

FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
CENTRO DE PESQUISAS GONÇALO MONIZ

Curso de Pós-Graduação em Biotecnologia em Saúde e Medicina
Investigativa

BASES MOLECULARES DA SURDEZ HEREDITÁRIA NÃO-SINDRÔMICA EM
MONTE SANTO-BAHIA-BRASIL

GABRIELLE NOVAIS MANZOLI

Orientadora: Prof^a Dr^a Angelina Xavier Acosta

Co-orientadora: Prof^a Dr^a Kiyoko Abe-Sandes

Dissertação apresentada ao Curso
de Pós-Graduação em
Biotecnologia em Saúde e
Medicina Investigativa para a
obtenção do grau de Mestre.

Salvador – Brasil
2010

GABRIELLE NOVAIS MANZOLI

**BASES MOLECULARES DA SURDEZ HEREDITÁRIA NÃO-
SINDRÔMICA EM MONTE SANTO-BAHIA-BRASIL**

Aprovado em: ____/____/____

Comissão Examinadora:

Dr. Luciano Kalabric Silva
CPqGM-Fiocruz/BA

Dr^a. Regina Célia Mingroni Netto
Universidade de São Paulo (USP)

Salvador – Bahia – Brasil

2010

AGRADECIMENTOS

A Deus pela oportunidade de viver e compartilhar este dom com pessoas tão especiais.

Às orientadoras, Angelina Xavier Acosta e Kiyoko Abe-Sandes, pela orientação nesse estudo, pelos ensinamentos e princípios passados, pela confiança, pela paciência e pela amizade.

A minha família, pais e irmãos que são minha base, força e incentivo para alcançar meus (nossos) objetivos. Em especial aos meus tios/pais Renato Brasileiro e Lêda Novais, por acreditarem, apoiarem e incentivarem o meu crescimento acadêmico, e aos também tios/pais Jorge Santana e Suzete Novais, por facilitarem a realização destes objetivos. Agradeço pelo amor e renúncia.

À Maristela Lopes dos Santos, um dos anjos em minha vida, pelo grande amor, pela dedicação quase exclusiva na minha formação como pessoa e por fazer e ser parte da minha vida.

A Allen Anderson, pelo amor, companheirismo, paciência, apoio e pelo incentivo.

Ao Centro de Pesquisa Gonçalo Moniz/Fiocruz pela possibilidade de desenvolver esse estudo.

Ao Dr. Bernardo Galvão e a Dr^a Maria Fernanda Rios Grassi pela oportunidade de desenvolver este estudo no Laboratório avançado de Saúde Pública (LASP)/CPqGM/Fiocruz.

Aos pacientes pela colaboração e confiança no trabalho desenvolvido.

Ao seu Manuel, residente de Monte Santo, pela grande disponibilidade em contatar familiares viabilizando o atendimento de muitos pacientes.

À prefeitura de Monte Santo-BA, em especial à secretária de saúde Olívia Costa por oferecer condições que facilitaram a realização deste estudo.

À fonoaudióloga Luciene Fernandes e à otorrino Cristina Salles pela disponibilidade na avaliação dos pacientes e contribuições relevantes na realização deste estudo.

À toda equipe da clínica escola da UNIME, pela parceria no atendimento e acompanhamento dos pacientes deste estudo.

Ao grupo INAGEMP pelo grande apoio e colaboração neste trabalho.

À FAPESB e ao CNPQ pelo apoio fundamental para desenvolvimento deste trabalho.

À banca examinadora deste trabalho pela disponibilidade em avaliar e contribuir para este trabalho.

À Dr^a Edi Lúcia Sartorato e sua equipe do Laboratório de Genética Humana do Centro de Biologia Molecular e Engenharia Genética (CBMEG) – UNICAMP por ceder amostras controles para análise das mutações no gene *GJB6*, primer e protocolo para sequenciamento do éxon 2 do gene *GJB2*, bem como por mostrarem sempre disponíveis e atenciosos aos esclarecimentos via e-mail.

Aos amigos do grupo de genética Ana Cláudia, Daniel, Taise, Taisa, Tatiana, Thaís, Karol Urpia, Marcela, Nayara e Roberta pela amizade e companheirismo. Todos contribuíram direta ou indiretamente de forma significativa para realização deste trabalho.

A todos que integram ou integraram o grupo Genética no Sertão, por possibilitarem a realização deste estudo.

