade se faz muito especial.

Agradeço a FAPESP pelo financiamento a minha pesquisa a qual sem a ajuda, o projeto não seria possível.

Lista de Figuras.....	9
Lista de Tabelas.....	11
Abreviaturas.....	12
Resumo.....	14
Abstract.....	15
I. Introdução.....	16
1. A perda Auditiva.....	17
2. Perda Auditiva Sensorio-Neural Súbita (Surdez Súbita).....	17
3. Causas e Classificação da Perda Auditiva.....	19
4. Genética da Perda Auditiva.....	20
4.1. As Proteínas Conexinas.....	21
4.1.1. <i>GJB2</i> : O gene que codifica proteína conexina 26 (Cx26).....	23
4.1.2. A Mutação recessiva 35delG.....	24
4.1.3. Outras mutações do gene <i>GJB2</i> .....	25
4.2. <i>GJB6</i> : O gene que codifica a proteína conexina 30.....	26
4.2.1. As deleções $\Delta(GJB6-D13S1830)$ e $\Delta(GJB6-D13S1854)$ .....	26
4.3. O DNA Mitocondrial.....	27
4.3.1. Mutações em DNA mitocondrial.....	29
4.3.2. Gene <i>MT-RNR1</i> ( <i>12S rRNA</i> ).....	31
4.3.2.1. A Mutação A1555G.....	31
4.3.2.2. A Mutação C1494T.....	34
4.3.2.3. A Mutação 961delT/insC.....	34
4.3.2.4. A Mutação T961G.....	34
4.3.2.5. A Mutação A827G.....	34
4.3.3. Gene <i>MT-TS1</i> ( <i>tRNA<sup>Ser(UCN)</sup></i> ).....	35
4.3.3.1. A Mutação A7445G.....	35
4.3.3.2. A Mutação G7444A.....	36
4.3.4. Gene <i>TRMU</i> : modulação de genes mitocondriais.....	36
5. Etiopatologia da Surdez Súbita.....	38
II. Objetivos.....	43
1. Objetivos Gerais.....	44

1.1. Objetivos Específicos.....	44
III. Casuística e Métodos.....	45
1. Casuística.....	46
1.1. Seleção de Amostra.....	46
1.2. Anamnese e Coleta de Sangue.....	47
1.3. Dados Clínicos.....	47
1.4. Rastreamento de Mutações.....	47
1.5. Grupos.....	47
1.5.1. Grupo A.....	47
1.5.2. Grupo B.....	48
2. Métodos.....	49
2.1.Obtenção do DNA.....	49
2.2. Extração de DNA genômico de sangue periférico.....	49
2.3. Rastreamento da mutação 35delG no gene <i>GJB2</i> .....	50
2.4. Rastreamento das deleções $\Delta(GJB6-D13S1830)$ e $\Delta(GJB6-D13S1854)$ .....	51
2.5. Rastreamento da mutação A1555G.....	52
2.6. Rastreamento da mutação C1494T.....	52
2.7. Rastreamento das mutações G7444A e A7445G.....	52
2.8. Rastreamento das mutações A827G, T961G e 961delT/insC.....	53
2.9. Rastreamento da mutação G28T do gene <i>TRMU</i> .....	53
2.10. Rastreamento de outras mutações no gene <i>GJB2</i> .....	54
2.10.1. Reação de seqüenciamento automático.....	55
2.10.2. Purificação dos produtos de PCR e seqüenciamento.....	55
2.10.3. Análise das seqüências obtidas.....	56
IV. Resultados.....	57
1. Mutação 35delG no gene <i>GJB2</i> .....	63
2. Deleções $\Delta(GJB6-D13S1830)$ e $\Delta(GJB6-D13S1854)$ no gene <i>GJB6</i> .....	63
3. Mutação A1555G na subunidade mitocondrial 12S rRNA.....	64
4. Mutação C1494T na subunidade mitocondrial 12S rRNA.....	65
5. Mutações A827G, T961G e 961delT/insC na subunidade mitocondrial 12S rRNA	

.....	66
6. Mutações G7444A e A7445G nos genes mitocondriais <i>COI/tRNA<sup>SER(UCN)</sup></i> .....	68
7. Gene <i>TRMU</i> .....	69
8. Outras mutações no gene <i>GJB2</i> .....	71
8.1- Polimorfismo V27I.....	71
9. Análise Estatística.....	72
V. Discussão.....	73
1. Avaliação clínica e possíveis etiologias:.....	74
1.1 Hipóteses Vasculares.....	74
1.2. Causas Auto – Imunes.....	75
1.3. Ruptura de Membrana.....	75
1.4. Hipótese Viral.....	76
1.5. Schwannoma Vestibular.....	77
2. Discussão da Análise Genética.....	78
2.1. Mutações no gene <i>GJB2</i> .....	78
2.1.1. Mutação 35delG.....	78
2.2. Mutações do gene <i>GJB6</i> .....	78
3. Mutações Mitocondriais.....	79
3.1. Mutações A1555G e C1494T.....	79
3.2. Mutações A7445G e G7444A.....	79
3.3. Mutações A827G, T961G e 961delT/insC.....	81
4. Mutação no gene <i>TRMU</i> .....	82
5. Polimorfismo V27I.....	82
VI. Conclusão.....	85
VII. Referências Bibliográficas.....	87
VIII. Anexos.....	97

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** – Componentes da orelha externa, média e interna. Modificado de [www.cabuloso.com/anatomia-humana](http://www.cabuloso.com/anatomia-humana).....20
- 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.....22
- Figura 3.** Transporte e reciclagem de íons K<sup>+</sup> na cóclea. Modificado do site: [www.susmedicos.com](http://www.susmedicos.com)..... 24
- Figura 4.** DNA mitocondrial e localização dos genes. Modificado de ©Clinical Tools Inc.....28
- Figura 5.** Comparação da região do DNA 12S rRNA, onde se encontram as mutações A1555G e C1494T. A figura 5a mostra o DNA 16S rRNA da *E.coli*. A figura 5b mostra a ausência de ambas as mutações. A figura 5c mostra a presença da mutação A1555G e ausência da mutação C1494T. A figura 5d mostra a presença da mutação C1494T e ausência da mutação A1555G. Modificado de ZHAO *et al.*, 2005..... 33
- Figura 6.** Estratégia para detecção das deleções  $\Delta(GJB6-D13S1830)$  e  $\Delta(GJB6-D13S1830)$ . Modificado de DEL CASTILHO, 2008..... 51
- Figura 7.** Ciclos utilizados na amplificação do gene *GJB2*.....54
- Figura 8.** Ciclo utilizados na reação de sequenciamento automático..... 55
- Figura 9.** 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.....63
- Figura 10.** Resultado da técnica de PCR para detecção das deleções  $\Delta(GJB6-D13S1830)$  e  $\Delta(GJB6-D13S1854)$ . (L) = marcador *ladder* 100pb Gibco BRL®; (A) indivíduo normal; (B) indivíduo heterozigoto para mutação  $\Delta(GJB6-D13S1830)/N$ ; (C) indivíduo homozigoto para mutação  $\Delta(GJB6-D13S1830)/\Delta(GJB6-D13S1830)$ ; (D) e (E) indivíduo heterozigoto para mutação  $\Delta(GJB6-D13S1854)/N$ .....64
- Figura 11.** Fragmento da subunidade 12S rRNA amplificado pela reação de PCR em gel de agarose 1,5%, corado com brometo de etídeo. (A) ladder de 1Kb GIBCO BRL® e; (B) fragmento de 2060pb..... 64
- Figura 12:** Fragmentos da digestão da subunidade 12S rRNA com a enzima *BsmA* I, em gel de agarose 1,5%, corado com brometo de etídeo. (A) ladder de 1KB GIBCO BRL® e; (M) fragmentos de 1616pb e 444pb de um paciente mutante para a mutação A1555G ..... 65
- Figura 13.** Fragmentos da digestão da subunidade 12S rRNA com a enzima *BsmA* I, em gel de agarose 1,5%, corado com brometo de etídeo. (A) ladder de 1KB GIBCO BRL®; e (N) fragmentos de 1100pb, 516pb e 444pb, de um paciente normal para a mutação A1555G..... 65

- Figura 14.** Fragmentos da digestão da subunidade 12S rRNA com a enzima *Hph* I, em gel de agarose 1,5%, corado com brometo de etídeo. (A) ladder de 1KB GIBCO BRL®; (1) - fragmento digerido (pacientes sem a mutação C1494T). (2) – fragmento digerido. Paciente controle positivo para a mutação C1494T..... 66
- Figura 15.** Fragmentos da amplificação da subunidade 12S rRNA em gel de agarose 1,5%, corado com brometo de etídeo. (A) ladder de 1KB GIBCO BRL® e; (1), (2) e (3) fragmentos de 800pb.....66
- Figura 16a.** Paciente normal para A827G. A seta indica o ponto da mutação, com o nucleotídeo normal adenina (A)..... 67
- Figura 16b.** Paciente mutante para A827G. A seta indica o ponto da mutação (troca de adenina (A) por guanina (G))..... 67
- Figura 17.** Paciente normal para as mutações T961G e 961delT/insC. A seta indica o ponto onde a mutação deveria ocorrer.....67
- Figura 18.** Fragmento do gene *tRNA<sup>Ser</sup>* (UCN) amplificado pela técnica de PCR, em gel de agarose 1,5%, corado com brometo de etídeo. (A) ladder de 1KB GIBCO BRL®; e (B) fragmento de 1821pb..... 68
- Figura 19.** Fragmento da digestão do gene *tRNA<sup>SER(UCN)</sup>* com a enzima *Xba* I, em gel de agarose 1,5%, corado com brometo de etídeo. (A) ladder de 1KB GIBCO BRL®; e (N) fragmentos de 846pb, 540pb e 435pb, de um paciente normal para as mutações G74444 e A7445G..... 68
- Figura 20.** Fragmento da digestão do gene *tRNA<sup>SER(UCN)</sup>* com a enzima *Xba* I, em gel de agarose 1%, corado com brometo de etídeo. (A) ladder de 1KB GIBCO BRL®; e (M) fragmentos de 1386bp e 435bp de um paciente mutante para A7445G.....69
- Figura 21.** Amplificação do fragmento de 467 pares de base para o rastreamento da mutação no gene *TRMU*. (A) ladder de 1KB GIBCO BRL®; e (B) fragmentos de 467bp..... 69
- Figura 22.** Paciente com a mutação G28T em heterozigose. A enzima de restrição *Bsp* 12861 corta o DNA em dois sítios de ligação, dando origem a três fragmentos de 467pb, 336pb e 131pb respectivamente. (A) ladder de 1KB GIBCO BRL®; e (B) fragmentos de 467bp, 336pb e 131pb referente a mutação em heterozigose..... 70
- Figura 23.** Paciente com a mutação G28T em homozigose. A enzima de restrição *Bsp* 12861 corta o DNA em um sítios de ligação, dando origem a dois fragmentos de 336pb e 131pb. (A) ladder de 1KB GIBCO BRL®; e (B) fragmentos de 336pb e 131pb referente a mutação em heterozigose..... 70
- Figura 24.** 3 fragmentos do gene *GJB2* resultantes do PCR. (A) ladder de 1KB GIBCO BRL®; (1) fragmento de 284pb; (2) fragmento de 328pb; (3) fragmento de 255pb..... 71
- Figura 25.** Paciente mutante para V27I. A seta indica o local de substituição de G para A..... 71

## LISTA DE TABELAS

---

<b>Tabela 1.</b> Seqüência de <i>primers</i> para a amplificação do éxon do gene <i>GJB2</i> .....	54
<b>Tabela 2.</b> Indivíduos provenientes da Escola Paulista de Medicina – UNIFESP com perda auditiva súbita (Grupo A Surdo).....	59
<b>Tabela 3.</b> Indivíduos provenientes da Escola Paulista de Medicina – UNIFESP sem perda auditiva (Grupo A Controle).....	60
<b>Tabela 4.</b> Indivíduos provenientes da Fono Audio Clínica – Fortaleza (CE) com perda auditiva (Grupo B surdo).....	61
<b>Tabela 5.</b> Indivíduos provenientes da Fono Audio Clínica – Fortaleza (CE) sem perda auditiva (Grupo B controle).....	62
<b>Tabela 6.</b> Dados genéticos e clínicos dos pacientes que apresentaram mutação.....	105

<b>Ac</b>	Anticorpos
<b>AS-PCR</b>	PCR alelo-específico
<b>ATP</b>	Adenosina Tri-fosfato
<b>cDNA</b>	DNA complementar
<b>Com</b>	<i>Primer</i> comum
<b>CoI</b>	Citocromo oxidase 1
<b>Cx</b>	conexina
<b>dB</b>	decibéis
<b>delG</b>	deleção da base nitrogenada guanina
<b>DASN</b>	Deficiência auditiva sensorio-neural
<b>DFN</b>	<i>Deafness</i> (Surdez)
<b>DFNA</b>	Perda Auditiva Genética não Síndrômica Autossômica Dominante
<b>DFNB</b>	Perda Auditiva Genética não Síndrômica Autossômica Recessiva
<b>DNA</b>	Ácido Desoxirribonucléico
<b>EDTA</b>	Ácido Etileno Diamono Tetracético
<b>EOAs</b>	Emissões Otoacústicas
<b>g</b>	Gramma
<b>GJB</b>	<i>Gap Junction Beta</i> (Junção Comunicante na conformação beta)
<b>Gln</b>	Glutamina
<b>Glu</b>	Glutamato
<b>HAS</b>	Hipertensão Arterial Sistêmica
<b>Hz</b>	Hertz
<b>IVAS</b>	infecção das vias aéreas superiores
<b>K<sup>+</sup></b>	Potássio
<b>LHON</b>	Neuropatia Óptica de Leber
<b>Lys</b>	Lisina
<b>MAI</b>	Meato Acústico Interno
<b>MELAS</b>	Encefalomiopatia mitocondrial, acidose láctica e episódios de acidente cérebro-vascular
<b>MERRF</b>	Epilepsia mioclônica com fibras vermelhas desordenadas
<b>mL</b>	Mililitro
<b>mM</b>	Milimolar
<b>mtDNA</b>	DNA mitocondrial
<b>MT-TS1</b>	<i>Mitochondrially encoded tRNA serine 1</i>
<b>mut</b>	<i>Primer</i> mutante
<b>Na<sup>+</sup></b>	Sódio
<b>NARP</b>	Fraqueza neurogênica, ataxia e retinite pigmentosa
<b>ng</b>	Nanograma
<b>Nor</b>	<i>Primer</i> Normal
<b>PAIR</b>	Perda Auditiva Induzida por Ruído
<b>pb</b>	Pares de base
<b>PCR</b>	<i>Polymorfism Chain Reaction</i> (Reação em cadeia de polimorfismo)
<b>RCD</b>	<i>Red blood cell deformability</i> (Deformidade das células vermelhas do sangue)
<b>RM</b>	Ressonância Magnética
<b>rRNA</b>	RNA ribossômico
<b>ser</b>	serina

## ABREVIATURAS

---

<b>SS</b>	Surdez Súbita
<b>SSI</b>	Surdez Súbita Idiopática
<b>SV</b>	Schwannoma Vestibular
<b>TRMU</b>	<i>5-methylaminomethyl-2-thiouridylate methyltransferase</i>
<b>tRNA</b>	RNA transportador
<b>VVZ</b>	Varicela - zoster
<b>µg</b>	Micrograma
<b>µL</b>	Microlitro
<b>Δ</b>	Deleção

As causas da perda auditiva podem ser genéticas, ambientais ou causadas por comorbidades. As principais comorbidades incluem algumas doenças infecciosas, hematológicas, neurológicas e principalmente o schwannoma vestibular. Por sua vez, a Surdez Súbita caracteriza-se como uma surdez sensorineural de 30dB em pelo menos 3 frequências contínuas, de aparecimento abrupto e sem causa conhecida que pode manifestar-se em qualquer faixa etária, ocorrendo repentinamente ou de forma progressiva em um período de até 72 horas, podendo ser unilateral ou bilateral associado ou não a zumbidos e com menos frequência a tonturas. Foram estudados 38 pacientes e indivíduos controles ouvintes onde 22 são provenientes da Universidade Federal de São Paulo formando o grupo A e 16 são provenientes da Fono Audio Clínica de Fortaleza (CE). O principal objetivo desse projeto foi determinar possíveis causas genéticas da Surdez Súbita nos indivíduos estudados. Para isso foi feito o rastreamento de mutações no gene da conexina 26 (*GJB2*), a detecção das deleções  $\Delta$ (*GJB6-D13S1830*) e  $\Delta$ (*GJB6-D13S1854*) no gene *GJB6* e das mutações A1555G, C1494T, A827G, T961G e 961delT/insC presentes nos genes mitocondriais *MTRNR1* (12S rRNA) e G7444A, A7445G presentes nos genes mitocondriais *COI/MTT51* (tRNA<sup>ser(UCN)</sup>). Foi ainda rastreada a mutação G28T no gene *TRMU*, envolvido na modulação do fenótipo observado em algumas mutações mitocondriais. O sequenciamento automático das amostras foi realizado para detecção de outras mutações no gene *GJB2*. Dentre os indivíduos analisados, não foram encontrados nenhum com mutações genéticas nos genes *GJB2* e *GJB6*. Três indivíduos apresentaram a mutação V27I um polimorfismo ainda sem correlação com a perda auditiva. A mutação G7444A foi encontrada em um indivíduo do grupo controle. Uma vez que esse indivíduo é ouvinte acredita-se que esta mutação isolada não possa causar perda auditiva mesmo associada com as mutações G28T do gene *TRMU* e A827G como foi observado nesse caso. A mutação A827G foi encontrada em 6 indivíduos 3 do grupo surdo e 3 do grupo controle, mas também não pôde ser correlacionada à perda auditiva nesses casos. A mutação G28T do gene *TRMU* foi encontrada em 14 indivíduos, sendo 9 pacientes surdos e 5 indivíduos do grupo controle, porém não foi possível associar essa mutação a perda auditiva. Pelos resultados obtidos nesse trabalho não foi possível a associação da Surdez Súbita com as mutações em nenhum dos genes estudados. Devido à grande heterogeneidade clínica e genética envolvida, ainda não é possível nem excluir ou afirmar a respeito dos aspectos genéticos da Surdez Súbita.

Several factors have been postulated to elicit the etiology of idiopathic sudden sensorineural hearing loss. Sudden deafness is characterized as a sensorineural disturbance, having an abrupt onset and an unknown cause that can be revealed in any age, occurring suddenly or in a progressive way in a 3 day period, of more than 30dB hearing loss at three consecutive frequencies. It can be unilateral or bilateral with tinnitus present and giddiness. In this work 38 patients were studied with their hearing control. Of all these patients, 22 were originating of Federal University of São Paulo São Paulo forming the group A and 16 were from Fono Audio Clinica in Fortaleza (CE) forming the group B. The main objective of this project was to determine possible genetic causes of sudden deafness in patients who lost suddenly their hearing. The main causes of genetic deafness were researched, initiating for the screening of 35delG mutation in the connexin 26 gene (*GJB2*),  $\Delta$ (*GJB6*-D13S1830) and  $\Delta$ (*GJB6*-D13S1854) deletions, A1555G, C1494T, A827G, T961G and 961delT/insC mutation present in mitochondrial gene *MTRNR1* (12S rRNA) and G7444A, A7445G present in mitochondrial gene *COI/MTTS1* (tRNA<sup>ser(UCN)</sup>). Screening for the mutation G28T present in *TRMU* was also made. Then, complete *GJB2* gene was screened for other mutations and polymorphisms. Of all patients analyzed, was not found mutation in genes *GJB2* and *GJB6*. Three patients showed a mutation V27I that is a polymorphism still without relation with hearing loss. The mutation G7444A was found in one individual of the control group. Once that this patient has a normal hearing it is strongly suggestive that this mutation by itself can not cause a hearing loss, even if it is associated with two other mutations, the A827G mutation and G28T (*TRMU*) mutation. The mutation A827G was found in 6 individuals, 3 from deaf patients and 3 from control individuals, but it is not possible to relate this mutation with the hearing loss. The mutation of the gene *TRMU* was found in 14 individuals, being 9 deaf patients and 5 control individuals. Despite of this mutation being in a regulation gene, it is unknown the relation between this mutation and the hearing loss. With these results we can conclude that idiopathic sudden deafness can not be caused by a mutation in any of these genes studied. Shall the large clinical heterogeneity and genetic involved on those cases, is still impossible a certain conclusion. We can not exclude the fact that these mutations can be in regions not studied in this work and related with the hearing loss.



### **1. A perda auditiva**

A perda auditiva é um dos distúrbios sensoriais humanos mais comuns e pode se manifestar em qualquer faixa etária. De acordo com a Academia Americana de Pediatria (2008), a perda auditiva é uma das anormalidades mais comuns presentes ao nascimento ([www.aap.org](http://www.aap.org)).

Em 2005, a Organização Mundial de Saúde (OMS) estimou existir 278 milhões de indivíduos com problemas de audição, sendo mais de 15 milhões no Brasil. No Brasil, a perda auditiva de causa ambiental é predominante (67%), sendo a proporção de casos hereditários de 15%, e os casos de etiologia não esclarecida de 18% (NOBREGA, M, 2005).

A prevalência média da perda auditiva 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% apresenta distúrbios neurossensoriais, 5% distúrbios de condução e 5% apresenta ambos (PARVING, 1994), sendo que em muitos casos é difícil estabelecer sua origem (MORTON, 1991).

Entre as perdas auditivas depois da aquisição da linguagem, pós-linguais, a Surdez Súbita (SS) é encontrada com uma prevalência de 5 a 20 casos em cada 100.000 pessoas por ano (SLATTERY *et al.*, 2005).

### **2. Perda Auditiva Sensório-Neural Súbita (Surdez Súbita)**

A Surdez Súbita (SS) se instala repentinamente ou de forma progressiva dentro de um período de 3 dias, sem etiologia definida e sem antecedentes otológicos (DI NARDO *et al.*, 2002).

Existem muitas definições para Surdez Súbita Idiopática e a mais utilizada define uma perda mínima de 30dB em pelo menos 3 frequências contínuas em até 72 horas. Isso pode variar dependendo da intensidade e frequência (LAZARINI *et al.*, 2006).

LAZARINI E CAMARGO (2006) referem que a instalação repentina ou no decorrer de minutos, horas ou poucos dias, geralmente é unilateral, eventualmente bilateral, podendo vir associada a zumbidos que estão presentes em 70% a 90% dos casos podendo vir associada a tonturas com menos frequência.

O grau da perda auditiva é variável, desde leve até a perda total da capacidade de ouvir sons intensos. Na audiometria tonal são reconhecidos quatro perfis: curva ascendente, curva descendente, curva horizontal e perda total.

A Surdez Súbita, afecção de baixa incidência populacional, até hoje desafia os estudiosos acerca de sua etiologia e fisiopatogenia. Atualmente, considera-se sua etiologia multifatorial, sendo que, suas causas ainda não estão totalmente esclarecidas.

A evolução prognóstica é inconsistente, ora surpreendendo com curas espontâneas parciais ou totais, ora deixando seqüelas graves e definitivas (LAZARINI & CAMARGO, 2006).

Os critérios de diagnóstico para Surdez Súbita mais aceita e precisa foram estabelecidos pelo “Comitê de Estudos em Surdez Súbita do Ministério da Saúde do Japão”, em 1973 (NOMURA, 1998). O diagnóstico inclui critérios maiores e menores.

Os critérios maiores são: perda abrupta de audição; incerteza da causa da surdez e perda auditiva geralmente severa, não flutuante e na maioria das vezes unilateral.

Os critérios menores são: zumbido, que também pode estar ausente; tontura, presente ou ausente e nenhum sinal neurológico a não ser o envolvimento do VIII par craniano.

O diagnóstico de Surdez Súbita é considerado certo quando todos os critérios maiores e menores estiverem presentes; o diagnóstico é considerado provável quando somente os dois primeiros itens dos critérios maiores estiverem presentes (MAIA & KAHALI, 2004).

A controvérsia que existe quanto à forma de tratamento ideal é resultado de uma série de fatores. Por ser afecção de baixa incidência populacional, os trabalhos sobre o tema acabam apresentando casuística com um número de indivíduos relativamente limitados. Apresenta diferentes aspectos quanto a sua incidência, forma de acometimento e as inúmeras variáveis presentes nos indivíduos em geral. Desta forma, os grupos de indivíduos estudados são, além de limitados, heterogêneos nos seus aspectos gerais, o que torna muito difícil comparar resultados de diferentes tratamentos realizados entre os diversos autores estudiosos do tema (MAIA & KAHALI, 2004).

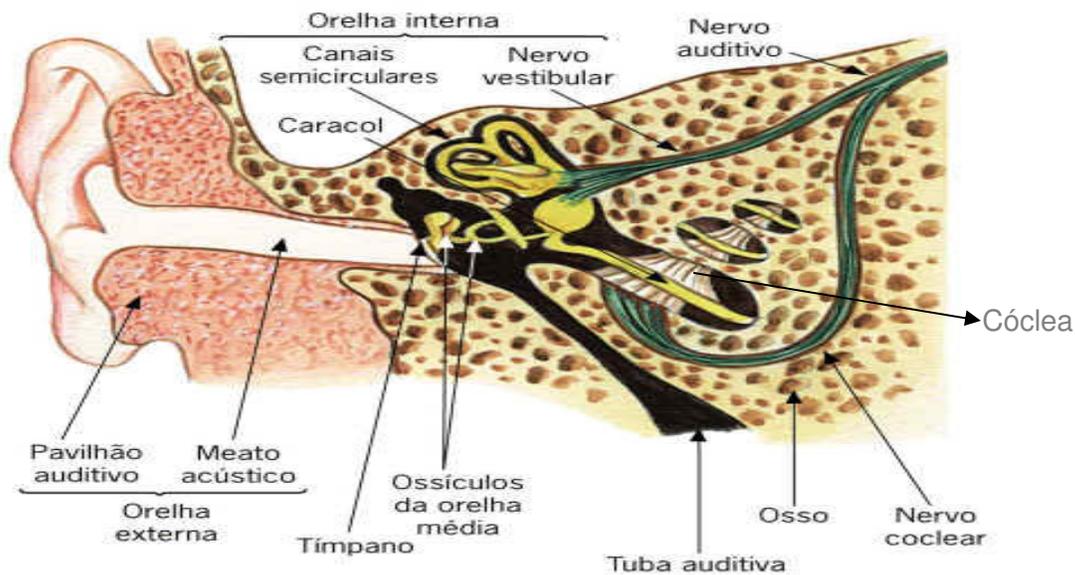
Diferentes tratamentos têm sido descritos, porém, a maioria dos trabalhos não é composta por estudos controlados. Além disso, a taxa de recuperação espontânea ou com

uso do placebo é alta e semelhante aos resultados dos indivíduos tratados com os diversos medicamentos propostos. Entre as medicações usadas, os corticosteróides parecem ter aceitação universal e são os únicos com eficácia comprovada. É comum a utilização de medicações que diminuem a viscosidade sanguínea como dextran ou vasodilatadores como o carbogênio. A utilização de terapias antivirais vem aumentando, porém, os resultados não tem sido satisfatórios. Na verdade, as diversas formas de tratamento existentes refletem as dificuldades encontradas para tratar um indivíduo que não tem um diagnóstico etiológico definido. Por outro lado, a SS deve ser abordada como uma emergência, já que a intervenção precoce é associada com um melhor prognóstico (PENIDO *et al.*, 2005).

### **3. 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, afetando a orelha média ou externa; sensorio-neural (sensorial 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 e 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 25-40dB; moderada (41-55dB); moderada a severa (56-70dB); severa (71-90dB) e profunda (>90dB) (KALATZIS & PETIT, 1998), no entanto, esta classificação varia entre os autores.



**Figura 1** – Componentes da orelha externa, média e interna. Modificado de [www.cabuloso.com/anatomia-humana](http://www.cabuloso.com/anatomia-humana).

As causas da perda auditiva podem ser genéticas, ambientais ou causadas por comorbidades. Segundo RUSSO (2000) as principais comorbidades 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 frequentemente é progressiva e menos grave. (CARRASQUILLO *et al.*, 1997; KALATZIS & PETIT, 1998).

#### 4. 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 sindrômicos e 70% não-sindrômicos. A surdez não-sindrômica é quase exclusivamente monogênica e altamente heterogênea. Acredita-se que mais de 100 genes estejam envolvidos na perda auditiva não-sindrômica, sendo que quase 50 já foram mapeados e clonados, (HEREDITY HEARING LOSS HOMEPAGE, 2008). Esta pode se apresentar em vários padrões de herança: ligadas ao cromossomo X (DFN) 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).

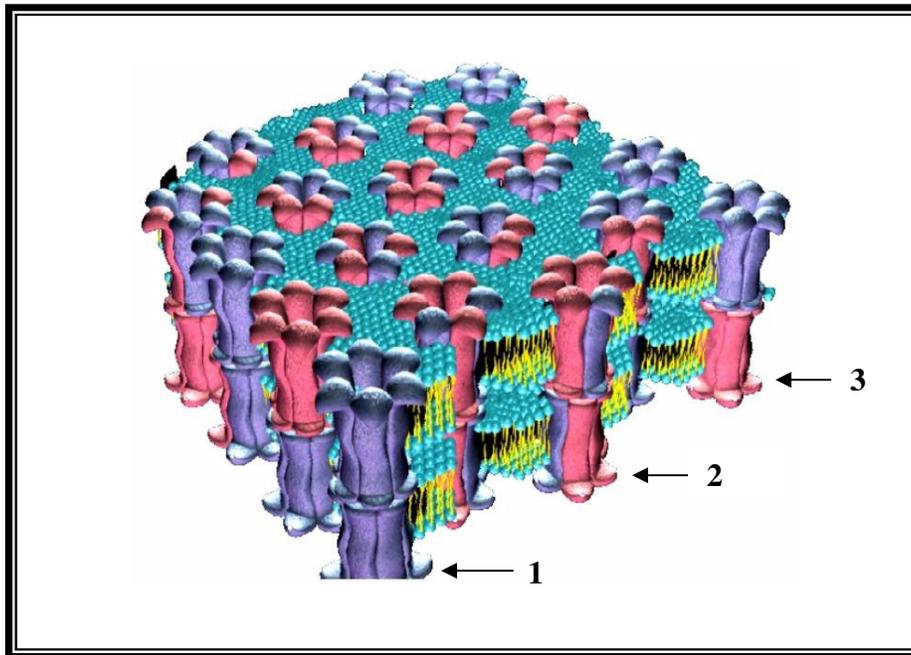
Um dos maiores empecilhos na localização de genes envolvidos na perda auditiva é a dificuldade de acesso à cóclea e às demais estruturas da orelha interna. A construção de um banco de cDNA de material coclear fetal possibilitou o endereçamento de genes candidatos por uma abordagem tecido específica (ROBERTSON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

A cóclea é um dos órgãos mais complexos do ser humano. Como responsável pela audição, utiliza aproximadamente 16.000 células sensoriais ciliadas que dependem, para seu bom funcionamento, da 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).

### **4.1. 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 celular, e para a resposta a estímulos (WILLECKE *et al.*, 2002).

Alguns tipos de proteínas conexas 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 conexas 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 conexas e quando isto ocorre são chamados de heteroméricos. 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 idênticos, são chamados de heterotípicos. (DI *et al.*, 2001; FORGE *et al.*, 2002).



**Figura 2** – Posicionamento dos conéxons nas células mostrando a organização das conexas. 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.

Mutações em genes de conexas representam a principal causa de perda auditiva de origem genética. Podem determinar a perda apresentando um padrão autossômico recessivo (*GJB2* e *GJB3*), autossômico dominante (*GJB2*, *GJB3* e *GJB6*) ou mesmo ligado ao cromossomo X (*GJB1*). Além disso, mutações nestes genes são responsáveis

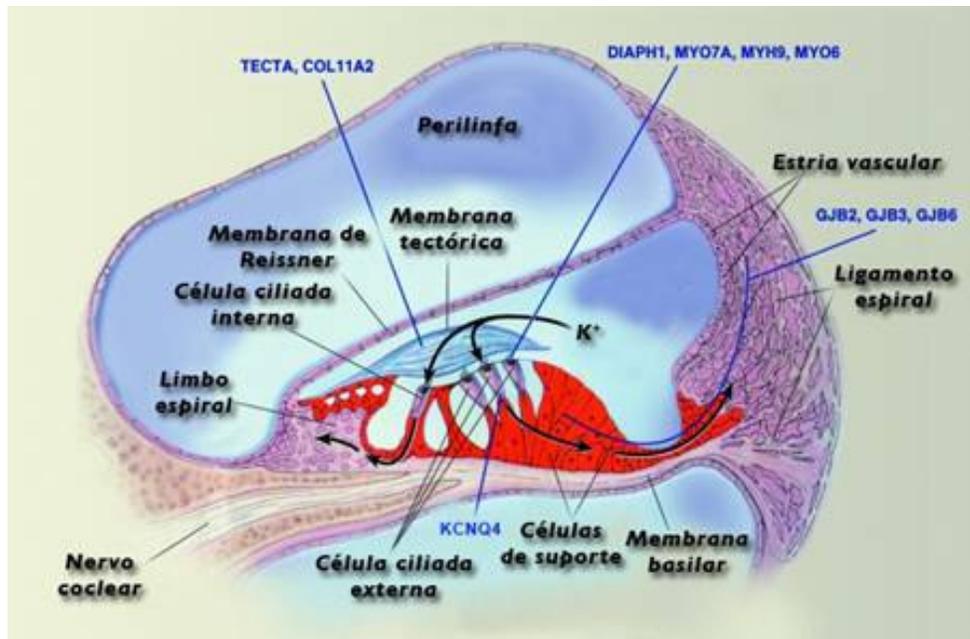
tanto por perda auditiva exibindo formas sindrômicas (*GJB2*, ceratoderma palmoplantar; *GJB3*, eritrodermia *variabilis*; e *GJB1*, neuropatia periférica), quanto não-sindrômicas (*GJB2*, *GJB3* e *GJB6*) (RABIONET *et al.*, 2000). A inabilidade de outras conexinas em compensar a perda da função da conexina mutada é uma característica dos distúrbios relacionados a defeitos nessas proteínas, e pode representar uma falha de comunicação celular mediada pelas *gap junctions* (GERIDO & WHITE, 2004).

### 4.1.1. *GJB2*: O gene que codifica proteína conexina 26 (Cx26)

O gene *GJB2* foi o primeiro gene da família das conexinas a ser identificado. Envolvido na surdez sensorio-neural 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 neurosensoriais (WILCOX *et al.*, 2000).

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 íons potássio que fluem através da endolinfa e entram nas células ciliadas, despolarizando as membranas celulares e iniciando os sinais elétricos que são propagados ao longo do nervo auditivo para o cérebro (Figura 3). A concentração de cátions na endolinfa é balanceada, de modo que a concentração de íons  $K^+$  é alta e a de  $Na^+$  é baixa.



**Figura 3.** Transporte e reciclagem de íons  $K^+$  na cóclea. (Modificado do site: [www.susmedicos.com](http://www.susmedicos.com))

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, situado 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, ambas atingem a endolinfa por meio das junções comunicantes formado por conéxons (ALBERTS *et al.*, 1998) que são reguladas pelos genes codificadores de conexinas.

#### 4.1.2. A mutação recessiva 35delG

A mutação 35delG (antigamente chamada de 30delG) é a deleção da última das 6 guaninas que se estendem da posição 30 até a 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 Cx 26 (DENOYELLE *et al.*, 1997; JANECKE *et al.*, 2002). Deste modo, não há a formação correta da proteína e conseqüentemente há 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% dos casos em que esse gene está envolvido (DENOYELLE *et al.*, 1997; JANECKE *et al.*, 2002; 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 para a mutação 35delG em uma amostra de recém-nascidos era de 0,97% (SARTORATO *et al.*, 2000). Em outro estudo mostrou-se 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 2004, OLIVEIRA e colaboradores, rastream 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, mas estas diferenças não foram significativas.

### **4.1.3. Outras mutações no gene *GJB2***

Além da mutação 35delG, mais de 100 mutações no gene *GJB2* estão envolvidas no fenótipo de surdez não sindrômicas. A mutação 35delG é comum em populações brancas européias (JANECKE *et al.*, 2002; 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 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 da identificação e clonagem do gene *GJB2*, muitos outros genes envolvidos no fenótipo da surdez sensorio-neural não-sindrômica foram localizados e estão sendo estudados, como o gene *GJB6* que codifica a proteína conexina 30 (Cx30).

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

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, 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  $\Delta(GJB6-D13S1830)$  e  $\Delta(GJB6-D13S1854)$  e referem-se à perda de 342 Kb e 232 Kb, respectivamente (DEL CASTILLO *et al.*, 2005).

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

#### **4.2.1. As deleções $\Delta(GJB6-D13S1830)$ e $\Delta(GJB6-D13S1854)$**

As deleções  $\Delta(GJB6-D13S1830)$  e  $\Delta(GJB6-D13S1854)$  resultam no gene *GJB6* defectivo, resultando em prejuízo na tradução da proteína conexina 30. São mutações autossômicas recessivas. Estas deleções podem ocorrer tanto em homozigose como em heterozigose juntamente com mutações no gene *GJB2*, sugerindo possível herança digênica na surdez sensorio-neural não-sindrômica, sendo esta idéia suportada pelo fato de que a 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).

Em 2005, DEL CASTILLO e colaboradores propuseram ainda duas outras hipóteses para esta interação gênica: (1) que estas deleções removeriam elementos *cis* afetando a expressão do gene *GJB2* e (2) possível efeito cumulativo da remoção e haploinsuficiência do *GJB6*.

Em um estudo multicêntrico, publicado em 2003 por DEL CASTILLO e colaboradores, constatou-se que a mutação  $\Delta(GJB6-D13S1830)$  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 pacientes com mutações em heterozigose no gene *GJB2* juntamente com a deleção  $\Delta(GJB6-D13S1854)$  no gene *GJB6*.

Mais de 50 genes nucleares estão envolvidos com a perda auditiva não-sindrômica, mas mutações no DNA mitocondrial (mtDNA) estão também relacionados aos casos de surdez síndrômica e não-sindrômica. O DNA mitocondrial é proveniente de herança materna, uma vez que os espermatozóides não possuem mitocôndria. 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.

### 4.3. O DNA Mitocondrial

O genoma mitocondrial tem 16.569 pares de bases (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 polipeptídios relacionados à cadeia respiratória e 22 tipos de tRNA (JOHNS, 1995).

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



Somente algumas alterações são causadas por mutações em homoplasmia: a neuropatia óptica hereditária de Leber (LHON) e a mutação A1555G que é uma das responsáveis pela surdez não-sindrômica (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).

### 4.3.1. Mutações em DNA mitocondrial

A cóclea é muito sensível a disfunções mitocondriais, porque sua função é altamente dependente de energia e porque as células ciliares não se replicam. O mecanismo exato do dano coclear associado a alterações no mtDNA ainda não está esclarecido. A audição normal é dependente da função das células ciliadas e da estria vascular, que mantém um gradiente iônico necessário para a transdução do som. Ambas, a estria vascular e as células ciliadas são metabolicamente ativas e ricas em mitocôndrias, então podem ser facilmente comprometidas pela disfunção na produção de ATP mitocondrial como uma consequência de mutações no mtDNA. Uma vez que as células ciliadas não se replicam, elas podem conseqüentemente acumular mutações no mtDNA. A interação complexa entre o mtDNA, DNA nuclear e fatores ambientais, fazem as alterações no mtDNA provavelmente causarem surdez também em associação com outros cofatores genéticos ou ambientais (BERRETTINI *et al.*, 2008).

Doenças mitocondriais podem ser causadas por mutações em um dos 60 genes nucleares. Os genes nucleares que codificam essas proteínas mitocondriais não apenas codificam proteínas que regulam a fosforilação oxidativa, mas também proteínas envolvidas na formação de espécies reativas de oxigênio, apoptose, integridade e replicação do mtDNA (KOKOTAS *et al.*, 2007). As mutações também podem ocorrer em um dos 37 genes mitocondriais codificadas pelas proteínas mitocondriais. Como todas as proteínas codificadoras estão envolvidas na fosforilação oxidativa, todas as doenças causadas por mutações no genoma mitocondrial são caracterizadas por uma fosforilação oxidativa defectiva. As mutações geralmente são pontuais. A maioria das mutações do

mtDNA como deleções, duplicações, inserções, inversões ou outras exigem uma complexa reorganização de muitos genes (KOKOTAS *et al.*, 2007).

Com a idade, as células são conhecidas por acumular mutações adquiridas no mtDNA. Isso é causado devido à abundância de moléculas de mtDNA em cada célula (mais de 100 cópias), uma taxa de mutação que é pelo menos 10 vezes maior que no DNA nuclear, e uma falta de reparo do mtDNA. O mecanismo de reparo do DNA é menos desenvolvido na mitocôndria do que no núcleo. O MtDNA é suscetível não apenas para mecanismos ambientais comuns ao DNA nuclear como radiação, mas também aos danos pelas espécies reativas de oxigênio porque sendo este fisicamente perto do sistema de fosforilação oxidativa, resulta em alta atividade moduladora. Mitocôndrias defeituosas tendem a produzir mais espécies reativas de oxigênio que a mitocôndria normal, o que acaba gerando mutações mtDNA adicionais (KOKOTAS *et al.*, 2007). Uma vez que as mutações no mtDNA ocorrem espontaneamente com uma alta incidência e a maioria das mudanças são polimorfismos neutros sem significado clínico, foi criada regras para estabelecer evidências de patogenicidade de novas mutações no mtDNA:

- 1- a mutação não pode estar presente em indivíduos normais do mesmo grupo étnico;
- 2- é necessário alterar um sítio do mtDNA conservado na evolução e que seja funcionalmente importante;
- 3- deve causar deficiência simples ou múltipla na enzima de fosforilação oxidativa;
- 4- deve haver correlação entre o grau de heteroplasmia e severidade clínica.

O último critério é questionável, podendo não ter correlação.

As mutações mitocondriais podem ser herdadas (constitucionais) ou adquiridas (somáticas). Mutações herdadas são geralmente mutações de ponto. Deleções no mtDNA são sempre somáticas e heteroplásmicas. Mutações de ponto podem ser herdadas ou adquiridas estando tanto em homoplasmia como em heteroplasmia. A contribuição das mutações no mtDNA adquiridas é subestimada por estarem presentes em estado mosaico e podem não ser detectadas nos DNAs derivados do sangue (KOKOTAS *et al.*, 2007).