À toda equipe do LASP, Cláudio, dona Eugênia, dona Beth, Jurema, Noilson e Rodrigo, que sempre mostraram-se dispostos a ajudar.

À coordenação de ensino, em especial Taise Coutinho pela eficiência e agilidade em resposta às muitas solicitações.

Aos colegas do Laboratório de Patologia e Biologia Molecular (LPBM) pela grande disponibilidade de ajuda ofertada principalmente nos momentos finais deste estudo.

À equipe da plataforma de sequenciamento do CPqGM, em especial a Silvana, pelo grande apoio e pela eficiente padronização do sequenciamento, que facilitou as análises deste estudo.

Aos amigos Aline Miranda, Filipe Rego, Giselle Calasans, Luciane (Tica) e Thessika Hialla pela amizade e por me ajudarem desde os momentos iniciais, sem distinção.

Aos colegas e amigos da pós-graduação, pelo acolhimento, pela alegria nas aulas e pelo compartilhamento dos momentos difíceis sempre com palavras positivas. Em especial a Lorena Pinto pelo carinho e apoio demonstrado desde os momentos iniciais do meu ingresso no curso.

Ao Paulo Melo pela ajuda em momentos antecedentes à inscrição no mestrado auxiliando em relação aos possíveis orientadores e indicando as pessoas certas.

Ao Dr. Márcio Gilberto Costa e a todos que contribuíram com minha iniciação científica, este momento foi essencial para minha formação em pesquisa e para fazer germinar a sementinha que me trouxe a este momento.

À professora Márcia Valéria, exemplo de profissional, de pessoa e de perseverança, pelos ensinamentos adquiridos durante o estágio curricular, os quais auxiliaram grandemente no desenvolvimento deste trabalho.

Aos meus amigos Daniela Costa, Edilson, Josigleide, Gustavo Costa, Renata Baqueiro e Ronaldina, pela amizade, paciência, incentivo, compreensão e torcida durante todos estes anos de pós-graduação.

A todos aqueles cujos nomes não estão aqui citados, mas que muito ajudaram pelo simples fato de serem meus amigos.

MANZOLI, Gabrielle Novais. Bases Moleculares da Surdez Hereditária Não-Sindrômica em Monte Santo-Bahia-Brasil. Dissertação (Mestrado) – Fundação Oswaldo Cruz, Instituto de Pesquisas Gonçalo Moniz, Salvador, 2010.

RESUMO

A surdez genética é heterogênea em sua base molecular, fenótipo e padrão de herança. Apesar desta heterogeneidade, mutações no gene *GJB2* são as principais causas de surdez genética, especialmente entre aquelas com padrão autossômico recessivo (MIM #220290). Neste trabalho investigou-se a origem genética da deficiência auditiva (DA) em pacientes do município de Monte Santo-BA. Oitenta e quatro indivíduos com DA, correspondendo a 38 famílias foram avaliados, responderam questionário clínico-epidemiológico e forneceram dados individuais e familiares para análise genealógica. Foram pesquisadas mutações no gene *GJB2*, as deleções (*GJB6*-13S1830) e (*GJB6*-D13S1854), no gene *GJB6* e a mutação A1555G, no gene mitocondrial 12S rRNA. A investigação foi iniciada pela mutação c.35delG no gene *GJB2*, através de PCR-RFLP com a enzima *Bst*NI, as amostras que não apresentaram essa variante foram genotipadas por sequenciamento do éxon 2 do gene *GJB2*. Cerca de 55% dos indivíduos foram do sexo masculino, a idade média foi de 32 anos (variando de 2–70 anos), 33,9% dos indivíduos referiram-se como brancos, houve relato de consanguinidade entre os pais em 52,1% dos casos, DA familiar foi relatada em 92,8% dos casos, sendo considerada pré-lingual em 90,9% e bilateral em 98,7%. Oito diferentes mutações foram encontradas no gene *GJB2*. Cerca de 24% dos indivíduos, correspondendo a 8 famílias, foram homocigotos e 1 (1,2%) foi heterocigoto para mutação c.35delG. Em uma família com 9 afetados foi encontrada a mutação p.R75Q no gene *GJB2*, que causa DA herdada com padrão dominante, em heterocigose, correspondendo a 14,8% dos pacientes analisados. Encontraram-se ainda 4 mutações relatadas como polimorfismo sem efeito patogênico: p.V27I, p.M34T, c.-15C>T e c.*2C>T, a primeira foi encontrada em 5,8% e as três últimas em 1,2% dos indivíduos e as mutações c.-22-12C>T (5,8%) e p.K168R (1,2%) sem patogenicidade estabelecida. As mutações del (*GJB6*-D13S1830) e del (*GJB6*-D13S1854) no gene *GJB6*, A1555G no gene 12S rRNA não foram detectadas nos pacientes estudados nesta amostra. Foi confirmada etiologia genética em 35,8% dos pacientes e foi observada heterogeneidade alélica e do padrão de herança. Provavelmente mutações em outros genes e/ou fatores ambientais são responsáveis pelos outros casos de DA nessa população.

Palavras-chave: Surdez. Conexinas. Gene *GJB2*. c.35delG. p.R75Q. Gene *GJB6*.

MANZOLI, Gabrielle Novais. Molecular Basis of inherited non-syndromic deafness in Monte Santo, Bahia, Brazil. Dissertação (Mestrado) – Fundação Oswaldo Cruz, Instituto de Pesquisas Gonçalo Moniz, Salvador, 2010.

ABSTRACT

Genetic deafness is heterogeneous in its molecular basis, phenotype and inheritance pattern. Despite this heterogeneity, mutations in GJB2 are the leading causes of genetic deafness, especially among those with autosomal recessive (MIM # 220290). In this study we investigated the origin of genetic hearing loss (HL) patients from Monte Santo, Bahia. Eighty-four patients with HL, representing 38 families were evaluated, patients answered a questionnaire and clinical-epidemiological individuals provided data for analysis and family pedigree. We investigated mutations in the GJB2 gene deletions (GJB6-13S1830) and (GJB6-D13S1854) in GJB6 gene and the A1555G mutation in mitochondrial 12S rRNA gene. The investigation was initiated by a mutation in the gene GJB2 c.35delG by PCR-RFLP with the enzyme BstNI, samples that showed no such variant was genotyped by sequencing of exon 2 of gene GJB2. About 55% of subjects were male, mean age was 32 years (range 20-70 years), 33.9% of subjects reported themselves as white, there were reports of consanguinity between parents in 52.1 % of cases, HL familial was reported in 92.8% of cases being considered pre-lingual in 90.9% and bilateral in 98.7%. Eight different mutations were found in the GJB2 gene. About 24% of individuals, representing eight families, were homozygous and 1 (1.2%) was heterozygous for mutation c.35delG. In a family with nine affected the mutation p.R75Q in heterozygous was found in GJB2 gene, which causes HL inherited with a dominant, corresponding to 14.8% of patients analyzed. There were also four mutations reported as a polymorphism without pathogenic effect: p.V27I, p.M34T, c.-15C> T and c. * 2C> T, the first was found in 5.8% and the last three in a 2% of individuals and mutations c.-22-12C> T (5.8%) and p.K168R (1.2%) without established pathogenicity. Mutations del (GJB6-D13S1830) and del (GJB6-D13S1854) in GJB6 gene, A1555G in the 12S rRNA gene were not detected in the patients studied in this sample. Genetic etiology was confirmed in 35.8% of patients and was observed allelic and the pattern of inheritance heterogeneity. Probably mutations in other genes and / or environmental factors are responsible for other cases of AD in this population.

Keywords: Deafness. Connexins. GJB2 gene. c.35delG. p.R75Q. GJB6 gene.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA 1: Ilustração esquemática da orelha humana	22
QUADRO 1: Descrição dos genes segundo o padrão de herança da DA com destaque em negrito para os genes associados com diferentes padrões de herança.	25
FIGURA 2: Imagem das conexinas Cx43 e Cx45 nas junções comunicantes	28
FIGURA 3: Elementos que interagem nas junções <i>gap</i>	29
FIGURA 4: Desenho esquemático da estrutura do gene <i>GJB2</i> humano	30
FIGURA 5: Localização da mutação A1555G no 12S rRNA mitocondrial em comparação com o 16S rRNA na <i>E. coli</i> e com o 12S rRNA mitocondrial humano sem a respectiva mutação.....	34
FIGURA 6: Heredograma da família N° 10 com indivíduos incluídos no estudo indicados por asterisco	50
FIGURA 7: Gel de acrilamida a 10% corado com nitrato de prata demonstrando a genotipagem da mutação c.35delG através das técnicas de PCR/RFLP (<i>Bst</i> NI).....	51
Quadro 2: Caracterização das mutações encontradas no presente estudo.	53
FIGURA 8: Heredograma da família N° 17 com indivíduos incluídos no estudo indicados por asterisco	56
FIGURA 9: Heredograma da família N° 21 com os indivíduos incluídos no estudo indicados por asterisco.....	57
FIGURA 10: Heredograma da família N° 41 com os indivíduos incluídos no estudo indicados por asterisco.....	105
FIGURA 11: Heredograma da família N° 18 com os indivíduos incluídos no estudo indicados por asterisco.....	105
FIGURA 12: Heredograma da família N° 09 com indivíduos incluídos no estudo indicados por asterisco e indivíduo com presbiacusia na cor cinza.....	106