Estima-se que em até 2% da surdez não-sindrômica ocorra herança materna, portanto, relacionada ao mtDNA. Existem dois genes mitocondriais mais envolvidos nos

casos surdez sensorio-neural não-sindrômica: o gene *MTRNR1*, o qual codifica a subunidade 12S rRNA e o gene *MTTS1* codificando o tRNA para Ser<sup>(UCN)</sup>. Esses genes são considerados regiões *hot spots* (com maior probabilidade para sofrer alterações) nas mitocôndrias para a surdez (PREZANT *et al.*, 1993).

### 4.3.2. Gene *MT-RNR1* (12S rRNA)

O gene *MT-RNR1* transcreve o mtDNA 12S rRNA. Diferentes mutações neste gene podem causar surdez não-sindrômica de herança materna, o que em muitos casos é induzida ou agravada por aminoglicosídeos como, por exemplo, a gentamicina, kanamicina e estreptomicina.

Mutações na subunidade 12S rRNA provavelmente alteram a estrutura secundária da molécula 12S rRNA, tornando-o muito semelhante às moléculas 16S rRNA da *Escherichia coli*. Como a molécula 16S rRNA é o alvo principal da ação dos aminoglicosídeos, isto pode explicar o efeito aumentado dos aminoglicosídeos em indivíduos que possuem determinadas mutações, levando à perda auditiva.

#### 4.3.2.1. A Mutação A1555G

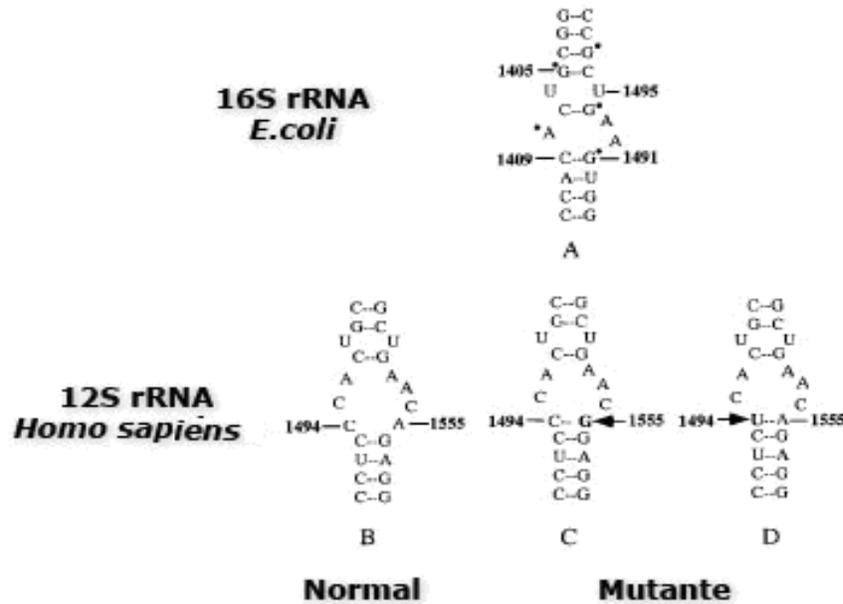
A mutação A1555G do DNA ribossomal 12S rRNA é a troca de uma adenina (A) por uma guanina (G) na posição 1555. A mutação mitocondrial A1555G na subunidade 12S rRNA foi o primeiro defeito molecular identificado como causa de surdez não-sindrômica. Essa mutação foi descrita em 1993 em uma grande família árabe-israelita (PREZANT *et al.*, 1993). Acreditava-se que, algumas mutações mitocondriais inicialmente aparentavam não ter significância clínica, incluindo a A1555G, sendo considerados simples polimorfismos, pela baixa penetrância observada no fenótipo. Entretanto, observou-se que o *background* genético do indivíduo e a associação ao uso de ototóxicos poderiam predispor tais indivíduos à surdez. De fato, o uso de medicamentos aminoglicosídeos somado a mutações em genes mitocondriais com eventual associação a genes moduladores nucleares estão intimamente relacionados à modulação da expressividade e penetrância da surdez em humanos. A mutação A1555G 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).

Antibióticos aminoglicosídeos, tais como, gentamicina, estreptomicina e tobramicina, são drogas importantes no combate de infecções com bactérias gram-positivas aeróbias em infecções crônicas, tais como aquelas associadas à tuberculose e fibrose cística. Esse tipo de antibiótico atua ligando-se ao 16S rRNA, o qual codifica a subunidade menor do ribossomo, interferindo na síntese de proteína bacteriana.

O uso de antibióticos aminoglicosídeos leva a alterações nos sistemas renais, auditivos e vestibulares, devido à concentração da droga nas células tubulares renais e líquidos da orelha interna, como endolinfa e perilinfa. Os danos renais geralmente são reversíveis, mas os auditivos não.

Os ribossomos mitocondriais são mais similares aos ribossomos bacterianos do que os ribossomos citosólicos. Dessa forma, essa similaridade e a alta concentração da droga nos fluidos da orelha interna podem explicar a ototoxicidade dos aminoglicosídeos. Por outro lado, a mutação A1555G na subunidade 12S rRNA está localizada em uma região altamente conservada desse gene, essencial para a codificação da subunidade menor do ribossomo, e importante na atuação do aminoglicosídeo. A posição 1555 em humanos equivale a 1491 do 16S rRNA de *E.coli* (Figura 5) e quando ocorre a mutação de A para G nessa posição, aumenta ainda mais a semelhança entre essas duas subunidades, o 12S rRNA humano e o 16S rRNA bacteriano. Portanto, a mutação A1555G é uma das alterações que predispõe a surdez nos indivíduos que fazem uso dos antibióticos aminoglicosídeos (BALLANA *et al.*, 2006).



**Figura 5.** Comparação da região do DNA 12S rRNA, onde se encontram as mutações A1555G e C1494T. A figura 5a mostra o DNA 16S rRNA da *E. coli*. A figura 5b mostra a ausência de ambas as mutações. A figura 5c mostra a presença da mutação A1555G e ausência da mutação C1494T. A figura 5d mostra a presença da mutação C1494T e ausência da mutação A1555G. Modificado de ZHAO *et al.*, 2005.

A maioria dos casos de surdez não-sindrômica associada com esta mutação é encontrada no estado homoplásmico, no entanto, em 1997, EL-SCHAHAWI e colaboradores descreveram uma família com a mutação A1555G em heteroplasmia, associada à surdez (EL-SCHAHAWI *et al.*, 1997).

Por si só, os aminoglicosídeos ocasionam uma pequena, mas significativa redução nas emissões otoacústicas (EOAs) de humanos. Observa-se diminuição das emissões otoacústicas transitórias (EOATs) em indivíduos submetidos a terapia com sulfato de amicacina por mais de 12 dias. A administração combinada de aminoglicosídeos e diuréticos de alça causa redução das emissões otoacústicas por produto de distorção (EOAPDs) em todos os níveis de estímulos em respostas auditivas de animais (LONSBURY-MARTIN *et al.*, 2001).

### 4.3.2.2. A Mutação C1494T

A mutação C1494T é a troca de uma citosina (C) por uma timina (T) na posição 1494 do mtDNA 12S rRNA. Ela foi encontrada em uma grande família Chinesa (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 à aminoglicosídeos. A mutação fica na mesma região conservada codificadora do 12S rRNA e é estruturalmente equivalente à mutação A1555G (figura 5c). Ou seja, ela também parece ser modulada pelo uso de aminoglicosídeos.

### 4.3.2.3. A Mutação 961delT/insC

Esta mutação é uma deleção de uma única timina (T), com uma inserção de um número variável de citosinas (C) na subunidade 12S rRNA. Esta mutação foi encontrada de maneira esporádica em indivíduos chineses (ZHAO *et al.*, 2004) 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 frequência de 2% entre indivíduos com perda auditiva sensorio-neural, aumentando a possibilidade de uma frequência relativamente alta desta mutação entre populações com perda auditiva.

### 4.3.2.4. A Mutação T961G

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

### 4.3.2.5. 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 da subunidade 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 ou genes nucleares modificadores.

Outro estudo em uma família da Argentina identificou em homoplasmia a transição de um A para um G na posição 827 na subunidade mitocondrial 12S rRNA. Essa evidência sugere que a mutação A827G é uma mutação no mtDNA patogênica que causa uma predisposição à surdez não-sindrômica em famílias Argentinas (CHAIG *et al.*, 2008).

### 4.3.3. Gene *MT-TS1* (*tRNA<sup>Ser(UCN)</sup>*)

Este gene é codificador do *tRNA<sup>Ser(UCN)</sup>* e foi detectado em associação com a perda auditiva sensorio-neural em famílias de várias regiões e descendências diferentes. Cinco mutações associadas à surdez não-sindrômica foram identificadas neste gene: A7445G, G7444A, 7472insC, T7510C, T7511C.

#### 4.3.3.1. A Mutação A7445G

A mutação A7445G é uma troca de uma adenina (A) por uma guanina (G) na posição 7445 do gene *tRNA<sup>Ser(UCN)</sup>*. 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; ZHAO *et al.*, 2004; SEVIOR *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 ceratoderma palmoplantar (MARTIN *et al.*, 2000). Esta mutação estava presente nas famílias em homoplasmia, heteroplasmia ou em formas combinadas de homo e heteroplasmia. A penetrância também variou bastante.

A mutação A7445G esta localizada no *stop* códon (AGA) do mRNA que codifica o *COI* (Citocromo oxidase1), 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 *COI*. A posição 7445 flanqueia a região terminal 3' mas não faz parte do gene *tRNA<sup>Ser(UCN)</sup>* 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 redução no nível de

tRNA. Esta mutação, na fita pesada (H), resulta em uma mudança silenciosa no *stop* códon. (KOKOTAS *et al.*, 2007).

### 4.3.3.2. A Mutação G7444A

Esta mutação caracteriza-se pela troca de uma guanina (G) por uma Adenina (A) na posição 7444 do gene *COI* precursor do *tRNA<sup>Ser(UCN)</sup>*. Foi encontrada em diferentes famílias Chinesas, sendo alguns do grupo controle (PADYA *et al.*, 1999). Também foi encontrado em 2 indivíduos brasileiros pertencentes ao grupo controle em homoplasmia com descendência Africana (ABREU-SILVA *et al.*, 2006).

A perda auditiva em algumas destas famílias era não-sindrômica, e em alguns casos relacionada à Neuropatia Óptica Hereditária de Leber (LHON) (BROWN *et al.*, 1995). Esta mutação pode aparecer em homoplasmia, heteroplasmia ou ambas, e a penetrância pode variar dependendo do caso.

A mutação G7444A resulta em uma leitura errada do *stop* códon AGA da mensagem *COI* da fita H do mtDNA, adicionando três aminoácidos (Lys-Gln-Lys) a região C terminal do polipeptídeo (PADYA *et al.*, 1999; YUAN *et al.*, 2005). Porém, o polipeptídeo mutado pode permanecer parcialmente funcional. Alternativamente, a mutação G7444A é adjacente ao sítio terminal 3' do processo endonucleolítico da fita L do RNA precursor, transpondo o *tRNA<sup>Ser(UCN)</sup>* e o mRNA ND6 (LEVINGER *et al.*, 2004; GUAN *et al.*, 1998). A mutação G7444A no precursor do *tRNA<sup>Ser(UCN)</sup>* leva falha no processamento do RNA precursor da fita leve L, causando diminuição do nível estável do *tRNA<sup>Ser(UCN)</sup>* e disfunção mitocondrial (GUAN *et al.*, 1998; LI *et al.*, 2005).

### 4.3.4. Gene *TRMU*: modulação de genes mitocondriais

Recentemente, tem sido proposto um modelo de interação entre genes nucleares e mitocondriais em levedura *Saccharomyces cerevisiae*. Nessas espécies, alelos mutantes dos genes nucleares *MTO1*, *Mss1* e *Mto2* que codificam proteínas mitocondriais, manifestaram deficiência no fenótipo estudado quando associados à mutação mitocondrial C1409G no gene 16S rRNA (C1494T no gene 12S rRNA em humanos). Em *E.coli* o produto do gene *mnmE*, *gidA* e *TRMU*, cujos homólogos humanos são *MSSI*, *MTO1* e *MTO2* respectivamente, estão envolvidos com a síntese no nucleotídeo

hipermodificado 5-metil-aminometil-2-tio-uridina ( $\text{mnm}^5\text{s}^2\text{U34}$ ). A modificação desse nucleotídeo é observada no anti-códon dos tRNAs de glutamato, lisina e glutamina, tanto em humanos quanto em bactérias, com a finalidade da estabilização estrutural, aminoacetilação e reconhecimento do códon correspondente na subunidade menor do RNA ribossômico. O gene *TRMU*, por sua vez, é responsável pela posterior 2-tiolização do  $\text{mnm}^5\text{s}^2\text{U34}$  dos tRNA<sup>Lys</sup>, tRNA<sup>Glu</sup> e tRNA<sup>Gln</sup>, em levedura, bactérias e humanos. Experimentos demonstraram que o gene *TRMU* humano complementa o fenótipo deficiente em leveduras mutantes *mto2*, carregando também a mutação C1409G no gene *15S rRNA* (GUAN *et al.*, 2006; BRÉGEON *et al.*, 2001).

Correlacionando diversos experimentos com genes moduladores em levedura e bactéria, pesquisadores observaram que o gene *TRMU* modula a expressão do fenótipo das mutações A1555G e C1494T na subunidade 12S rRNA da mitocôndria humana. O gene *TRMU* codifica a 5-metilaminometil-2-tiouridilato-metiltransferase, responsável pela biossíntese da 5-taurinometil-2-tiouridina ( $\text{tm}^5\text{s}^2\text{U}$ ) dos tRNA<sup>Lys</sup>, tRNA<sup>Glu</sup> e tRNA<sup>Gln</sup> mitocondriais. O  $\text{tm}^5\text{s}^2\text{U}$  é posteriormente modificado para  $\text{mnm}^5\text{s}^2\text{U34}$  nas mesmas posições dos tRNAs de *E. coli* e de mitocôndrias humanas. Esta modificação contribui para a alta fidelidade e estabilização funcional dos tRNAs. A falha na 2-tio modificação resulta em tRNAs não modificados, deixando-os mais expostos a degradação e portanto, levando a uma redução na taxa de tradução mitocondrial, embora não o suficiente para produzir um fenótipo clínico. As mutações A1555G e C1494T estão localizadas no sítio de codificação aminoacil-tRNA (sítio A) do ribossomo mitocondrial, onde a interação códon/anti-códon ocorre e é onde o aminoglicosídeo interage. Dessa forma, as mutações A1555G e C1494T provocam uma mudança conformacional do sítio A do 12S rRNA, tornando menos eficiente a interação nesse sítio dos tRNAs hipermodificados pelos genes *TRMU*, *MTO1* e *GTPBP3* (GUAN *et al.*, 2006).

Alterações em genes modificadores agravam as disfunções mitocondriais causadas por mutações na subunidade 12S rRNA, havendo portanto, uma relação sinérgica entre os genes mitocondriais, genes modificadores nucleares e o uso de antibióticos aminoglicosídeos no fenótipo da surdez (BYKHOVSKAYA *et al.*, 2004; YAN *et al.*, 2005; WEISS-BRUMMER *et al.*, 1989).

### 5. Etiopatologia da Surdez Súbita

PROSPER MÉNIÈRE foi o primeiro autor a descrever claramente um caso de perda auditiva sem causa definida em 1861. DE KLEIN, em 1944 foi o primeiro a reportar um estudo clínico com 21 indivíduos com o termo Surdez Súbita Idiopática (SSI), ou seja, uma surdez espontânea e de causa desconhecida, listando entre causas de perda auditiva as hemorragias da orelha interna, inflamações agudas e crônicas, etc. Outros autores como RASMUSSEN, FOWLER e HALLBERG relatam casos de SS, evidenciando a origem vascular e a neurite do VIII par craniano como possíveis causas. Segundo esses autores uma doença como trombose, poderia justificar a perda auditiva, mas a faixa etária não era compatível. Outros estudos foram realizados tentando justificar a causa da SSI e teorias foram criadas como as causas auto-imunes, onde MCCABE, em 1979 associa a SS com a deficiência auditiva sensorio-neural (DASN) progressiva com doenças auto-imunes. Nem sempre identificadas, doenças como artrite reumatóide, lúpus, poliarterite nodosa e outras provavelmente medeiam o processo com anticorpos (Ac) e imunocomplexos, e poderiam estar envolvidas com a origem da perda auditiva súbita (LAZARINI *et al.*, 2006).

A Surdez Súbita atinge 5 a 20 pessoas em cada 100 mil indivíduos por ano. Estima-se que há aproximadamente 15 mil novos casos por ano no mundo (LAZARINI *et al.*, 2006).

A SS deve ser considerada um sintoma, não uma entidade clínica, já que pode ser causada por mais de 60 doenças diferentes. É um sintoma dramático tanto para o paciente quanto para o médico que o atende e, apesar de todo o avanço em métodos de diagnóstico, ainda causa desafios em relação à confirmação etiológica e às possibilidades terapêuticas (KOSUGI *et al.*, 2004).

No Brasil não se tem uma boa referência epidemiológica quanto à real incidência de SS devido à dificuldade em avaliar a incidência desta doença. A baixa situação cultural e socioeconômica, assim como a possibilidade de recuperação espontânea antes da procura de ajuda médica ou o descaso frente aos leves sintomas contribuem para isso (LAZARINI & CAMARGO, 2006). Vários autores relatam que a recuperação espontânea ocorre em 45 a 60% dos pacientes. Numa forma mais detalhada, estima-se que cerca de 25% destes pacientes tem recuperação espontânea total; 50% parcial e 25% nenhuma recuperação (VASAMA & LINTHICUM, 2000).

A Surdez Súbita é considerada emergência médica e o tratamento imediato está associado a uma melhor evolução, assim como o prognóstico pode esclarecer à sua etiologia.

Estudos recentes mostram que em 10-15% dos casos, consegue-se chegar ao diagnóstico de certeza, podendo variar os fatores etiológicos (LAZARINI & CAMARGO, 2006). Diante de várias hipóteses criadas para se explicar a causa da Surdez Súbita, as mais promissoras são:

1. Hipótese vascular: O fato de a cóclea ser suprida principalmente por uma única artéria, a artéria labiríntica, e esta ser uma artéria terminal, torna a orelha interna muito suscetível a alterações circulatórias. Assim, a hipótese vascular torna-se plausível. Qualquer obstrução, completa ou parcial, do fluxo sanguíneo, imediatamente repercute no metabolismo oxidativo da orelha interna. A obstrução acarretaria uma hipóxia ou mesmo anóxia celular que leva a uma diminuição da produção de ATP, acidose intracelular e acúmulo de radicais livres. Esses três últimos processos alteram o mecanismo enzimático celular levando a necrose e a morte celular (MONSIEUR *et al.*, 1997). Um dos mecanismos fisiopatológicos vasculares descritos é o aumento da viscosidade sanguínea. Esta hiperviscosidade acarreta uma diminuição do fluxo sanguíneo capilar que acaba por diminuir o transporte de oxigênio levando a hipóxia tecidual. Estudo de viscosidade sanguínea e plasmática realizada em grupos de pacientes com Surdez Súbita, comparados com a viscosidade de grupos controles normais, demonstram valores significativamente maiores nos portadores de Surdez Súbita (OHINATA *et al.*, 1994). Contudo, se a SS fosse causada por uma doença vascular, seria razoável acreditarmos que os fatores de risco e faixa etária para ambas também fossem similares, porém não o são.

2. Causas auto-ímmunes: A presença de doença auto-ímmune pode contar a favor como causa de perda auditiva súbita ou progressiva, devido à presença de anticorpos contra antígenos da orelha interna e formação de imunocomplexos na estria vascular, ducto e saco endolinfático. Devido à dificuldade de documentação anatomopatológica, a doença auto-ímmune, está entre as possíveis causas de SS sendo um dos quadros mais controversos na literatura (LAZARINI & CAMARGO, 2006).

3. Ruptura de Membranas: Considera-se que a ruptura ocorre em resposta a mudanças repentinas na pressão intra labirinto por esforço físico. Também é considerado que mistura entre a endolinfa e a perilinfa na região da ruptura da membrana resulta em perda na função coclear. Existem vários argumentos que indicam que a ruptura de membrana do labirinto não é causa comum de SS, incluindo evidências clínicas, experimentais e histopatológicas (MERCHANT *et al.*, 2008).

4. Hipótese viral: A hipótese de processo viral como desencadeante da Surdez Súbita é bastante aceita e discutida na literatura mundial. Considerando-se o vírus como possível causa, sugere-se que o agente responsável tenha ampla distribuição no corpo humano, além de afinidade com o tecido nervoso. Existem dois mecanismos que foram propostos para explicar como uma infecção viral pode resultar em uma SS: através de ataques agudos ou latentes podendo, então, gerar danos na orelha interna e conseqüente perda auditiva. As infecções de vias aéreas superiores (IVAS) e as infecções intracranianas podem alcançar a orelha interna via estria vascular (hematogênica) e via aqueduto colear ou meato acústico interno MAI. Poucos casos, porém, apresentam meningoencefalites associada à perda auditiva, pois o aqueduto coclear apresenta mecanismos de defesa que impedem a propagação do agente viral para a orelha interna, diminuindo o risco de lesão estrutural e conseqüente perda auditiva (LAZZARINI & CAMARGO *et al.*, 2006). Embora infecções agudas por vírus possam causar tal dano, infecções latentes e sua reativação também parecem explicar a lesão. Os principais vírus latentes fazem parte do grupo do Herpesvirus: são unbíquos, apresentam forte neuro tropismo como característica, nem sempre causam sintomatologia e tem complexa relação com SS. São eles o herpes simplex, herpes simplex 2, varicella-zoster (VVZ), citomegalovírus e Epstein-Barr (LAZZARINI & CAMARGO, 2006).