FIGURA 13: Heredograma da família N° 23 com indivíduos incluídos no estudo indicados por asterisco e indivíduo com presbiacusia na cor cinza.....	106
FIGURA 14: Heredograma da família N° 02 com indivíduos incluídos no estudo indicados por asterisco.....	107
FIGURA 15: Heredograma da família N° 29 com indivíduos incluídos no estudo indicados por asterisco.....	107

LISTA DE TABELAS

TABELA 1: Caracterização demográfica e clínica dos 84 indivíduos com DA incluídos no estudo.....	46
TABELA 2: Descrição das avaliações otorrinolaringológicas e audiológicas.....	48
TABELA 3: Descrição dos genótipos com respectivos números de indivíduos com DA genotipados e frequências (%) na amostra	54
TABELA 4: Frequências alélicas das mutações analisadas em indivíduos com DA de Monte Santo-BA	55
TABELA 5: Caracterização da DA nas famílias com mutações no éxon 2 do gene <i>GBJ2</i>	59
TABELA 6: Caracterização clínica dos pacientes que possuem mutações não patogênicas ou mutações sem patogenicidade estabelecida.....	60
TABELA 7: Comparação entre os grupos de indivíduos com c.35delG com o grupo sem c.35delG.....	61
TABELA 8: Frequência do genótipo homozigoto para mutação c.35delG em indivíduos com DA em diferentes populações.....	64
TABELA 9: Adaptação de informações populacionais, frequências genotípicas e alélicas das mutações c.-22-12C>T, c.-15C>T, p.V27I e p.M34T, depositadas no banco de SNP do NCBI para comparação com as frequências encontradas neste estudo.....	69

LISTA DE ABREVIATURAS

12S	Subunidade 12S do RNA ribossômico
A1	Alfa-1
ACS	Agentes Comunitários de Saúde
ACTG1	Gene <i>actin, gamma 1</i>
CCDC50	Gene <i>coiled-coil domain containing 50</i>
CDH23	Gene <i>cadherin-related family member 23</i>
CL	Alça Intracelular das Proteínas Conexinas
CLDN14	Gene <i>claudin 14</i>
CO1	Gene <i>cytochrome c oxidase subunit I</i>
COCH	Gene <i>coagulation factor C homolog, cochlin (Limulus polyphemus)</i>
COL11A1	Gene <i>collagen, type XI, alpha 1</i>
COL11A2	Gene <i>collagen, type XI, alpha 2</i>
COL2A1	Gene <i>collagen, type II, alpha 1</i>
COL4A3	Gene <i>collagen, type IV, alpha 3</i>
COL4A4	Gene <i>collagen, type IV, alpha 4</i>
COL4A5	Gene <i>collagen, type IV, alpha 5</i>
COL9A1	Gene <i>collagen, type IX, alpha 1</i>
COMT2	Gene <i>catechol O-methyltransferase 2</i>
COOH	Terminal carboxila das proteínas conexinas
CRYM	Gene <i>crystallin, mu</i>
Cx26	Conexina 26
Cx30	Conexina 30
Cx31	Conexina 31
Cx43	Conexina 43