Apesar de a vascularização coclear ser equivalente nas orelhas normais e nas com SS, nota-se que há mais alterações histopatológicas nas cócleas afetadas do que nas normais ou até mesmo nas afetadas pela presbiacusia (VASANA & LINTHICUM, 2000). Apesar das semelhanças, algumas evidências são ainda contraditórias quanto ao fato do vírus poder ser um fator causal desta manifestação clínica. Nem sempre se consegue estabelecer relação causal direta do vírus, pois os títulos de anticorpos podem não estar alterados de maneira significativa numa SS supostamente causada por agente viral,

devido, talvez, ao fato de poder ser uma infecção latente reativada. Além disto, mesmo que um estudo consiga demonstrar que determinado vírus ou bactéria infectou o paciente não se pode provar que este agente seja o responsável naquele momento pela lesão estrutural da orelha interna (BERROCAL *et al.*, 2000)

5. Schwannoma Vestibular (SV): O SV é considerado causa em 1% dos casos de SS (KOSUGI *et al.*, 2004). Também conhecido como neuroma ou neurinoma do acústico é o tumor mais freqüente do ângulo ponto cerebelar correspondendo, aproximadamente a 9% de todos os tumores intracranianos. Esse tumor é benigno e cresce a partir das células de Schwann, mais freqüentemente na divisão superior do nervo vestibular. Cresce lentamente em direção ao ângulo ponto cerebelar, comprimindo o VIII nervo craniano e alargando o meato acústico interno (FUKADA *et al.*, 1993).

Estudos de caso de KOSUGI *et al.*, (2004) assim como o de NASCENTES *et al.*, (2007) e um trabalho de RAMOS *et al.*, (2005) relatam a importância do estudo pela Ressonância Magnética (RM) em pacientes com SS. O sintoma inicial em cerca de 10% dos pacientes com SV é a SS. No entanto, a baixa prevalência desse tumor entre os pacientes com SS e o alto custo da RM são fatores que tem desestimulado o seu uso. KOSUGI *et al.*,(2004) em sua pesquisa apresentam uma incidência de 6,1% de SV em casos de SS, contra 1% encontrado anteriormente na literatura, essa alta incidência devido à realização de RM em todos os pacientes com SS.

Reconhecer, dentre os indivíduos que apresentam SS, quais deles são decorrentes de SV, ainda é grande desafio ao clínico. Não há evidências clínicas que nos permitem separar seguramente quais são os casos de SS devido a SV e quais não são (KOSUGI *et al.*, 2004).

A baixa incidência da SS, e o difícil acesso à orelha interna para melhores esclarecimentos quanto aos estudos diagnósticos e a fisiopatogenia desconhecida dificultam maiores conclusões quanto à própria origem desta manifestação clínica. Uma vez que não se tem um conhecimento exato sobre as causas da Surdez Súbita, deve-se considerar que o estudo genético, com o intuito de pesquisar mutações que poderiam causar esta perda auditiva súbita em algum momento da vida seja importante devido a

grande incidência de mutações que podem levar à surdez e também pelo fato de ser uma área muito pouco estudada, não havendo trabalhos conclusivos a respeito.

A etiopatogenia da SS não é ainda esclarecida, tornando o assunto bastante controverso. A identificação da etiologia da perda auditiva súbita é de extrema importância para o seu prognóstico. É importante identificar sua causa para direcionar as medidas que devem ser tomadas no sentido de prevenir ou retardar o início da surdez, e ainda, orientar as famílias quanto ao processo de aconselhamento genético sobre os riscos de ocorrência e recorrência da surdez em seus descendentes. O estudo genético da perda auditiva tem esclarecido cada vez mais os pesquisadores acerca do complexo mecanismo da audição, assim como tem possibilitado o diagnóstico etiológico.



### 1. Objetivos gerais:

Verificar se os casos de perda auditiva sensorio-neural súbita sem etiologia esclarecida estão relacionados a alterações em genes específicos.

#### 1.1 - Objetivos específicos:

- Analisar as amostras de indivíduos com Surdez Súbita quanto à presença das mutações em diferentes genes, na seguinte ordem:
  1. Mutação 35delG no gene *GJB2*;
  2. Deleção  $\Delta$ (GJB6-D13S1830) e  $\Delta$ (GJB6-D13S1854) no gene *GJB6*;
  3. Mutações no gene mitocondrial *MTRNR1* (12S rRNA): A1555G, C1494T, A827G, T961G e 961delT/insC;
  4. Mutação G7444A e A7445G nos genes mitocondriais *COI/MTTS1* (tRNA<sup>ser(UCN)</sup>);
  5. Mutação G28T no gene nuclear *TRMU*;
  6. Mutações nos genes *GJB2* nos casos em que não foi detectada a mutação 35delG.



### **1. Casuística**

De acordo com as normas regulamentadoras de pesquisa em seres humanos, resolução 196/96 do Ministério da Saúde, o projeto referente ao presente estudo foi encaminhado ao Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP) em São Paulo (Anexo III).

Foram coletadas amostras de sangue de 22 pacientes com Surdez Súbita e 21 amostras de sangue de indivíduos do grupo controle no Departamento de Otorrinolaringologia da Universidade Federal de São Paulo – Escola Paulista de Medicina. Foram também atendidos pela clínica particular Fono Áudio Clínica situada em Fortaleza – CE, 16 pacientes com diagnóstico de Surdez Súbita, além de 16 indivíduos controles.

#### **1.1. Seleção da amostra**

Os indivíduos que concordaram em participar receberam explicações dos objetivos do estudo, bem como, seus benefícios e riscos. Como benefício, tentou-se esclarecer as causas da Surdez Súbita, direcionando-os ao tratamento mais adequado. O critério de inclusão no estudo foi perda auditiva sensorio-neural maior que 30dB em três frequências contínuas em até 72 horas. Os indivíduos foram submetidos a diversos testes: audiometria tonal e vocal, impedanciometria com pesquisa dos reflexos e teste de reconhecimento de fala. Uma vez que a causa não pôde ser estabelecida, aventou-se a necessidade de se fazer pesquisa genética para se tentar encontrar a causa da surdez. Os critérios de exclusão foram pacientes que não se enquadravam nesta faixa de perda auditiva na audiometria ou onde através de teste sanguíneo ou anamnese foi encontrada uma causa à perda súbita.

Foi esclarecido, que a participação no estudo era voluntária podendo haver desligamento da pesquisa em qualquer etapa que desejasse e que o material obtido somente seria utilizado para a finalidade do estudo. Depois de esclarecidos os objetivos, benefícios e riscos, os indivíduos assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (Anexo II), respeitando todos os preceitos bioéticos de autonomia, beneficência, não maleficência e justiça envolvendo seres humanos em pesquisa, conforme Resolução 196/1996 do Conselho Nacional de Saúde.

### **1.2. Anamnese e Coleta do Sangue**

Após assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido foi agendado o dia de realização da anamnese e a coleta de sangue. A anamnese, com os seguintes variáveis: dados de identificação, tratamento realizado e dados audiológicos foram realizada pelas pesquisadoras. A coleta do sangue foi realizada por médica patologista e ocorreu da forma mais segura possível utilizando materiais descartáveis para proteger e minimizar os riscos que o procedimento expõe os indivíduos participantes do estudo. A anamnese e a coleta foram agendados e ocorreram no mesmo dia.

Os pacientes foram divididos em 2 grupos:

A – Pacientes provenientes do Departamento de Otorrinolaringologia da Universidade Federal de São Paulo – Escola Paulista de Medicina;

B – Pacientes provenientes da clínica particular Fono Audio Clínica de Fortaleza – Ceará;

Para cada grupo com Surdez Súbita foi selecionado um grupo controle pareados por sexo e por idade. Todos os indivíduos do grupo controle foram submetidos a testes audiométricos e de imitanciometria e puderam fazer parte da pesquisa quando os resultados apresentaram limiares auditivos normais.

### **1.3. Dados Clínicos**

Os dados informados na anamnese foram colocados em gráficos (Anexo I).

### **1.4. Rastreamento de mutações**

Os exames moleculares foram realizados nos 2 grupos de pacientes e seus controles. Em todos os pacientes onde alguma mutação foi observada, os exames foram repetidos com o objetivo de se evitar falsos positivos. Os pacientes cujo resultado foi positivo para alguma mutação foi encaminhado para o aconselhamento genético.

### **1.5. Grupos**

#### **1.5.1. Grupo A**

O grupo A, constitui-se de pacientes provenientes do Departamento de Otorrinolaringologia da UNIFESP. Este grupo é constituído de pacientes com Surdez

Súbita (SS) e indivíduos controles (C). O critério para inclusão no estudo foi perda auditiva sensorio-neural maior que 30dB em pelo menos três frequências adjacentes com instalação súbita ou no máximo em até três dias. Todos os pacientes submeteram-se a um protocolo padrão, para investigação etiológica, receberam também o mesmo tratamento e foram seguidos no mínimo por um ano.

A avaliação auditiva foi constituída por audiometria tonal e vocal, impedanciometria com pesquisa dos reflexos e teste de reconhecimento de fala. Além do momento inicial, os testes foram repetidos semanalmente no primeiro mês, mensalmente até o sexto mês e depois semestralmente. Os exames laboratoriais iniciais incluíam hemograma completo, glicemia de jejum, colesterol total e frações, dosagem dos triglicerídeos e VHS. Todos os pacientes foram submetidos a exames de imagem através de ressonância magnética cerebral com ênfase nos ossos temporais e fossa posterior, o que motiva a triagem genética, uma vez que existe mais um fator clínico de exclusão para a Surdez Súbita. O tratamento inicial foi realizado com prednisona 1mg/kg/dia, com redução gradativa após cinco dias e completa retirada ao final de três semanas em associação com pentoxifilina 400mg de 8/8 horas, que era mantida durante 8 semanas. Nos pacientes em que se estabelecia o diagnóstico etiológico da SS ou havia presença de comorbidades (diabetes, HAS ou dislipidemia) que necessitavam de outras medicações ou abordagens, as mesmas eram realizadas em associação com a terapia padrão estabelecida. Os casos quando considerados idiopáticos puderam participar da pesquisa.

Este grupo era composto inicialmente por 22 pacientes com sintoma de Surdez Súbita e 21 indivíduos que formaram o grupo controle. Foi encontrado em um paciente um Schwannoma Vestibular, e portanto, ele foi excluído do estudo.

### **1.5.2. Grupo B**

Trata-se de pacientes com Surdez Súbita (SS) e indivíduos controles (C) provenientes da clínica particular, Fono Áudio Clínica localizada em Fortaleza (CE). Todos os indivíduos foram submetidos a teste audiométrico tonal e vocal, impedanciometria com pesquisa dos reflexos e teste de reconhecimento de fala. Uma vez que estes pacientes não foram acompanhados durante um longo período de tempo e não

foram requisitados exames laboratoriais, assim como ressonância magnética, estes pacientes não podem ser considerados idiopáticos, porém ainda estão inclusos no grupo com perda auditiva súbita.

### **2. Métodos**

#### **2.1. Obtenção do DNA**

#### **2.2. Extração do DNA genômico a partir de sangue periférico**

A extração do DNA genômico foi realizada a partir de leucócitos obtidos em 10 a 15 mL 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.

Adicionou-se ao sangue coletado 35 mL da solução A (Triton-X 100 1%; MgCl<sub>2</sub> 5mM; Sacarose 0,32M; Tris-HCl 10mM pH 8,0) e, após homogeneização, a mistura foi colocada em gelo por 30 minutos para ocorrer a lise das hemácias. Em seguida, centrifugou-se a 2500 rpm por 15 minutos a 4°C, retirou-se o sobrenadante e ressuspendeu-se o *pellet* em 20mL de solução A, centrifugou-se novamente por 15 minutos a 2500 rpm em temperatura ambiente e retirou-se o sobrenadante. Depois, o *pellet* foi ressuspensão em 1 mL de solução B 1X concentrada (Na<sub>2</sub>EDTA 20 mM; NaCl 20 mM; Tris-HCl 20 mM pH 8,0), e adicionou-se 250µL de solução C preparada na hora (para 1 mL de solução C: 0,5 mL de solução B, 1 mg de Proteinase K (*Boehringer Mannheim GmbH, Mannheim, Alemanha*), 0,5 mL de SDS 10%). Incubou-se a amostra em banho-maria a 37°C por aproximadamente 18 horas ou a 56°C durante 2 horas.

Após este período de incubação, procedeu-se à purificação do DNA genômico com fenol/clorofórmio, que permite a remoção de peptídeos e proteínas de soluções aquosas. Acrescentou-se às amostras a mesma proporção (volume/volume) de fenol saturado com tampão Tris-HCl 10 mM pH 8,0, homogeneizou-se por inversão lenta os tubos por 5 minutos e centrifugou-se a 2500 rpm por 15 minutos em temperatura ambiente. Em seguida, coletou-se o sobrenadante em um novo tubo, descartando-se o precipitado e esta etapa de extração com fenol foi repetida por mais uma vez. À fase aquosa coletada anteriormente acrescentou-se igual volume de clorofórmio/álcool isoamílico na

proporção 24:1 e centrifugou-se novamente a 2.500 rpm por 15 minutos em temperatura ambiente, para a separação da fase aquosa.

O DNA, presente na fase aquosa, foi precipitado ao se adicionar 0,1 volume de acetato de sódio 3M, pH 5,5 e 2 volumes de etanol absoluto gelado. Após inversão lenta do tubo obteve-se a precipitação do DNA, o qual foi coletado com o auxílio de um bastão e em seguida lavado com etanol 70% para retirar o excesso de sal. Dependendo do volume de DNA precipitado, ressuspendeu-se em um volume de 200 a 500µL de TE 1X (TE 10X Tris-HCl 10 mM pH 8,0 e EDTA 1 mM pH 8,0). Os tubos foram mantidos à temperatura ambiente para que o DNA entrasse em solução.

Em seguida, esse DNA foi submetido à eletroforese em gel de agarose 0,8%, 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), a partir de uma solução estoque a 10mg/mL e visualizado sob luz ultravioleta.

### 2.3. Rastreamento da mutação 35delG no gene *GJB2*

A partir do DNA extraído do sangue dos pacientes, 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 de Genética Molecular Humana do CBMEG – UNICAMP a qual se encontra patenteada (patente nº P10005340-6; Método de teste para surdez de origem genética - UNICAMP, 2002).

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. Os *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 por Tris Base 0,089M, Ácido Bórico 0,089M e EDTA 0,002M em pH 8,0), corado com brometo de etídeo (na concentração final 0,5µg/mL) e visualizado sob luz ultravioleta. Na reação com *primer*

normal, o heterozigoto e o homozigoto para a mutação apresentam dois fragmentos, um de 360pb e outro de 202pb, enquanto que o alelo normal apresenta apenas um fragmento de 360pb. Na reação com *primer* mutante, o heterozigoto apresenta somente um fragmento de 360pb, enquanto que o homozigoto mutante e o normal apresentam dois fragmentos, um de 360pb e outro de 202pb.

#### 2.4. Rastreamento das deleções $\Delta(GJB6-D13S1830)$ e $\Delta(GJB6-D13S1854)$

A estratégia de análise destas deleções foi previamente descrita por DEL CASTILLO e colaboradores (2005), que desenvolveram um único teste diagnóstico envolvendo as duas deleções em uma mesma reação de PCR. O gene *GJB6* possui um éxon codificante com 786pb e é amplificado utilizando os *primers* específicos.

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 ao éxon 1 do gene *GJB6*; 460pb e 564pb relacionados às deleções  $\Delta(GJB6-D13S1830)$  e  $\Delta(GJB6-D13S1854)$ , respectivamente como mostrado na figura 6.



**Figura 6.** Estratégia para detecção das deleções  $\Delta(GJB6-D13S1830)$  e  $\Delta(GJB6-D13S1830)$ . Modificado de DEL CASTILHO, 2008.

Os produtos amplificados foram testados em gel de agarose 1,5% em tampão TBE 1X, corado com brometo de etídeo (na concentração final 0,5 $\mu$ g/mL) e visualizado sob luz ultravioleta.

### 2.5. Rastreamento da mutação A1555G

Foram amplificados, utilizando a técnica de PCR, uma região do DNA mitocondrial de 2060 pares de bases (pb) que contém o nucleotídeo 1555 (ANDERSON *et al.*, 1981).

Os produtos amplificados foram testado em gel de agarose 1,5% em tampão TBE 1x, corado com brometo de etídeo (na concentração final 0,5µg/mL) e então, digeridos com a enzima de restrição *BsmA I* (New England BioLabs), 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).

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 visualizados sob luz ultravioleta. A seqüência normal apresenta as bandas dos fragmentos de 1100pb, 516pb e 444pb, ao passo que na mutante perde-se um sítio de ligação da enzima *BsmA I* apresentando fragmentos de 1616pb e 444pb .

### 2.6. Rastreamento da mutação C1494T

De cada paciente foi amplificada por PCR uma região do DNA mitocondrial de 441pb que contém o nucleotídeo 1494 (ZHAO *et al.*,2003).

Os produtos amplificados foram testados em gel de agarose 1,5% em tampão TBE 1x, corados com brometo de etídeo (na concentração final 0,5µg/mL), então, digeridos com a enzima de restrição *Hph I* (New England BioLabs), 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 seqüência normal apresenta as bandas dos fragmentos de 370pb e 71pb, ao passo que na mutante há a perda de um sítio de *Hph I* apresentando apenas o fragmento de 441pb.

### 2.7. Rastreamento das mutações G7444A e A7445G

Foram amplificadas por PCR uma região do DNA mitocondrial de 1822pb que contém os nucleotídeos 7444 e 7445. Os produtos amplificados foram testados em gel de

agarose 1,5% em tampão TBE 1X, corado com brometo de etídeo (na concentração final 0,5µg/mL), então, digeridos com a enzima de restrição *Xba* I (Invitrogen, Brasil), 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) (PANDYA *et al.*, 1999).

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 846pb, 541pb e 435pb, ao passo que na mutante há a perda de um sítio de *Xba* I apresentando os fragmentos de 1387pb e 435pb. Uma vez, que a mesma enzima detecta ambas as mutações, é necessário submeter ao seqüenciamento automático para verificar qual das duas mutações está presente.

### **2.8. Rastreamento das mutações A827G, T961G e 961delT/insC**

Para as mutações mitocondriais A827G, T961G e 961delT/insC foi amplificada por PCR uma região do DNA mitocondrial de 800pb que contém os nucleotídeos 827 e 961 (CHAIG *et al.*, 2008). A PCR amplifica uma região de 800pb.

Os produtos amplificados do 12S rRNA foram testados 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, subseqüentemente foram realizadas as reações de seqüenciamento diretamente dos produtos de PCR.

### **2.9. Rastreamento da mutação G28T do gene *TRMU***

Para esta mutação foi feito um PCR utilizando o par de *primers* que amplifica uma região do gene *TRMU* de 467pb como descrito por CHAIG *et al.* (2008).

Os produtos amplificados foram testados em gel de agarose 1,5% em tampão TBE 1X, corado com brometo de etídeo (na concentração final 0,5µg/mL).

Os fragmentos foram posteriormente digeridos com a enzima *Bsp* 12861 (*New England BioLabs*). Alelos normais devem apresentar fragmentos de 4670pb. Quando a mutação está presente em heterozigose, a digestão origina fragmentos de 336pb e 467pb, enquanto que em homozigose aparecem fragmentos de 134pb e 336pb. 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.

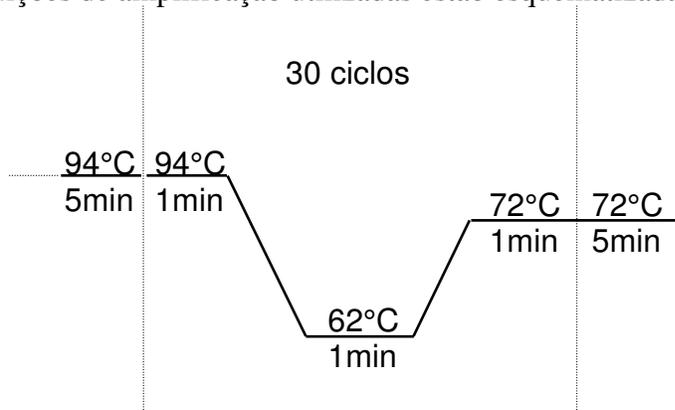
### 2.10. Rastreamento de outras mutações no gene *GJB2*

O gene *GJB2* é composto por apenas um éxon codificante (*Gen Bank*, número de acesso: M86849), 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, segundo a tabela 1.

**Tabela 1.** Sequência de *primers* para a amplificação do éxon do gene *GJB2*

Par	Posição	Primers (5'→3')	Tamanho(pb)
1	-32	<b>Cx1F</b> - TCT TTT CCA GAG CAA ACC GCC	284
	254	<b>Cx1R</b> - GAC ACG AAG ATC AGC TGC AG	
2	172	<b>Cx2F</b> - CCA GGC TGC AAG AAC GTG TG	328
	479	<b>Cx2MR</b> - CAG CCG CTG CAT GGA GAA G	
3	438	<b>Cx3F</b> - CGA AGC CGC CTT CAT GTA CG	255
	692	<b>Cx2R</b> - GGG CAA TGC GTT AAA CTG GC	

As condições de amplificação utilizadas estão esquematizadas abaixo na figura 7.



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

Os produtos amplificados do *GJB2* foram testados 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. As reações de sequenciamento foram realizadas diretamente a partir dos produtos de PCR.

### 2.10.1. Reação de seqüenciamento automático

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

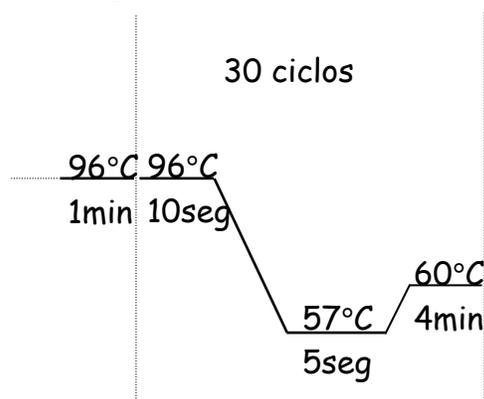
40-80ng de DNA

3  $\mu$ L do *mix BigDye*

1  $\mu$ L do *primer* direto ou reverso (5mM/ $\mu$ L)

H<sub>2</sub>O deionizada para completar 10  $\mu$ L.

As condições de amplificação utilizadas estão esquematizadas abaixo na figura 8.



**Figura 8.** Ciclo utilizados na reação de seqüenciamento automático.

### 2.10.2. 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 adicionaram-se 3 $\mu$ L de Blue Dextran e foi realizada a desnaturação a 95°C por 5 minutos. Um microlitro de cada amostra foi aplicado em gel de acrilamida 4,5%, no seqüenciador automático ABI PRISM™ 377 (*Perkin Elmer*), numa corrida de 4 horas.

### **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

H<sub>2</sub>O para completar 1 litro.

### **2.10.3. 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**

---

As tabelas 2, 3, 4 e 5 apresentam o resumo dos resultados moleculares obtidos nos pacientes estudados neste trabalho:

A tabela 7 (Anexo IV) apresenta um resumo dos casos nos quais foram detectadas mutações e seus respectivos grupos.

**Tabela 2.** Indivíduos provenientes da Escola Paulista de Medicina – UNIFESP com perda auditiva súbita - Grupo A (SS).

Nº	Sexo	Idade	GJB2	Deleções	Mutações mitocondrais							TRMU	
					A1555G	C1494T	A827G	G7444A	A7445G	961delT/insC	T961G		
1	F	34	N/N	N/N	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	M/N
2	M	17	N/N	N/N	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	N/N
3	M	60	N/N	N/N	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	N/N
4	F	22	N/N	N/N	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	N/N
5	F	65	N/N	N/N	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	N/N
6	F	76	N/N	N/N	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	N/N
7	F	62	N/N	N/N	(-)	(-)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	N/N
8	F	39	N/N	N/N	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	M/N
9	F	51	N/N	N/N	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	N/N
10	M	29	N/N	N/N	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	N/N
11	F	73	N/N	N/N	(-)	(-)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	N/N
12*	F	57	N/N	N/N	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	N/N
13	F	41	N/N	N/N	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	N/N
14	F	67	N/N	N/N	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	N/N
15	M	28	N/N	N/N	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	N/N
16	F	52	N/N	N/N	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	M/N
17	F	41	N/N	N/N	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	N/N
18	M	55	N/N	N/N	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	N/N
19	M	54	N/N	N/N	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	M/N
20	F	35	N/N	N/N	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	M/N
21	F	59	V27I/N	N/N	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	N/N
22	F	63	N/N	N/N	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	M/N

F: feminino, M: masculino, N/N: sem mutação, M/N: mutante heterozigoto; (-): negativo; (+): positivo.

\* Paciente 12 excluído do trabalho.

**Tabela 3.** Indivíduos provenientes da Escola Paulista de Medicina – UNIFESP sem perda auditiva - Grupo A (C).

Nº	Sexo	Idade	GJB2	Deleções	Mutações mitocondrais							TRMU	
					A1555G	C1494T	A827G	G7444A	A7445G	961delT/insC	T961G		
1	M	17	N/N	N/N	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	M/N
2	F	42	N/N	N/N	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	N/N
3	F	58	N/N	N/N	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	N/N
4	M	28	N/N	N/N	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	N/N
5	M	29	N/N	N/N	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	N/N
6	F	44	N/N	N/N	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	N/N
7	F	38	N/N	N/N	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	N/N
8	F	23	N/N	N/N	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	M/N
9	F	63	N/N	N/N	(-)	(-)	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	M/N
10	F	52	N/N	N/N	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	M/N
11	F	60	N/N	N/N	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	M/N
12	F	60	V271/N	N/N	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	N/N
13	F	32	N/N	N/N	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	N/N
14	F	35	N/N	N/N	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	N/N
15	F	50	N/N	N/N	(-)	(-)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	N/N
16	M	53	N/N	N/N	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	N/N
17	M	52	V271/N	N/N	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	N/N
18	M	58	N/N	N/N	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	N/N
19	F	72	N/N	N/N	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	N/N
20	F	76	N/N	N/N	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	N/N
21	F	67	N/N	N/N	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	N/N

F: feminino, M: masculino, N/N: sem mutação, M/N: mutante heterozigoto; (-): negativo; (+): positivo.

**Tabela 4.** Indivíduos provenientes da Fono Audio Clínica – Fortaleza (CE) com perda auditiva - Grupo B (SS).

N°	Sexo	Idade	GJB2	Deleções	Mutações mitocondrais							TRMU	
					A1555G	C1494T	A827G	G7444A	A7445G	961delT/insC	T961G		
1	F	61	N/N	N/N	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	N/N
2	F	75	N/N	N/N	(-)	(-)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	N/N
3	F	45	N/N	N/N	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	M/N
4	F	54	N/N	N/N	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	N/N
5	M	38	N/N	N/N	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	M/N
6	F	26	N/N	N/N	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	N/N
7	F	53	N/N	N/N	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	N/N
8	M	60	N/N	N/N	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	N/N
9	M	20	N/N	N/N	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	N/N
10	F	43	N/N	N/N	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	N/N
11	F	47	N/N	N/N	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	N/N
12	F	60	N/N	N/N	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	M/N
13	M	62	N/N	N/N	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	N/N
14	F	84	N/N	N/N	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	N/N
15	M	21	N/N	N/N	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	N/N
16	M	57	N/N	N/N	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	N/N

F: feminino, M: masculino, N/N: sem mutação, M/N: mutante heterozigoto; (-): negativo; (+): positivo.

**Tabela 5.** Indivíduos provenientes da Fono Audio Clínica – Fortaleza (CE) sem perda auditiva - Grupo B (C).

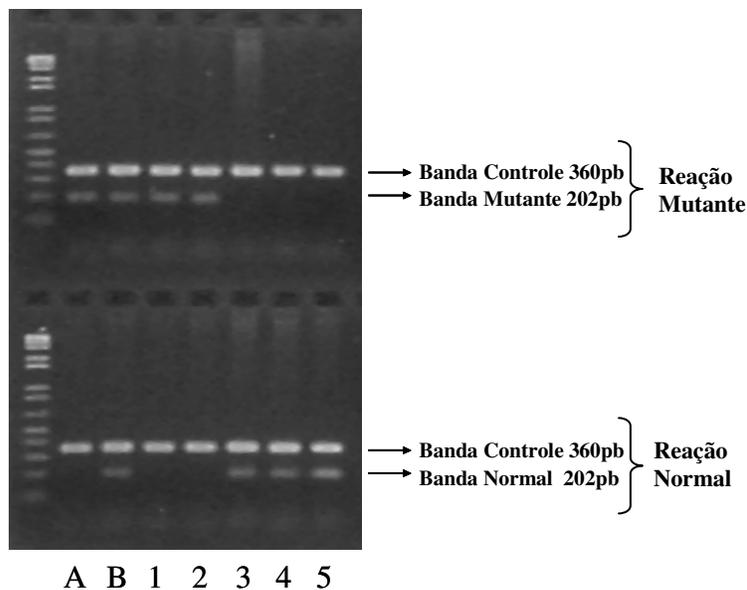
N°	Sexo	Idade	GJB2	Deleções	Mutações mitocondrais							TRMU	
					A1555G	C1494T	A827G	G7444A	A7445G	961delT/insC	T961G		
1	M	21	N/N	N/N	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	N/N
2	M	20	N/N	N/N	(-)	(-)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	N/N
3	F	26	N/N	N/N	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	N/N
4	F	61	N/N	N/N	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	N/N
5	M	54	N/N	N/N	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	N/N
6	M	60	N/N	N/N	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	N/N
7	F	75	N/N	N/N	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	N/N
8	F	53	N/N	N/N	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	N/N
9	F	38	N/N	N/N	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	N/N
10	F	45	N/N	N/N	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	N/N
11	F	47	N/N	N/N	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	N/N
12	F	44	N/N	N/N	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	N/N
13	F	62	N/N	N/N	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	N/N
14	M	55	N/N	N/N	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	N/N
15	F	86	N/N	N/N	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	N/N
16	M	60	N/N	N/N	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	N/N

F: feminino, M: masculino, N/N: sem mutação, M/N: mutante heterozigoto; (-): negativo; (+): positivo.

### 1. Mutação 35delG no gene *GJB2*

Para a análise da mutação 35delG foi realizada PCR alelo específico (AS-PCR). A figura 9 exemplifica os resultados de um indivíduo homozigoto normal, heterozigoto e homozigoto mutante para 35delG.

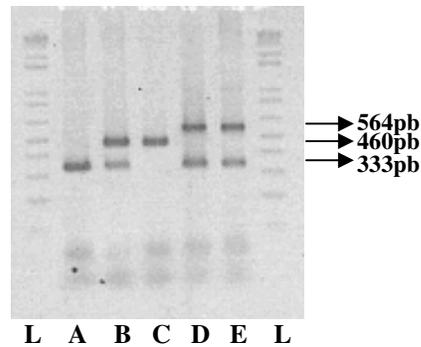
Dentre os indivíduos de todos os grupos não foi encontrado nenhum indivíduo com esta mutação.



**Figura 9.** 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.

### 2. Deleções $\Delta(GJB6-D13S1830)$ e $\Delta(GJB6-D13S1854)$ no gene *GJB6*

Para o rastreamento destas mutações foram amplificadas regiões pela técnica de PCR, utilizando-se *primers* estratégicos que determinam a ausência ou presença das deleções (Figura 10).

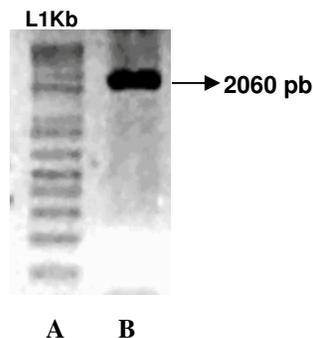


**Figura 10.** Resultado da técnica de PCR para detecção das deleções  $\Delta$ (GJB6-D13S1830) e  $\Delta$ (GJB6-D13S1854). (L) = marcador *ladder* 100pb Gibco BRL<sup>®</sup>; (A) indivíduo normal; (B) indivíduo heterozigoto para mtação  $\Delta$ (GJB6-D13S1830)/N; (C) indivíduo homozigoto para mutação  $\Delta$ (GJB6-D13S1830)/ $\Delta$ (GJB6-D13S1830); (D) e (E) indivíduo heterozigoto para mutação  $\Delta$ (GJB6-D13S1854)/N.

Neste estudo nenhum paciente apresentou estas mutações.

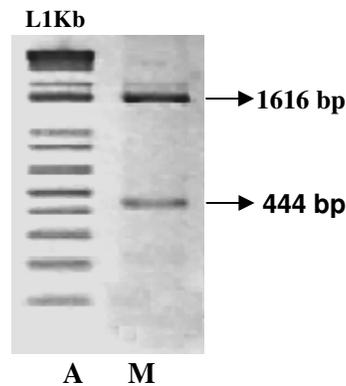
### 3. Mutação A1555G na subunidade mitocondrial 12S rRNA

Para o rastreamento da mutação A1555G foi amplificado um fragmento de 2060pb do gene de cada paciente, pela técnica de PCR (Figura 11).



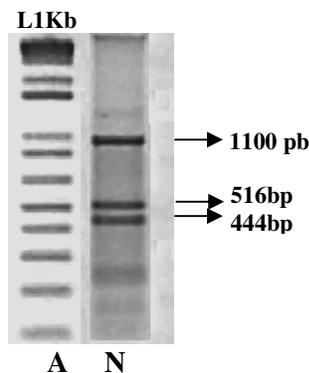
**Figura 11.** Fragmento da subunidade 12S rRNA amplificado pela reação de PCR em gel de agarose 1,5%, corado com brometo de etídeo. (A) ladder de 1Kb GIBCO BRL<sup>®</sup> e; (B) fragmento de 2060pb.

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 12 ilustra o padrão de bandas de um controle positivo para esta mutação, após digestão.



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

No entanto, nenhum indivíduo apresentou a mutação A1555G neste estudo. Desta forma, o padrão de bandas encontrado para todos os indivíduos está ilustrado na figura 13. Na ausência da mutação, o fragmento de 2060pb é cortado em 3 fragmentos: 1100pb, 516pb e 444pb.

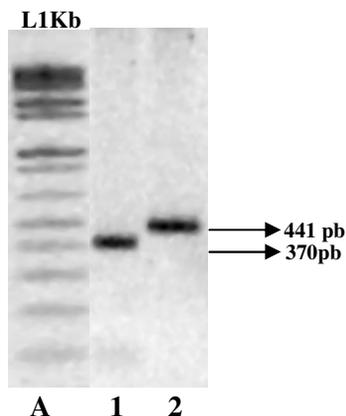


**Figura 13.** Fragmentos da digestão da subunidade 12S rRNA com a enzima *BsmA I*, em gel de agarose 1,5%, corado com brometo de etídeo. (A) ladder de 1KB GIBCO BRL®; e (N) fragmentos de 1100pb, 516pb e 444pb, de um paciente normal para a mutação A1555G.

#### 4. Mutação C1494T na subunidade mitocondrial 12S rRNA

Para o rastreamento da mutação C1494T foi amplificado um fragmento de 441pb do gene, pela técnica de PCR seguida por digestão.

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 14).

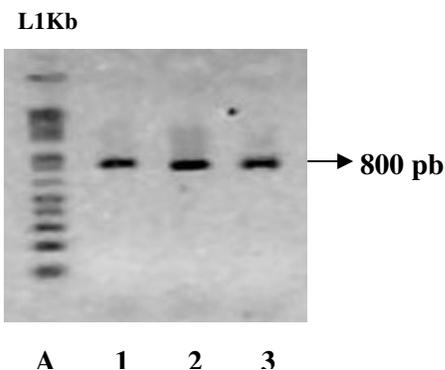


**Figura 14.** Fragmentos da digestão da subunidade 12S rRNA com a enzima *Hph* I, em gel de agarose 1,5%, corado com brometo de etídeo. (A) ladder de 1KB GIBCO BRL®; (1) - fragmento digerido (pacientes sem a mutação C1494T). (2) - fragmento digerido. Paciente controle positivo para a mutação C1494T.

Nenhum indivíduo foi encontrado com esta mutação neste estudo.

### 5. Mutações A827G, T961G e 961delT/insC na subunidade mitocondrial 12S rRNA

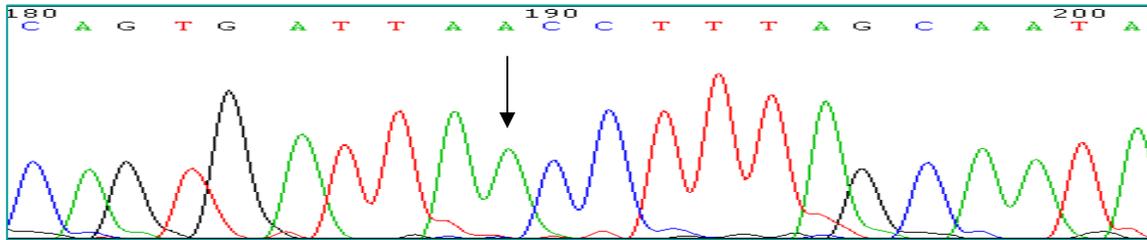
Para o rastreamento destas mutações foi realizada uma amplificação pela técnica de PCR da região onde se localizariam estas mutações (Figura 15).



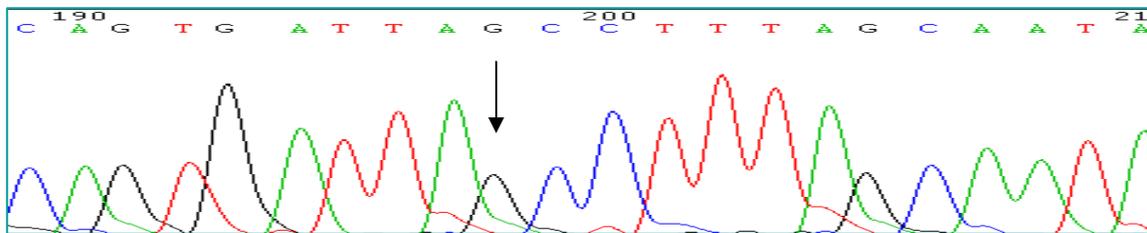
**Figura 15.** Fragmentos da amplificação da subunidade 12S rRNA em gel de agarose 1,5%, corado com brometo de etídeo. (A) ladder de 1KB GIBCO BRL® e; (1), (2) e (3) fragmentos de 800pb.

Este fragmento foi submetido ao sequenciamento automático e 6 indivíduos apresentaram a mutação A827G em homoplasmia: os pacientes 7 e 11 do grupo A (SS), os indivíduos 9 e 15 do grupo A (C), o paciente 2 do grupo B (SS) e o indivíduo 2 do grupo B (C).

A figura 16a exemplifica um paciente normal para A827G. A figura 16b exemplifica um paciente mutante para A827G, em homoplasmia.

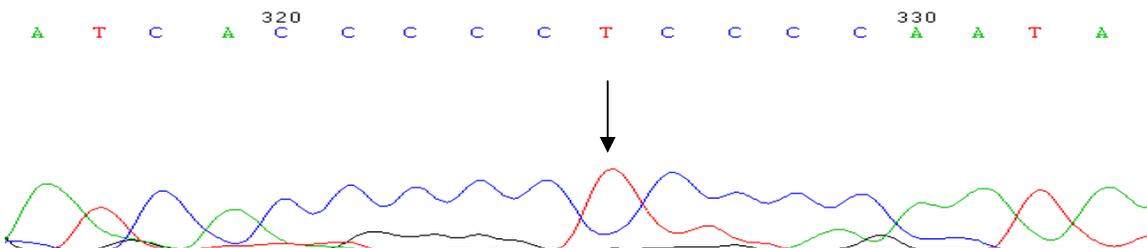


**Figura 16a.** Paciente normal para A827G. A seta indica o ponto da mutação, com o nucleotídeo normal adenina (A).



**Figura 16b.** Paciente mutante para A827G. A seta indica o ponto da mutação (troca de adenina (A) por guanina (G)).

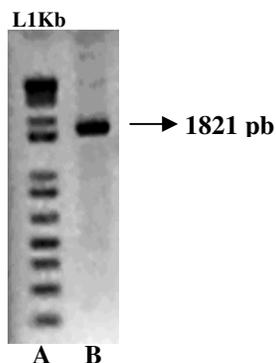
Neste estudo nenhum paciente apresentou as mutações T961G ou 961delT/insC. Quando esta mutação não está presente, o nucleotídeo T aparece na posição 961 (Figura 17).



**Figura 17.** Paciente normal para as mutações T961G e 961delT/insC. A seta indica o ponto onde a mutação deveria ocorrer.

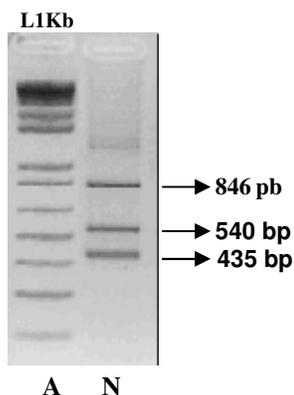
### 6. Mutações G7444A e A7445G nos genes mitocondriais *COI/tRNA<sup>SER(UCN)</sup>*

Para rastreamento destas mutações foi feita uma amplificação de 1821pb do gene, pela técnica de PCR (Figura 18).



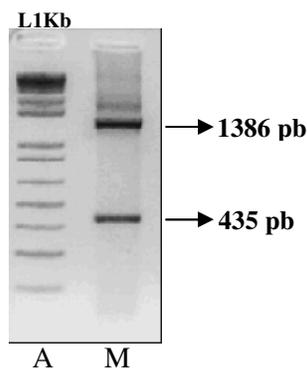
**Figura 18.** Fragmento do gene *tRNA<sup>Ser</sup>* (UCN) amplificado pela técnica de PCR, em gel de agarose 1,5%, corado com brometo de etídeo. (A) ladder de 1KB GIBCO BRL®; e (B) fragmento de 1821pb.

Quando esta mutação está ausente, o fragmento de 1821pb é dividido em 3 fragmentos com a enzima *Xba* I: 846pb, 540pb e 435pb como mostra a figura 19.



**Figura 19.** Fragmento da digestão do gene *tRNA<sup>SER(UCN)</sup>* com a enzima *Xba* I, em gel de agarose 1,5%, corado com brometo de etídeo. (A) ladder de 1KB GIBCO BRL®; e (N) fragmentos de 846pb, 540pb e 435pb, de um paciente normal para as mutações G7444A e A7445G.