Cx45	Conexina 45
DA	Deficiência Auditiva
dB	Decibel
dBNA.....	Decibel nível de audição
DFN	<i>Deafness</i>
DFNA	<i>Deafness Autosomal Dominant</i>
DFNA5	<i>Deafness, Autosomal Dominant 5</i>
DFNB	<i>Deafness Autosomal Recessive</i>
DFNB1	<i>Deafness, Autosomal Recessive 1</i>
DIAPH1	Gene <i>diaphanous homolog 1 (Drosophila)</i>
DNA	<i>Deoxyribonucleic Acid</i>
E1.....	Domínio Extracelulare das Proteínas Conexinas
E2.....	Domínio Extracelulare das Proteínas Conexinas
EDN3	Gene <i>endothelin 3</i>
EDNRB.....	Gene <i>endothelin receptor type B</i>
EDTA	<i>Ethylenediamine Tetraacetic Acid</i>
ESPN	Gene <i>ectoplasmic specialization protein</i>
ESRRB	Gene <i>estrogen-related receptor beta</i>
EYA1	Gene <i>eyes absent homolog 1</i>
EYA4.....	Gene <i>eyes absent homolog 4 (Drosophila)</i>
FOXI1.....	Gene <i>forkhead box I1</i>
GJ.....	<i>Gap Junction</i>
GJA1.....	Gene <i>Gap Junction Protein Alfa 1</i>
GJB	<i>Gap Junction Protein Beta</i>
GJB2.....	Gene <i>gap junction protein, beta 2, 26kDa</i>

GJB3	Gene <i>gap junction protein, beta 3, 31kDa</i>
GJB6	Gene <i>gap junction protein, beta 6, 30kDa</i>
GRXCR1	Gene <i>glutaredoxin, cysteine rich 1</i>
HET	Heterozigoto
HGF	Gene <i>hepatocyte growth factor (hepapoietin A; scatter factor)</i>
HMM	Homozigoto
IBGE.....	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
KCNE1	Gene <i>potassium voltage-gated channel, Isk-related family, member 1</i>
KCNQ1.....	Gene <i>potassium voltage-gated channel, KQT-like subfamily, member 1</i>
KCNQ4.....	Gene <i>potassium voltage-gated channel, KQT-like subfamily, member 4</i>
kD	Kilodalton
kHz	Kilohertz
Kohm	Kiloohm
LHFPL5	Gene <i>lipoma HMGIC fusion partner-like 5</i>
LOXHD1	Gene <i>lipoxygenase homology domains 1</i>
LRTOMT	Gene <i>leucine rich transmembrane and O-methyltransferase domain containing</i>
M1.....	Domínio Transmembrânico das Proteínas Conexinas
M2.....	Domínio Transmembrânico das Proteínas Conexinas
M3.....	Domínio Transmembrânico das Proteínas Conexinas
M4.....	Domínio Transmembrânico das Proteínas Conexinas
MARVELD2.....	Gene <i>MARVEL domain containing 2</i>
MIM.....	<i>Mendelian Inheritance in Man</i>
MITF.....	Gene <i>microphthalmia-associated transcription factor</i>
mRNA	RNA mensageiro
ms	Milissegundo

MTCO1.....	Gene <i>Mitochondrial Cytochrome c oxidase subunit I</i>
MTRNR1.....	Gene <i>mitochondrially encoded 12S RNA</i>
MTTS1.....	Gene <i>mitochondrially encoded tRNA serine 1 (UCN)</i>
MYH14.....	Gene <i>myosin, heavy chain 14, non-muscle</i>
MYH9.....	Gene <i>myosin, heavy chain 9, non-muscle</i>
MYO15A.....	Gene <i>myosin XVA</i>
MYO1A.....	Gene <i>myosin IA</i>
MYO3A.....	Gene <i>myosin IIIA</i>
MYO6.....	Gene <i>myosin VI</i>
MYO7A.....	Gene <i>myosin VIIA</i>
NCBI.....	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
NDP.....	Gene <i>Norrie disease protein</i>
NH2.....	Terminal Amino das Proteínas Conexinas
OMIM.....	<i>Online Mendelian Inheritance in Man</i>
OMS.....	Organização Mundial da Saúde
OTOA.....	Gene <i>otoancorin</i>
OTOF.....	Gene <i>otoferlin</i>
PAX3.....	Gene <i>paired box homeotic gene 3</i>
pb.....	Pares de Bases
PCDH15.....	Gene <i>protocadherin-related 15</i>
PCR.....	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
PEATE.....	Potencial Evocado Auditivo de Tronco Encefálico
PJVK.....	Gene <i>pejvakin</i>
POU3F4.....	Gene <i>POU domain, class 3, transcription factor 4</i>
POU4F3.....	Gene <i>POU domain, class 4, transcription factor 3</i>