Apenas o indivíduo 9 do grupo A (C) apresentou essa mutação conforme a figura 20 ilustra o padrão de bandas encontrado. Quando esta mutação está presente, há a perda de um sítio de restrição de *Xba* I e o fragmento se divide em duas bandas: 1386pb e 435pb.

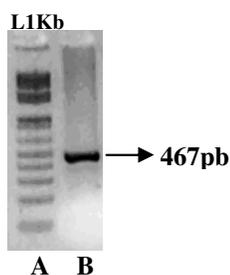


**Figura 20.** Fragmento da digestão do gene *tRNA<sup>SER(UCN)</sup>* com a enzima *Xba* I, em gel de agarose 1%, corado com brometo de etídeo. (A) ladder de 1KB GIBCO BRL®; e (M) fragmentos de 1386bp e 435bp de um paciente mutante para A7445G.

Para se ter conhecimento de qual mutação o paciente 9 do grupo A (C) apresenta, foi necessária fazer-se o sequenciamento automático, uma vez que ambas as mutações estão próximas e a digestão não conseguiria avaliar qual delas o paciente possui. O sequenciamento automático indicou a presença da mutação G7444A neste paciente.

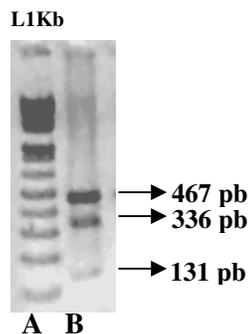
### 7. Gene *TRMU*

Para o rastreamento desta mutação, os fragmentos foram amplificados por PCR seguidos de digestão pela enzima de restrição *Bsp* 12861. Os fragmentos amplificados por PCR tem o tamanho de 467 pares de base como mostra a figura 21.



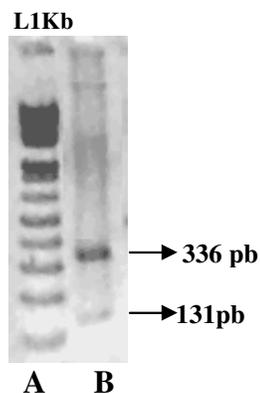
**Figura 21.** Amplificação do fragmento de 467 pares de base para o rastreamento da mutação no gene *TRMU*. (A) ladder de 1KB GIBCO BRL®; e (B) fragmentos de 467bp.

Quando a mutação esta presente em heterozigose, são gerados pela digestão três fragmentos: um de 467pb, um de 336pb e outro de 131pb como mostrado na figura 22.



**Figura 22.** Paciente com a mutação G28T em heterozigose. A enzima de restrição *Bsp* 12861 corta o DNA em dois sítios de ligação, dando origem a três fragmentos de 467pb, 336pb e 131pb respectivamente. (A) ladder de 1KB GIBCO BRL®; e (B) fragmentos de 467pb, 336pb e 131pb referente a mutação em heterozigose.

Quando a mutação é encontrada em homozigose aparecem apenas dois fragmentos, um com 336pb e outro com 131pb como mostrado na figura 23.

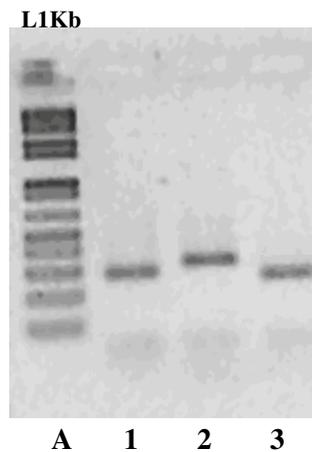


**Figura 23.** Paciente com a mutação G28T em homozigose. A enzima de restrição *Bsp* 12861 corta o DNA em um sítios de ligação, dando origem a dois fragmentos de 336pb e 131pb. (A) ladder de 1KB GIBCO BRL®; e (B) fragmentos de 336pb e 131pb referente a mutação em homozigose.

Dos indivíduos estudados neste trabalho, os pacientes 1, 8, 16, 19, 20 e 22 do grupo A (SS), os indivíduos 1, 8, 9, 10 e 11 do grupo A (C) e os pacientes 5 e 13 do grupo B (SS) totalizando 13 pacientes, apresentaram esta mutação em heterozigose.

### 8. Outras mutações no gene *GJB2*

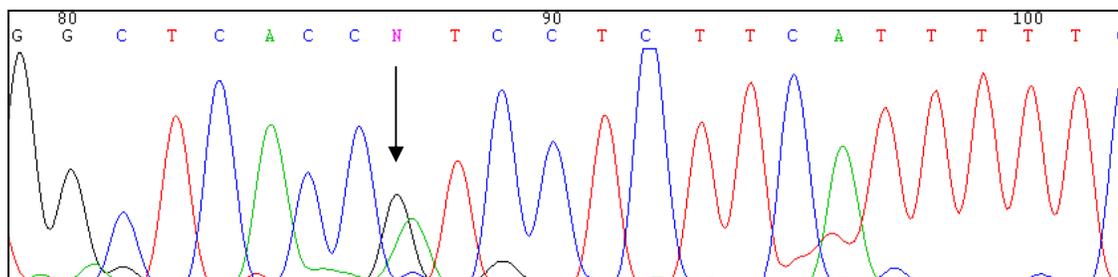
Para a análise do gene *GJB2* foram amplificados por PCR 3 fragmentos, dividindo-se, desta forma, o éxon codificante do gene (Figura 24).



**Figura 24.** 3 fragmentos do gene *GJB2* resultantes do PCR. (A) ladder de 1KB GIBCO BRL®; (1) fragmento de 284pb; (2) fragmento de 328pb; (3) fragmento de 255pb.

#### 8.1- Polimorfismo V27I

Através do sequenciamento automático foi possível a detecção de 3 pacientes com esta mutação, sendo o paciente 21 do grupo A (SS), os indivíduos 12 e 17, ambos do grupo A (C). Todos eles em heterozigose (Figura 25).



**Figura 25.** Paciente mutante para V27I. A seta indica o local de substituição de G para A.

Quando esta mutação está presente em heterozigose são encontrados dois picos sobrepostos, o pico da base G (guanina) com o pico da base A (adenina) como mostra a seta na figura 25.

### **9. Análise Estatística**

As análises estatísticas foram feitas através do Teste Exato de Fischer. As análises comparativas entre o grupo controle e o grupo surdo foram realizadas, porém todas as comparações não deram um P-valor significativo.



A Surdez Súbita (SS) é uma afecção conhecida, estudada pelos médicos há longa data, sendo sua etiopatogenia e tratamento duas grandes indagações presentes. Em apenas 10% dos casos descobre-se a causa e segundo NAKAMURA e colaboradores (2001), mais de 45% dos casos são de Surdez Súbita Idiopática (SSI).

No presente estudo foram divididos em grupos para que pudessem ser comparados com maior coerência de diagnóstico clínico. Os indivíduos dos grupos A e B (SS) foram avaliados clinicamente por serviços diferentes. De uma forma geral, nesses grupos a maioria dos pacientes apresentou o mesmo tempo de instalação da perda (> 24 horas) indicando que a perda auditiva ocorreu de forma súbita. No grupo A (SS) predominaram indivíduos de 41 a 60 anos, já no grupo B (SS) houve um predomínio de indivíduos mais jovens, de 21 a 40 anos de idade. Os sintomas mais frequentes entre os dois grupos foram zumbido, a lateralidade da perda, com a predominância na orelha esquerda, sendo em menor número os casos bilaterais (Anexo I).

### **1. Avaliação Clínica e Possíveis Etiologias:**

#### **1.1 Hipóteses Vasculares**

A oclusão vascular, que resulta em isquemia, tem sido proposta como mecanismo de causa de Surdez Súbita, baseada, em parte, na catastrófica natureza do evento, que é similar a um golpe tromboembólico. Porém, muitas observações clínicas, experimentais e otopatológicas não suportam a etiologia vascular como causa sendo comum (MERCHANT *et. al.*, 2008). Nos pacientes deste trabalho, não se tem conhecimento de oclusões vasculares ou isquemias, porém alguns pacientes relataram a presença de doenças vasculares, como HAS (Hipertensão Arterial Sistêmica), hipotensão, cardiopatia e taquicardia. Todos esses pacientes pertencem ao grupo A (SS), formado por indivíduos surdos. Dentre essas doenças, cinco pacientes apresentam HAS, um hipotensão, um cardiopatia e um taquicardia. Todas essas doenças alteram o fluxo sanguíneo, podendo alterar a viscosidade sanguínea e causar eventualmente uma perda súbita de audição. Entretanto, não se pode afirmar que a perda auditiva nestes indivíduos sejam causados por estas doenças, podendo outros fatores influenciar na perda auditiva, salientando ainda que não existe trabalhos na literatura relatando essas doenças associadas à Surdez Súbita.

O histórico de doenças vasculares ou de alterações eritrocitárias ou plaquetárias são as únicas manifestações clínicas que poderiam inferir a hipótese de uma causa vascular para a SS; histopatologicamente encontrar-se-ia proliferação fibrosa e óssea nos espaços da cóclea e canais semicirculares, ou, ao menos, a hemorragia nos espaços cocleares, comprovados não só por exames de imagem, como também por estudos de ossos temporais após a morte (BITTAR *et al.*, 1998). Apesar de todos os pacientes do grupo A (SS) terem sido submetidos a exame de ressonância magnética, nenhum deles apresentou proliferação fibrosa ou hemorragia que pudessem comprovar que a doença vascular tenha causado a perda auditiva.

### **1.2. Causas Auto – Imunes**

A hipótese imunológica da Surdez Súbita é baseada na circulação de anticorpos que têm uma reação cruzada com antígenos da orelha; ou na ativação de células T que podem danificar a orelha interna (BERROCAL & RAMÍREZ-CAMACHO, 2002). Esses antígenos foram propostos como sendo responsáveis pela chamada doença auto-imune da orelha interna.

As funções de muitas proteínas podem ser impedidas por anticorpos, porém a habilidade de um anticorpo bloquear a função protéica é apenas uma pequena parte que aponta para a possibilidade de haver um correspondente com desordens imunológicas (MERCHANT *et al.*, 2008). Na anamnese feita pelos pacientes, nenhum relatou doença auto-imune que possa explicar a perda auditiva, o que não significa que ela não esteja presente.

### **1.3. Ruptura de Membrana**

A ruptura da membrana labiríntica da cóclea pode ou não ser acompanhada de ruptura da membrana da janela oval, sendo então, hipoteticamente a causa de Surdez Súbita. Geralmente essa quebra ocorre em resposta a mudanças repentinas na pressão intralabiríntica, porém a maioria dos pacientes que apresentam Surdez Súbita não descreve um evento físico que possa levar a este sintoma. Na verdade, muitos pacientes relatam que a experiência de perda súbita ocorre quando o indivíduo acorda ou em um processo sedentário (MERCHANT *et al.*, 2008). Em indivíduos sujeitos a exercícios

físicos com alta pressão intracraniana e intra-abdominal, assim como, mulheres em serviço de parto, levantadores de peso, entre outros, não ocorrem um aumento na incidência de perda auditiva. Dentre os pacientes analisados neste estudo, nenhum caso foi relatado que pudesse ter ocorrido uma ruptura de membrana.

### **1.4. Hipótese Viral**

A infecção viral, devido inúmeras e consideráveis evidências circunstanciais, é considerada como uma das principais possíveis causas da SS, estando associada com os achados histológicos dos ossos temporais, soro conversões de titulação vírus específica, e em menor grau, ligação com histórico de gripe ou outra doença viral precedente (LAZZARINI & CAMARGO, 2006).

O vírus da caxumba foi descrito como causa da Surdez Súbita, baseado em estudos clínicos e sorológicos. Muitos desses estudos concluíram que menos de 10% das pessoas que possuíam o vírus da caxumba tinham Surdez Súbita. O paciente 20 do grupo A (SS) relatou ter caxumba um ano antes da perda auditiva, não podendo concluir que esta seja a verdadeira causa da perda auditiva, uma vez que, os casos de pessoas que perderam a audição causada pelo vírus da caxumba, começaram a apresentar a perda auditiva horas ou dias depois da contaminação com o vírus (LAZZARINI & CAMARGO, 2006).

Todos os vírus, uma vez adquiridos, persistem na forma latente ao longo da vida. A maioria dos adultos é soropositivo para muitos vírus da família Herpes, os quais foram adquiridos na infância. Uma vez infectado, o indivíduo não é mais suscetível a uma nova infecção aguda, e a hipótese de que a Surdez Súbita seja causada por um desses vírus em um paciente soropositivo pode apenas ser explicada pela reativação do vírus latente. Infelizmente não há um teste sorológico eficaz para diagnosticar uma reativação viral (MERCHANT *et al.*, 2008). Não foram feitos testes sorológicos para diagnosticar a presença viral nos pacientes que apresentaram perda auditiva, pois seria difícil concluir que a resposta positiva seria a causa da perda auditiva no paciente.

PITKARANTA & JULKUNEN (1998) não detectaram expressão gênica de interferon ou interferon-induzidos em amostras de sangue periférico, ambos usados como marcadores para diagnóstico de infecção viral sistêmica. Esse estudo é único e

significante, porque não tinha um alvo específico, mas, diagnosticava marcadores sensíveis de qualquer infecção viral sistêmica.

Dentre os pacientes estudados neste trabalho, os pacientes 4, 17 e 20 do grupo A (SS) apresentaram as IVAS prévia à Surdez Súbita. O paciente 20 como já foi descrito, apresentou caxumba um ano antes da perda auditiva, sendo assim ele teve uma IVAS associada a uma viremia, porém mesmo assim, não se pode afirmar que isto causaria a perda auditiva.

A hipótese de a Surdez Súbita ser causada por um vírus resulta de achados histopatológicos nos ossos temporais obtidos de indivíduos com Surdez Súbita Idiopática que são similares a alterações observadas em indivíduos que perderam a audição quando foram acometidos de caxumba, sarampo, rubéola ou herpes zoster (MERCHANT *et. al.*, 2008). Em ambos os conjuntos temporais, a maior mudança observada são atrofia nas células ciliadas e de suporte do Órgão Espiral, com lesões variáveis de outras estruturas como estrias vasculares, membrana tectorial e neurônios cocleares (MERCHANT *et. al.*, 2008).

### **1.5. Schwannoma Vestibular**

O Schwannoma Vestibular (SV) é um tumor benigno que se manifesta de diversas maneiras, desde assintomático até quadros neurológicos graves. A grande maioria dos casos de SV se apresenta com sintomas auditivos (95%) e vestibulares (61%) (MATTHIES & SAMII, 1997). A SS pode ser a apresentação inicial de SV em uma parcela muito variável de casos. HIGGS (1973) relata que 10% de casos de SV apresentam SS como primeira manifestação, MORRISON (1975) 17%. BERRETINI (1997) cita uma variação de 3 a 26% na literatura de casos de SV que se apresentam com SS, explicando esta variabilidade como decorrente do questionamento ou não ao paciente sobre episódios de Surdez Súbita prévia.

Os mecanismos etiológicos da SS em SV ainda não estão totalmente elucidados. KOSUGI e colaboradores (1992) explicam a SS em SV por compressão tumoral do VIII par craniano. Todos os pacientes do grupo A (SS) foram submetidos a exames de imagem, e o paciente 12 do grupo A (SS) apresentou um Schwannoma Vestibular, sendo assim excluído do estudo. A introdução da ressonância magnética (RM) na propedêutica

da Surdez Súbita tem contribuído para a detecção de lesões até então não diagnosticadas. Hoje em dia a RM é considerada o exame de escolha na investigação radiológica da orelha interna, do nervo vestibulo-coclear e do sistema nervoso central. SCHICK *et al.*, (2001) revelam que a RM identificou anormalidades em 34,5% de exames realizados em 354 pacientes com SS, zumbido não pulsátil e com sintomas vestibulares, sendo, portanto, este útil na investigação de desordens audiovestibulares.

Desse modo, vemos que o estudo por imagem do labirinto, dos nervos do VIII par craniano e do SNC (Sistema Nervoso Central), em suas diferentes áreas, é fundamental para se estabelecer o diagnóstico etiológico da SS e, nesse sentido, a RM ainda é o melhor exame complementar de que dispomos (RAMOS *et al.*, 2005).

## **2. Discussão da análise genética**

### **2.1. Mutações no gene *GJB2***

#### **2.1.1. Mutação 35delG**

Esta mutação apesar de não ter sido observada em nenhum indivíduo deste estudo, é a principal causa de surdez de origem genética, portanto, é fundamental o seu rastreamento inicial.

### **2.2. Mutações do gene *GJB6***

As deleções  $\Delta(GJB6-D13S1830)$  e  $\Delta(GJB6-D13S1854)$  resultam no gene *GJB6* defectivo. Estas deleções podem ocorrer tanto em homozigose como em heterozigose juntamente com mutações do gene *GJB2*, sugerindo possível herança digênica com fenótipo de surdez sensorio-neural não-sindrômica. Esta interação dos genes pode ser explicada pela formação dos conéxons heteroméricos. Na verdade foram propostas duas hipóteses para esta interação gênica: (1) que estas deleções removeriam elementos *cis* afetando a expressão do gene *GJB2*, (2) efeito cumulativo da remoção e haploinsuficiência do gene *GJB6* (DEL CASTILLO *et al.*, 2005). Essas deleções explicaram alguns casos de indivíduos monoalélicos para o gene *GJB2*, mas não foram observadas em nenhum dos indivíduos estudados.

### **3. Mutações Mitocondriais**

#### **3.1. Mutações A1555G e C1494T**

A mutação A1555G, apesar de ser a mais freqüente das mutações mitocondriais, podendo ser encontrada em 0.5-1% de caucasianos, não foi observada em nenhum dos indivíduos estudados (KUPKA *et al.*, 2002 e LI *et al.*, 2004). Segundo ABREU-SILVA e colaboradores (2006), um estudo realizado em pacientes brasileiros demonstrou uma freqüência da mutação A1555G em 2% nos casos estudados. Uma vez que, a suscetibilidade à perda auditiva em indivíduos que possuem a mutação A1555G com exposição à aminoglicosídeos é alta, o rastreamento dessa mutação é pertinente. A penetrância incompleta e a variação de sua expressividade na perda auditiva, assim como os defeitos bioquímicos associados à mutação indicam que essa mutação sozinha não é suficiente para resultar no fenótipo de perda auditiva (PREZANT *et al.*, 1993; GUAN *et al.*, 2001; ESTIVILL *et al.*, 1998; LI *et al.*, 2005; YOUNG *et al.*, 2005). Entretanto, essa alteração não foi observada em nenhum dos indivíduos estudados.

A mutação C1494T é uma transição do C para T na posição 1494 no gene mitocondrial *12S rRNA*. No trabalho de ZHAO *et al.*, (2004) em família chinesa, a mutação C1494T foi identificada em homoplasmia sugerindo que esta mutação também pode predispor à perda auditiva associada ao uso de aminoglicosídeo. Assim como a mutação A1555G, parece que a mutação C1494T sozinha também não é suficiente para causar surdez, uma vez que há relatos de indivíduos que apresentam a mutação e que não fizeram uso de antibióticos e possuem audição normal. Dessa foram, o uso de aminoglicosídeos contribuiriam com a penetrância e expressividade da perda aditiva na referida família Chinesa, assim como, outros fatores podem estar relacionados, incluindo genes modificadores nucleares e os haplótipos mitocondriais (ZHAO *et al.*, 2005; WANG *et al.*, 2006). Existem ainda poucos estudos a respeito desta mutação, sendo todos em famílias chinesas até o momento. Esta mutação não foi encontrada em nenhum paciente deste trabalho.

#### **3.2. Mutações A7445G e G7444A**

Em relação à mutação mitocondrial A7445G, esta já foi descrita associada à ceratoderma palmoplantar. Um estudo de CARIA e colaboradores (2005) relataram a

presença desta mutação em homoplasmia em 4 famílias justificando a causa da perda auditiva. Porém, nos casos descritos, ambos os sintomas mostram uma variabilidade de penetrância e expressividade. Essa mutação não foi observada nos indivíduos estudados nesse trabalho.

A mutação mitocondrial G7444A parece não ser freqüente na população brasileira, e foi descrita em 2 indivíduos do grupo controle ouvinte de um estudo envolvendo brasileiros descendentes de Africanos (ABREU-SILVA *et al.*, 2006). Inicialmente PANDYA e colaboradores (1999) relataram a associação dessa mutação com a perda auditiva, porém sempre relacionada à presença da mutação A1555G. Estudos posteriores desses mesmos autores descartaram essa associação, uma vez que, a mutação G7444A foi depois encontrada de forma isolada em indivíduos com surdez não-sindrômica (PANDYA *et al.*, 2002). Essa mutação também foi descrita associada à neuropatia Óptica Hereditária de Leber (LHON) e foi considerada como sendo uma mutação secundária, que modula a expressividade da mutação primária, porém insuficiente por si só para causar a doença (BROWN *et al.*, 1995).

A mutação G7444A foi encontrada no indivíduo 9 do grupo A (C). Apesar desse indivíduo também possuir outras duas alterações, a A827G e G28T, sua audição é normal. Em um trabalho de ZHAO e colaboradores (2005), a mutação G7444A foi encontrada em diversos indivíduos com perda auditiva e estava ausente nos 164 controles. Nesse trabalho, foi encontrada apenas em um indivíduo controle. Nesse caso, mesmo a interação com as mutações A827G e G28T não foram suficientes para causar surdez. Apesar desta paciente com 62 anos de idade ter uma audiometria normal, não se pode descartar a possibilidade de ela vir a apresentar uma perda auditiva, mesmo súbita. Ainda não existe na literatura estudo de freqüência desses mutações mencionadas, já que estas mutações não têm sido pesquisadas rotineiramente.

### **3.3. Mutações A827G, T961G E 961DEL/INSC**

A mutação mitocondrial A827G foi relacionada à perda auditiva não-sindrômica, associada ou não ao uso de aminoglicosídeos. Essa mutação está localizada no sítio A da subunidade menor 12S do rRNA mitocondrial, que é altamente conservada evolutivamente em humanos, ratos, camundongos, bovinos e *Xenopus laevis*. Em

decorrência da mutação A827G, é possível que haja uma alteração na estrutura terciária ou quaternária desse RNA ribossômico levando à disfunção mitocondrial, explicando assim sua patogenicidade. A penetrância incompleta do fenótipo observado na presença da mutação A827G indica que sozinha essa alteração não é suficiente para causar a perda auditiva, sendo que outros fatores devem modular sua expressividade, tais como, os aminoglicosídeos, haplótipos mitocondriais ou genes nucleares modificadores.

Neste estudo, a mutação A827G foi encontrada em homoplasmia em 5 indivíduos. Nenhum desses indivíduos fez uso de aminoglicosídeos, apesar de esses dados serem, de fato, muito difíceis de serem comprovados. Como se pode observar na tabela 6 (anexo IV), essa alteração foi observada nos diversos grupos estudados, não sendo possível correlacioná-la a surdez nesses casos.

Não se pode descartar que nos indivíduos surdos nos quais essa alteração foi encontrada, a modulação do fenótipo se deva a outro gene nuclear ou ao *background* genético desses indivíduos.

Apesar de existirem prévios estudos apontando para a patogenicidade da mutação A827G, em uma família com 30 indivíduos provenientes da Argentina, somente 6 apresentaram surdez (20%). O que comprova a hipótese mencionada de que outros fatores modulam a expressividade do fenótipo.

As mutações envolvendo a posição 961 do *12S rRNA* foram estudadas por estarem associadas à perda auditiva não-sindrômica (CASANO *et al.*, 1999; LI *et al.*, 2004). A inserção C na posição 961 foi encontrada coexistindo com a mutação C1494T em famílias Chinesas (ZHAO *et al.*, 2004). As mutações T961G e 961delT/insC foram descritas associadas com a perda auditiva com uso de aminoglicosídeos (ZHAO *et al.*, 2004; CASANO *et al.*, 1999). Sugere-se que a inserção de C na posição 961 associada à mutação A1555G, provoca um rRNA com uma estrutura secundária muito mais alterada, aumentando a idade de aparecimento, assim como a gravidade da perda auditiva (LI *et al.*, 2004). Nesse trabalho, entretanto, não foi observado nenhum paciente com mutação na posição 961.

### 4. Mutação no gene *TRMU*

Acredita-se que a mutação G28T em homozigose deva agir em sinergia com a mutação mitocondrial A1555G, diminuindo o processo de tradução mitocondrial abaixo do limiar de patogenicidade.

CHAIG e colaboradores (2008) observaram a mutação G28T em homozigose no gene nuclear *TRMU*, afirmando que esse gene modula a gravidade da perda auditiva associada a mutações no mtDNA. Dessa forma, a mutação G28T no gene *TRMU* foi analisada nos indivíduos estudados na tentativa de correlacionar com mutações mitocondriais e o fenótipo dos indivíduos estudados.

A mutação G28T foi encontrada em 13 indivíduos analisados. Todos os pacientes possuem essa mutação em heterozigose. Nesse trabalho foi encontrado 1 indivíduo que possui a mutação A827G e a mutação G28T em heterozigose. Este indivíduo pertence ao grupo controle A. A dificuldade encontrada de correlação destas mutações se dá ao fato de que ambas as mutações foram descobertas recentemente e ainda não existem estudos populacionais da frequência destas mutações, além desta paciente possuir uma audiometria normal. Uma vez que foram observados 8 indivíduos pertencentes ao grupo controle com a mutação G28T, é necessário fazer-se, para um melhor esclarecimento, um estudo descritivo longitudinal onde os pacientes do grupo controle devem ser observados ao longo de vários anos com a finalidade de avaliar uma possível perda auditiva súbita que possa ser devida a mutações presentes.

Os dados obtidos nesse trabalho não foram suficientes para comprovar a modulação pela mutação G28T, sendo necessários estudos complementares, como estudos funcionais e o rastreamento de outros genes nucleares.

### 5. Polimorfismo V27I

O polimorfismo V27I (79G/A) foi encontrado em três pacientes, sendo os pacientes 12 e 17 do grupo A (C) e o paciente 21 do grupo B (SS). Em todos esses indivíduos a alteração foi observada em heterozigose. Este polimorfismo trata-se da substituição do aminoácido valina por isoleucina no códon 27. Está situado no primeiro domínio transmembrânico da proteína. A variação da base G para a base A na posição 29 do gene *GJB2* foi também previamente descrita por KELLEY e colaboradores em 1998.

Já descrito em muitos trabalhos, o polimorfismo V27I está localizado no primeiro domínio transmembrânico da proteína Cx26. Estudos populacionais indicam que não há correlação entre a alteração V27I e a perda auditiva, uma vez que esta é observada na população normal. Em japoneses observa-se uma frequência extremamente alta desse polimorfismo (ABE *et al.*, 2000).

É fato que, 90% dos casos de Surdez Súbita, apesar da pesquisa exaustiva, continuam sem causa definida. Os fatores etiológicos provavelmente envolvidos nos casos idiopáticos são em geral atribuídos a distúrbios microcirculatórios, infecções virais e processos auto-imunes. É possível que causas genéticas estejam associadas talvez em genes ainda não descritos, ou mesmo relacionado a genes de suscetibilidade, os quais ainda estão sendo abordados na literatura científica, contudo sem dados mais consistentes e precisos.

Por meio de análises estatísticas tentou-se encontrar algum valor significativo nas mutações encontradas, relacionando com mutações observadas no grupo controle. Uma vez que em todas as análises obteve-se o P-valor não significativo, conclui-se a necessidade um estudo longitudinal prolongado. Como não existem estudos de frequência destas mutações relacionadas à SS na população tanto brasileira quando mundial, é importante fazer uma comparação ou uma análise estatística a respeito, sendo necessário mais estudos em um período de tempo observacional maior.

Nesse trabalho, a inexistência de correlação das alterações estudadas e da perda auditiva súbita, fica ainda mais evidente com os achados observados no indivíduo 9 do grupo A (C). Nesse indivíduo foram encontradas três mutações, as quais foram previamente associadas de alguma forma à perda auditiva: as mutações G7444A, A827G e TRMU (G28T). Esse indivíduo foi selecionado como controle, sua audiometria é normal e sem histórico de uso de antibióticos aminoglicosídeos. Apesar de a Surdez Súbita ter um acometimento maior na idade entre 40 e 60 anos e deste indivíduo possuir 62 anos, não se pode garantir que este não possa no futuro apresentar uma perda auditiva súbita, assim como outros indivíduos do grupo controle que possuem mutações genéticas.

A análise molecular de indivíduos com perda auditiva é extremamente relevante em nossa população. A natureza genética dos casos esporádicos de surdez muitas vezes

não é suspeitada, e as famílias que possuem um único indivíduo com perda auditiva sensório-neural não-sindrômica certamente se beneficiarão dessas análises. Da mesma forma que, na literatura científica observam-se casos sindrômicos com mutações na conexina, é pertinente a abordagem genética em casos com inicial hipótese diagnóstica de rubéola e/ou outras mutações que podem de alguma forma afetar a conexina e causar uma Surdez Súbita. Entretanto, a etiologia da Surdez Súbita, se em alguns casos for genética, não deve estar associada com as mutações rastreadas nesse estudo.

Com o avanço das pesquisas nos aspectos genéticos da surdez, pôde-se observar a importância dos estudos de mutações em genes envolvidos na perda auditiva. O grande número de casos com mutações identificadas faz com que aumentem as expectativas com relação ao aconselhamento genético.

No caso do gene da conexina 26, a viabilidade e os benefícios de *screening* de mutações estão se refletindo na saúde pública. O uso de testes moleculares em conjunto com os audiológicos ajudarão na detecção precoce da surdez, aconselhamento genético e no acompanhamento dos pacientes, em particular nos casos de surdez progressiva, pois a estimulação da linguagem em seu período crítico fará com que as crianças aprendam a se comunicar antes que a surdez se torne mais severa. Como o gene da conexina 26 é realmente a causa mais frequente da surdez de origem genética, ele deve ser o primeiro gene estudado, como foi a proposta desse projeto para perda auditiva súbita.



Não foi possível correlacionar às mutações estudadas com a Surdez Súbita Idiopática nos indivíduos estudados, provavelmente, devido à grande heterogeneidade genética existente nesses casos.

Não foi encontrado a mutação 35delG em nenhum dos pacientes, porém sua grande incidência na população, não descarta a sua importância de estudo. As deleções envolvendo o gene *GJB6* também não foram detectadas neste estudo e, portanto, parece não estar relacionadas à surdez súbita.

Em relação às mutações mitocondriais, as alterações A1555G e C1494T rastreadas no presente trabalho, não foram detectadas em nenhum dos indivíduos estudados. A mutação A827G, por sua vez, foi encontrada em 6 indivíduos, 3 pertencentes a grupo SS e 3 pertencentes a grupo controle. Acredita-se que para os indivíduos que possuem esta mutação e a perda auditiva, outros fatores possam modular a expressividade do fenótipo e justificar a surdez.

A mutação G7444A foi encontrada no indivíduo 9 grupo controle A, que também apresentou as mutações G28T e A827G. Não foi possível obter-se uma correlação entre essas mutações.

A mutação no gene *TRMU* foi encontrada em 14 indivíduos, 9 pacientes com SS e 5 indivíduos do grupo controle. Acredita-se que esta mutação não esteja envolvida na modulação da expressão das mutações mitocondriais estudadas.

Em três indivíduos foram encontrados a alteração V27I no gene *GJB2*, que é considerada um polimorfismo e, portanto, não está relacionada à surdez nesses casos.

Existe a necessidade de outros estudos para que se aprofundem os achados observados nesse trabalho, incluindo a avaliação de outros fatores genéticos que possam contribuir com o fenótipo da perda súbita de audição.

## **REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

---

## 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.
- 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<sup>(UCN)</sup> 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.
- ANDERSON, C. W.; STEVENS, M.H. Synchronous tuberculous involvement of both ears and the larynx in a patient with active pulmonary disease. **La ringostope.** Jun;91(6):906-9. 1981.
- AVRAHAN, K.B. Motors, channels and sounds of silence. **Nat. Med.** 3(6):608-609, 1997.
- BALLANA, E.; MORALES, E.; RABIONET, R. *et al.* Mitochondrial 12S RNA gene mutations affect RNA secondary structure and lead to variable penetrance in hearing impairment. **Biochem Biophys Res Commun.** :341:950-957. 2006.
- BERRETTINI, S.; FORLI, F.; PASSETTI, S.; ROCCHI, A.; POLLINA, L.; CECCHETTI, D.; MANCUSO, M.; SICILIANO, G. Mitochondrial non-syndromic sensorineural hearing loss: a clinical, audiological and pathological study from Italy, and revision of the literature. **Bioscience Rep.** V. 28 (1), 49-59, 2008.
- BERROCAL, J.R.G.; CAMACHO, R.R.; PORTERO, F.; VARGAS, J.A. Role of viral and Mycoplasma pneumoniae infection in idiopathic sudden sensorineural hearing loss. **Acta Otolaryngol.** 120:835-9, 2000.
- BITTAR, R.S.M.; THOMÉ, D.C.; NASCIMENTO, E.V.; SANCHEZ, T.G. Doenças auto-imunes da orelha interna: revisão da literatura. **Arq. Otorrinolaringol.** 2(3):92-9. 1998.
- BRÉGEON, D.; COLOT, V.; MIROSLAV, M.; REDMAN, M.; TADDEI, F. Translational misreading: a tRNA modification counteracts a + 2 ribosomal frameshift. **Genes Dev.** 15:2295-2306. 2001.
- BROWN, M.D.; TORRONI, A.; RECKORD, C.L. *et al.* Phylogenetic analysis of Leber's hereditary optic neuropathy mitochondrial DNA's indicates multiple independent occurrences of the common mutations. **Human Mutation.** 6:311-325, 1995.
- BYKHOVSKAYA, Y. *et al.* Phenotype of non-syndromic deafness associated with the mitochondrial A1555G mutation is modulated by mitochondrial RNA modifying enzymes *MTO1* and *GTPBP3*. **Molecular Genetics and Metabolism.** 83:199-206. 2004.
- 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

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

---

- 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.
- CHAIG, M.R.; ZERNOTTI, M.E.; SORIA, N.W.; ROMERO, O.F.; GEREZ, N.M. A mutation in mitochondrial 12S rRNA, A827G, in Argentinean family with hearing loss after aminoglycoside treatment. **Bioch. and Biophys. Res. Com.** 368, 631-636, 2008.
- 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.
- DE KLEYN, A. Sudden complete or partial loss of function of the octavus-system in apparently normal persons. **Acta Otolaryngol.** (Stockh) 32:407-429, 1944.
- DEL CASTILLO, I.; MORENO-PELAYO, M. A.; DELCASTILLO, F. J.; BROWNSTEIN, Z.; MARLIN, S.; ADINA, Q. - 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 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.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

---

- 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.
- DI NARDO, P.J.; COBALCHINI, P.C.; BARRETO, R.T.M.; VACARO, T.; REIS, H.G. Surdez súbita. **R. méd. PUCRS**. 12 (2), p. 192-5 abr./jun., 2002.
- 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.
- 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. 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.
- FOWLER, E.P. Sudden deafness. **Ann Otol Rhinol Laryngol**. 59:980-7, 1950.
- FUKADA, Y.; GANANÇA, F.F.; TESTA, J.R.G. Surdez súbita simultânea bilateral em caso de neuroma do acústico unilateral. **Acta AWHO**. 12(2):80-3, 1993.
- GERIDO, D.A. & WHITE, T.W. Connexin disorders of the ear, skin, and lens. **Bioch BIOPHY ACT**, 1662: 159-170, 2004.
- 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.; FISCHEL-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<sup>Ser</sup>(UCN) precursor processing, has long-range effects on NADH dehydrogenase subunit ND6 gene expression. **Mol Cell Biol**. Oct;18 (10):5868-79, 1998.
- GUAN, M.X.; FISCHEL-GHODSIAN, N.; ATTARDI, G. Nuclear background determines biochemical phenotype in the deafness-associated mitochondrial 12S rRNA. **Hum. Mol. Genet.** (10): 573-580, 2001.
- GUAN, M.; YAN, Q.; LI, X.; BYKHOVSKAYA, Y.; TERAN, J.; HAJEK, P.; GHODSIAN-FISCHEL, N. *et al.* Mutation in TRMU related to transfer RNA modification modulates the phenotypic

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

---

- expresión of the deafness-associated mitochondrial 12S ribosomal RNA mutations. **The Am. J. of Hum. Genet.** V.79:291-302, 2006.
- HALL, S.J.; MCGUIGAN, J.A.; ROCKS, M.J. Red Blood cell deformability in sudden sensorineural deafness: another aetiology? **Clin otolaryngol.** June; 16:3-7. 1991.
- HALLBERG, O.E. Sudden deafness of obscure origin. **Laryngoscope.** 66(10):1237-67, 1956.
- HEREDITY HEARING LOSS HOMEPAGE. <http://webh01.ua.ac.be/hhh/> , consultado em Fevereiro de 2008.
- HIGGS, W.A. Sudden deafness as the presenting symptom of acoustic neurinoma. **Arch Otolaryngol.** 98:73-6, 1973.
- HUTCHIN, T.; LENCH, N.J.; ARBUZOVA, S.; MARKHAN, 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.
- JOHNS, D.R. Mitochondrial and disease. **N. Engl. Med.** 333: 638-644, 1995.
- KALATZIS, V. & PETIT, C. The fundamental and medical impacts of recent progress in research on hereditary hearing loss. **Hum. Mol. Genet. Rev.** 7(10):1589-97, 1998.
- KELLEY, P.M.; HARRIS, D.J.; COMER, B.C.; ASKEW, J.W.; FOWLER, T.; SMITH, S.D.; KIMBERLING, W.J. Novel mutations in the connexin 26 gene (GJB2) that cause autosomal recessive (DFNB1) hearing loss. **Am. J. Hum. Genet.** 62(4):792-99, 1998.
- 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 JC, 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.
- 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.
- KOSUGI, E. M.; TANGERINA, R.P.; DIB, G.C.; RAMOS, V.L.; PENIDO, N.O. Schwannoma vestibular como causa de surdez súbita. **Rev. Bras. De Otorrinolaringologia.** 70(6), 2004.
- KOKOTAS, H.; PETERSEN, M.B.; WILLEMS, P.J. Mitochondrial deafness. **Clin Genet.** May;71(5):379-91. Review, 2007.
- KUPKA, S.; TÓTH, T.; WRÓBEL, M.; ZEISSLER, U.; SZYFTER, W.; SZYFTER, K.; NIEDZIŁSKA, G.; BAL, J.; ZENNER, H.P.; SZIKLAI, I.; BLIN, N.; PFISTER, M. Mutation A1555G in the 12S

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

---

- 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. Expression of the gap-junction connexins 26 and 30 in the rat cochlea. **Cell Tissue Res** 294: 415-420, 1998.
- LAZZARINI, P.R. & CAMARGO, A.C.K. Surdez súbita idiopática: aspectos etiológicos e fisiopatogênicos. **Rev. Brasil. de Otorrinolaringol.** v. 72, n.4, jul./ago. 2006.
- LEVINGER, L.; MORL, M.; FLORENTZ, C. Mitochondrial tRNA 3'end metabolism and human disease. **Nucleic. Acids. Res.** 32, 5430-5441, 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.; TELLISGHI, F.F. Emissões otoacústicas na prática clínica. In: 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.** 143(4):876-83, 2001.
- MAIA, R.A.; CAHALI, S. Surdez súbita. **Rev. Bras. Otorrinolaringol.** v.70, n.2, mar./abr., p.238-48. ISSN 00347299. 2004.
- 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.** 143(4):876-83, 2000.
- MATTHIES, C. & SAMII, M. Management of 1000 vestibular schwannomas (acoustic neuromas): Clinical presentation. **Neurosurgery.** 40, 1:1-10, 1997.
- MCCABE, B.F. Autoimmune sensorineural hearing loss. **Ann Otol.** 88:585-9, 1979.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

---

- MERCHANT, S.N.; DURAND, M.L.; ADAMS, J.C. Sudden deafness: Is it viral? **ORL**, 70:52-62, 2008.
- MONSIEUR I.; BOUCCARA, D.; STERKERS, O. Sudden hearing loss in 1997: etiopathogenic hypothesis, management, prognostic factors and treatment. **Ann Otolaryngol Chir Cervicofac**. 114(7-8):251-66. 1997.
- MORELL, R. J.; KIM, H.J.; HOOD, L.J.; GOFORTH, L.; FRIDERICI, K.; FISHER, R. 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.
- NAKAMURA, M.; WHITLOCK, G.; AOKI, N.; NAKASHIMA, T.; HOSHINO, T.; YOKOYAMA, T. *et al.* Japanese and western diet and risk of idiopathic sudden deafness: a case-control study using pooled controls. **Int J Epidemiol**. 30:608-15, 2001.
- NASCENTES, S.M.; PAULO, E.A.; ANDRADE, E.C.; SILVA, A.L.; VASSOLER, T.M.; SCANAVINI, A.B. Sudden deafness as a presenting symptom of acoustic neuroma: case report. **Rev. Bras. Otorrinolaringol**. v.73, n.5, sept./oct. 2007.
- NOBREGA, M.; WECKX, L.L.; JULIANO, Y. Study of the hearing loss in children and adolescents, comparing the periods of 1990-1994 and 1994-2000. **Int. J. Pedriats Otorhinolaryngol**. V.69(6):829-38. 2005.
- NOMURA, Y. Diagnostic criteria for sudden deafness, mumps deafness and perilymphatic fistula. **Acta. Otolaryngol. Suppl.** 456:7-8, 1998.
- OHINATA, Y.; MAKIMOTO, K.; KAWAKAMI, M.; HAGINOMORI, S.; ARAKI, M.; TAKAHASHI, H. Blood viscosity and plasma viscosity in patients with sudden deafness. **Acta Otolaryngol**. Nov;114(6):601-7. 1994.
- 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, C.A.; ALEXANDRINO, F.; ABE-SANDES, K. **Human Biology** 76 (2), 2004.
- PANDYA, A.; XIA, X.J.; ERDENETUNGALAG, R. *et al.* Heterogenous point mutations in the mitochondrial tRNA Ser(UCN) precursor coexisting with the A1555G mutation in deaf students from mongolia. **Am. Journal of Hum. Genet.** 65:1803-1806, 1999.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

---

- PANDYA, A.; MASSIELLO, B.; LANDA, B. *et al.* The frequency and characterization of mitochondrial hearing loss in a national DNA repository from deaf US probands. **American Journal of Human Genetics**. 71(Suppl): A1020, 2002.
- 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.
- 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.
- PENIDO, N.O.; RAMOS, H.V.L.; BARROS, F.A.; CRUZ, O.L.M.; TOLEDO, R.N. Fatores clínicos, etiológicos e evolutivos da audição na surdez súbita. **Rev. Bras. De Otorrin.** v. 71, n.5, 633-638, 2005.
- PITKARANTA, A. & JULKUNEN, I. Sudden deafness: lack of evidence for systemic viral infection. **Otolaryngol Head Neck Surg**; 118(3pt1):297-9, 1998.
- 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.
- RAMOS, H.V.L.; BARROS, F.A.; YAMASHITA, H.; PENIDO, N.O.; SOUZA, A.C.V.; YAMAOKA, W.Y. Ressonância Magnética em surdez súbita. **Rev. Bras. Otorrinolaringol.** 71(4), 422-6, 2005.
- RAMUSSEN, H. Sudden deafness. **Acta Otolaryngol.** 37:65-70, 1949.
- 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.
- 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. Molecular epidemiology of DFNB1 deafness in France. **BMC Med Genet**, 5(5): 1-10, 2004.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

---

- RUSSO, I.C. Overview of audiology in Brazil: state of the art. **Audiology**. 39(4): 202-6. 2000.
- 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.
- SEVIOR, K.B.; HATAMOCHI, 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.
- SCHICK, B.; BRORS, D.; KOCH, O.; SCHAFFERS, M.; KAHLE, G. Magnetic resonance imaging in patients with sudden hearing loss, tinnitus and vertigo. **Otology & Neurotology**. 22(6):808-12, 2001.
- SIMÕES, A.M & MACIEL-GUERRA, A.T. A surdez evitável: predominância de fatores ambientais na etiologia da surdez sensorio-neural profunda. **Jornal de Pediatria**. 68:254-257, 1992.
- SLATTERY, W.H.; FISHER, L.M.; IQBAL, Z. Intratympanic steroid injection for treatment of idiopathic sudden hearing loss. **Otolaryngol Head Neck Surg**. 133:251-9, 2005.
- TANG, H.Y.; HUTCHESON, E.; NEILL, S. *et al.* 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, 2000.
- VAN CAMP, G.; WILLEMS, P.J.; SMITH, R.J.H. Nonsyndromic hearing impairment: unparalleled heterogeneity. **Am. J. Hum. Genet.** 60:758-764, 1997.
- VASAMA, J.P. & LINTHICUM, F.H. Idiopathic sudden sensorio-neural hearing loss: temporal bone histopathologic study. **Ann Otol Rhinol Laryngol**. 209:527-32, 2000.
- WANG, Q.; LI, Q.Z.; HAN, D.; ZHAO, Y.; ZHAO, L.; QIAN, Y.; YUAN, H.; LI, R.; ZHAI, S.; YOUNG, W.Y.; GUAN, M.X. Clinical and molecular analysis of a four generation Chinese family with aminoclyside-induced and non syndromic hearing loss associated with the mitochondrial 12S rRNA C1474T mutation. **Biochem Biophys Res Commun (Biochemical dn biophysical research communications)**. 340(2): 583-8, 2006.
- WEISS-BRUMMER, B.; HUTTENHOFER, A. The paromomycin resistance mutation in the 15S rRNA gene of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* is involved in ribosomal frameshifting. **Mol. Gen. Genet.** 217:362-369, 1989.
- WILCOX, E.R.; FEX, J. Construction of a cDNA library from microdissected guinea pig organ of Corti. **Hear Res**, 62(1): 124-6, 1992.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

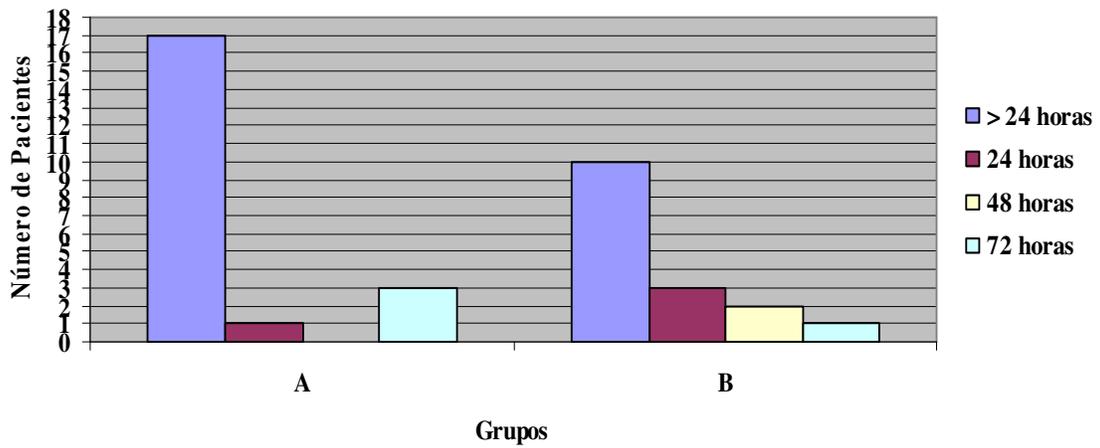
---

- WILCOX, E.R.; 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.** Apr;106(4):399-405. 2000.
- WILLECKE, K.; EIBERGER, J.; DEGEN, J.; ECKARDT, D.; ROMUALDI, A.; GULDENAGEL, M. Structural and functional diversity of connexin genes in the mouse and human genome. **Biol Chem**, 383: 725-737, 2002.
- WWW.AAP.ORG
- 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.
- YAN, Q.; LI, X.; FAYE, G.; GUAN, M.X. Mutations in MTO2 related to tRNA modification impair mitochondrial gene expression and protein synthesis in the presence of a paromomycin resistance mutation in mitochondrial 15S rRNA. **J. Biol. Chem.** 280:29151-29157, 2005.
- YOUNG, W.Y.; ZHAO, L.; QIAN, Y.; WANG, Q.; LI, N.; GREINWALD, J.H.; GUAN, M.X. Extremely low penetrance of hearing loss in four Chinese families with the mitochondrial 12S rRNA A1555G mutation. **Biochem Biophys Res Commun.** 328:1244-1251, 2005.
- YUAN, H.; QIAN, Y.; XU, Y.; CAO, J.; BAI, L.; SHEN, W.; JI, F.; ZANG, X.; KANG, D.; MO, J.Q.; GREINWALD, J.H.; ZHAI, S.; YOUNG, W.Y.; GUAN, M.X. Conseggregation of the G7444A mutation in the mitochondrial COI/tRNA<sup>Ser(UCN)</sup> genes with the 12S rRNA A1555G mutation in a Chinese family with aminoglycoside-induced and non-syndromic hearing loss. **Am. J. Genet.** 138A, 133-140, 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.** 2004 Jan;74(1):139-52. Epub 2003
- ZHAO, H.; LI, R.; WANG, Q.; YAN, Q.; DENG, J.H.; HAN, D.; BAI, Y.; YOUNG, W.; GUAN, M. 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.** 74:139-152, 2004, epub 2003.
- 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.



1.

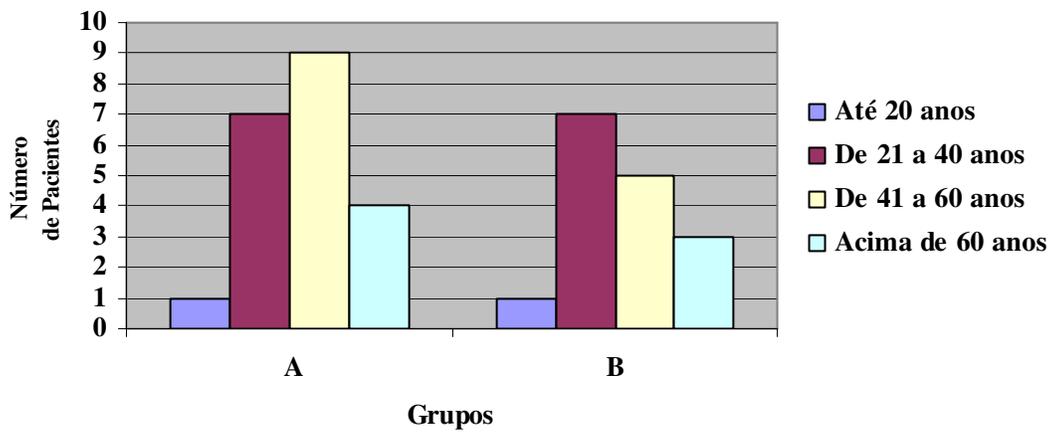
### Tempo de Instalação



Graf. 1. Classificação da perda auditiva quanto ao tempo de instalação

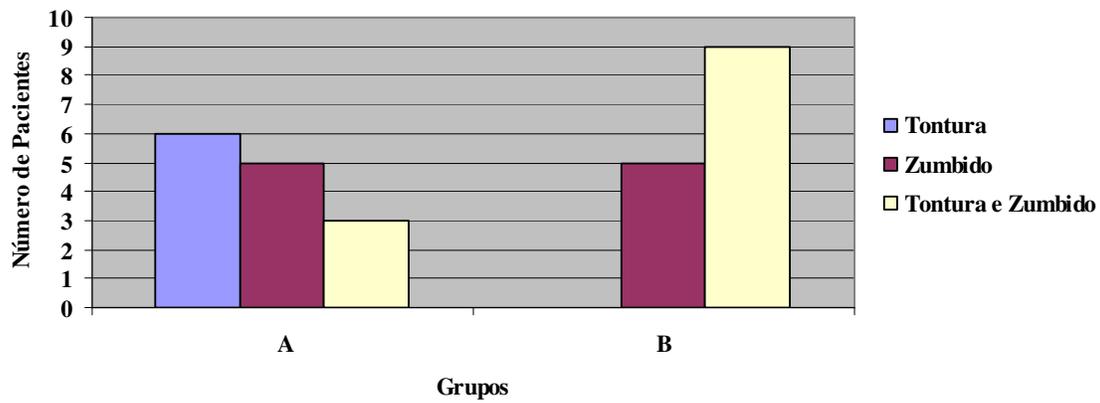
2.

### Idade do Aparecimento da Perda Auditiva



Graf. 2. Idade do aparecimento da perda auditiva.

3.

**Sintomas Associados a Perda Auditiva**

Graf. 3. Sintomas associados à perda auditiva.

---

---

**TERMO DE CONSENTIMENTO INFORMADO LIVRE E ESCLARECIDO**

---

---

**PROJETO: Estudo Genético em Indivíduos com Surdez Súbita**

**PESQUISADORES RESPONSÁVEIS:**

Dra. Edi Lúcia Sartorato – Centro de Biologia Molecular e Engenharia Genética/  
CBMEG/ UNICAMP

Jessica Carvalho Bergmann – e-mail: j049791@dac.unicamp.br

**ENDEREÇO:**

Centro de Biologia Molecular e Engenharia Genética - UNICAMP

Cidade Universitária Zeferino Vaz

Campinas – SP – CEP 13081-970

Fone: (19) 3788-1147

e-mail: sartor@unicamp.br

**IDENTIFICAÇÃO DO PACIENTE:**

Nome:

Registro do Hospital:

Nome do pai:

Nome da mãe:

Endereço:

Bairro:

Cidade:

UF:

CEP:

Fone:

**OBJETIVO DA PESQUISA:**

Eu \_\_\_\_\_, R.G.: \_\_\_\_\_,

entendo que fui convidado a participar como voluntário de um projeto de pesquisa, aprovado pelo Comitê de Ética da FCM-UNICAMP envolvendo a avaliação genético-molecular dos indivíduos com Surdez Súbita, ou seja, que perderam a audição subitamente. O objetivo desta pesquisa é investigar mutações nos genes GJB2 e GJB6, que são os principais genes estudados para identificação da perda de audição, e sua

relação com as características clínicas da doença, assim como verificar os níveis de expressão das conexinas envolvidas neste estudo. O sangue coletada para extração do DNA, serão preservados se assim o voluntario desejar. Caso houver interesse de realizar um novo projeto de pesquisa com este material, o mesmo será submetido à análise do CEP e um novo consentimento será solicitado. O sigilo será mantido através da identificação dos pacientes por um código.

### **RISCO E DESCONFORTO:**

Para a extração de DNA, serão necessários cerca de 5 ml de sangue venoso, que poderão ser obtidos em uma única ou mais coletas considerando as condições e faixa etária do paciente. Os riscos associados a esse procedimento são mínimos, podendo ocorrer dor e/ou manchas roxas (equimoses) no local da coleta de sangue. O desconforto será mínimo, pois, em geral, essa coleta será realizada da veia do braço, por profissional treinado e devidamente habilitado a realizá-la.

### **VANTAGENS:**

Eu entendo que a minha participação neste projeto é voluntária e que as informações desta pesquisa em relação ao perfil genotípico estarão à minha disposição e que, se encontrado alterações genéticas, a perda da surdez poderá ser esclarecida e o paciente poderá ser encaminhado para um aconselhamento genético permitindo que o paciente seja adequadamente orientado quanto ao risco de repetição entre os próximos filhos.

### **SIGILO:**

Eu entendo que toda informação médica, assim como os resultados desse projeto de pesquisa, serão sigilosos. Se os resultados ou informações fornecidas forem utilizados para fins de publicação científica, nenhum nome será utilizado.

### **FORNECIMENTO DE INFORMAÇÃO ADICIONAL:**

Eu entendo que posso requisitar informações adicionais relativas ao estudo a qualquer momento. As responsáveis pela pesquisa, Dra. Edi Lúcia Sartorato fone (19)

3788-1147 e Jessica Carvalho Bergmann fone (19) 3788-1091 estarão disponíveis para responder às minhas questões e preocupações. No caso de dúvidas sobre questões éticas do estudo, poderei ligar para a secretaria da Comitê de Ética da Faculdade de Ciências Médicas – UNICAMP, fone (0XX19) 3788-8936.

**RECUSA OU DESCONTINUAÇÃO DA PARTICIPAÇÃO:**

Eu entendo que a participação nesse projeto de pesquisa é voluntária e que eu posso recusar ou retirar meu consentimento, a qualquer momento (incluindo a retirada da amostra de sangue). Eu reconheço, também, que as responsáveis pela pesquisa podem interromper a minha participação nesse estudo a qualquer momento que julgar apropriado. A minha participação na pesquisa:

inclui o armazenamento do material para pesquisa de genes futuros.

determina que o material deva ser descartado após o término da pesquisa.

Declaro que recebi copia do presente Termo de Consentimento

Nome do participante: \_\_\_\_\_

Assinatura do participante: \_\_\_\_\_

Nome da testemunha: \_\_\_\_\_

Assinatura da testemunha: \_\_\_\_\_



FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS  
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

[www.fcm.unicamp.br/pesquisa/etica/index.html](http://www.fcm.unicamp.br/pesquisa/etica/index.html)

CEP, 13/08/06.  
(Grupo II)

**PARECER PROJETO:** Nº 161/2006 (Este nº deve ser citado nas correspondências referente a este projeto)  
**CAAE:** 0111.0.146.000-06

## I-IDENTIFICAÇÃO:

**PROJETO:** “ESTUDO GENÉTICO EM INDIVÍDUOS COM SURDEZ SÚBITA”  
**PESQUISADOR RESPONSÁVEL:** Edi Lucia Sartorato  
**INSTITUIÇÃO:** CEBMEG/UNICAMP  
**APRESENTAÇÃO AO CEP:** 10/04/06

## II - OBJETIVOS

Determinar possíveis causas genéticas de surdez súbita em pacientes que tenham perdido a audição de um ou ambos ouvidos.

## III - SUMÁRIO

Trata-se de um estudo multicêntrico, do tipo transversal e descritivo. Serão estudados 20 indivíduos de ambos os sexos, com diagnóstico audiológico de surdez súbita uni ou bilateral que tenham realizado audiometria tonal e concordem em participar do estudo. Após assinatura do Termo de Consentimento, será agendado um dia para realização da anamnese e coleta de sangue (5 mL), na Fono Áudio Clínica. O sangue coletado será enviado para o Laboratório de Genética Humana (CBMEG) da Unicamp, onde será realizado o exame genético.

## IV - COMENTÁRIOS DOS RELATORES

O projeto é bem fundamentado; não apresenta risco para os participantes do estudo, além dos normalmente presentes em coleta de sangue. O termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE) foi adequado e contempla as normas da Resolução 196/96 e suas complementares.

## V - PARECER DO CEP

O Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP, após acatar os pareceres dos membros-relatores previamente designados para o presente caso e atendendo todos os dispositivos das Resoluções 196/96 e complementares, resolve aprovar sem restrições o Protocolo de Pesquisa, bem como ter aprovado o Termo do Consentimento Livre e Esclarecido, assim como todos os anexos incluídos na Pesquisa supracitada.

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

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

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



## VI - INFORMAÇÕES COMPLEMENTARES

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

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

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

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

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

## VII - DATA DA REUNIÃO

Homologado na V Reunião Ordinária do CEP/FCM, em 23 de maio de 2006.

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

**Tabela 6.** Dados genéticos e clínicos dos pacientes que apresentaram mutação.

Nº Pacientes	Sexo	Idade	Mutação GJB2	Mutação mtDNA	Outras mutações	Grau da perda	Evolução	Lado da lesão	Exposição à aminoglicosídeo	Tempo de instalação
<b>Grupo A (SS)</b>										
1	F	34	(-)	(-)	G28T	profunda	s/melhora	esquerda	(-)	súbita
7	F	62	(-)	A827G	(-)	profunda	s/ melhora	esquerda	(-)	súbita
8	F	39	(-)	(-)	G28T	profunda	s/ melhora	esquerda	(-)	súbita
11	F	73	(-)	A827G	(-)	severa	melhora	direita	(-)	súbita
16	F	52	(-)	(-)	G28T	severa	SI	esquerda	(-)	súbita
19	M	54	(-)	(-)	G28T	severa	SI	esquerda	(-)	súbita
20	F	35	(-)	(-)	G28T	profunda	s/melhora	direita	(-)	súbita
21	F	59	(+)	(-)	(-)	severa	s/melhora	direita	(-)	súbita
22	F	63	(-)	(-)	G28T	profunda	s/melhora	direita	(-)	súbita
<b>Grupo A (C)</b>										
1	M	25	(-)	(-)	G28T	-	-	-	-	-
8	F	25	(-)	(-)	G28T	-	-	-	-	-
9	F	62	(-)	A827G/ G7444A	G28T	-	-	-	-	-
10	F	52	(-)	(-)	G28T	-	-	-	-	-
11	F	60	(-)	(-)	G28T	-	-	-	-	-
12	M	52	(+)	(-)	(-)	-	-	-	-	-
15	F	50	(-)	A827G	(-)	-	-	-	-	-
17	M	52	(+)	(-)	(-)	-	-	-	-	-
<b>Grupo B (SS)</b>										
2	F	75	(-)	A827G	(-)	profunda	s/melhora	direita	(-)	súbita
3	F	45	(-)	(-)	G28T	profunda	s/melhora	esquerda	(-)	súbita
5	M	38	(-)	(-)	G28T	moderada	s/melhora	esquerda	(-)	súbita
12	F	60	(-)	(-)	G28T	profunda	s/melhora	direita	(-)	súbita
<b>Grupo B (C)</b>										
2	M	20	(-)	A827G	(-)	-	-	-	-	-

(+) Positivo; (-) Negativo; - não existente; F: feminino; M: masculino; SI – Sem informação; SS: Surdez Súbita; C - Controle

## DECLARAÇÃO

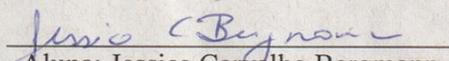
Declaro para os devidos fins que o conteúdo de minha dissertação/ tese de mestrado intitulada Estudo Genético em Indivíduos com Surdez Súbita:

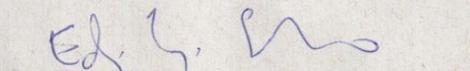
( ) não se enquadra no Artigo 1º, § 3º da Informação CCPG 002/06, referente a bioética e biossegurança.

( ) 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 161/2006).

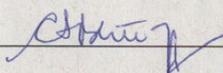
  
Aluna: Jessica Carvalho Bergmann

  
Orientadora: Edi Lucia Sartorato

Para uso da Comissão ou Comitê pertinente:

(X) Deferido ( ) Indeferido *Parecer Projeto 161/2006*

Nome:  
Função:

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

Há três coisas que podemos fazer para limitar o impacto do lixo sobre o meio ambiente: reduzir, reutilizar e reciclar.

### **Reduzir**

A melhor solução é reduzir o lixo que produzimos em primeiro lugar. Por exemplo, só devemos comprar produtos que não venham com muita embalagem e de que realmente precisemos.

Pense cuidadosamente sobre que tipos de materiais são usados nas coisas que compramos. Uma vez que se tornam lixo, eles podem levar muito tempo para se decomporem.

### **Reutilizar**

As pessoas são freqüentemente muito imaginativas ao reutilizarem os objetos, ao invés de jogá-los fora. Por exemplo, podemos amassar as latas de alumínio vazias e usá-las como chapa de metal. Podemos fazer móveis com sobras de madeira e usar vidros bem lavados para guardar alimentos e materiais de carpintaria e de escritório.

### **Reciclar**

Se objetos como garrafas de vidro, latas de metal e de estanho, jornais e plásticos não puderem ser reutilizados, talvez seja possível reciclá-los. Por exemplo, o vidro é lavado em fábricas especiais, quebrado em pedacinhos e, então, derretido para fazer vidro “novo”, pronto para a fabricação de alguma outra coisa.

**Salve nosso planeta. Seja socialmente responsável você também, faça sua parte. Recicle sempre!!!**