PRPS1.....	Gene <i>phosphoribosyl pyrophosphate synthetase 1</i>
PTPRQ.....	Gene <i>protein tyrosine phosphatase, receptor type, Q</i>
RDX.....	Gene <i>radixin</i>
RFLP.....	Restriction Fragment Length Polymorphism
RNA.....	<i>Ribonucleic Acid</i>
rRNA	RNA ribossômico
SANS.....	Gene <i>Usher syndrome type-1G protein</i>
Ser (UCN).....	<i>Serine (UCN)</i>
SIX1	Gene <i>Sine oculis homeobox homolog 1</i>
SIX5.....	Gene <i>Sine oculis homeobox homolog 5</i>
SLC26A4.....	Gene <i>solute carrier family 26, member 4</i>
SLC26A5.....	Gene <i>solute carrier family 26, member 5 (prestin)</i>
SNAI2.....	Gene <i>snail homolog 2 (Drosophila)</i>
SNP.....	Single Nucleotide Polymorphism
SOX10	Gene <i>SRY (sex determining region Y)-box 10</i>
STRC	Gene <i>stereocilin</i>
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
TCOF1	Gene <i>Treacher Collins-Franceschetti syndrome 1</i>
TECTA.....	Gene <i>tectorin alpha</i>
TFCP2L3	Gene <i>grainyhead-like 2 (Drosophila)</i>
TMC1	Gene <i>transmembrane channel-like 1</i>
TMIE	Gene <i>transmembrane inner ear</i>
TMPRSS3.....	Gene <i>transmembrane protease, serine 3</i>
TPRN.....	Gene <i>taperin</i>
TRIOBP	Gene <i>TRIO and F-actin binding protein</i>

tRNA.....	RNA transportador
UNIME.....	União Metropolitana de Educação e Cultura
USH1C.....	Gene <i>Usher syndrome type-1C protein</i>
USH2A.....	Gene <i>Usher syndrome type-2A protein</i>
USH3A.....	Gene <i>Usher syndrome type-3 protein</i>
UTR.....	<i>Unstranlated Region</i>
VLGR1.....	Gene <i>very large G protein-coupled receptor 1</i>
WFS1.....	Gene <i>Wolfram syndrome 1 (wolframin)</i>
WHRN.....	Gene <i>CASK-interacting protein CIP98</i>

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	20
1.1 ASPECTOS GERAIS DA AUDIÇÃO	20
1.2 DEFICIÊNCIA AUDITIVA (DA) / SURDEZ	22
1.2.1 Deficiência auditiva de origem genética	23
1.2.1.1 Deficiência auditiva síndrômica	24
1.2.1.2 Deficiência auditiva não-síndrômica	24
1.3 CONEXINAS	26
1.4 GENE <i>GJB2</i>	29
1.4.1 Mutação c.35delG no gene <i>GJB2</i>	30
1.5 GENE <i>GJB6</i>	31
1.6 MUTAÇÕES MITOCONDRIAIS E DEFICIÊNCIA AUDITIVA	32
1.6.1 Mutação A1555G	33
2. OBJETIVOS	35
2.1 OBJETIVO GERAL.....	35
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	35
3. MATERIAIS E MÉTODOS	36
3.1 CASUÍSTICA.....	36
3.2 AVALIAÇÃO OTORRINOLARINGOLÓGICA.....	37
3.3 AVALIAÇÃO AUDIOLÓGICA	37
3.3.1 Audiometria tonal liminar	38
3.3.2 Medidas de imitância acústica	38
3.3.3 Potencial evocado auditivo de tronco encefálico (PEATE)	38
3.4 EXTRAÇÃO DE DNA	39
3.5 GENOTIPAGEM	39

3.5.1 Mutação c.35delG	40
3.5.2 Mutações del (<i>GJB6-D13S1830</i>) e del (<i>GJB6-D13S1854</i>)	40
3.5.3 Mutação A1555G	41
3.5.4 Análise do éxon 2 do gene <i>GJB2</i>	42
3.6 NOMENCLATURA DAS MUTAÇÕES NO GENE <i>GJB2</i>	43
3.7 ANÁLISE DOS DADOS	44
4. RESULTADOS	45
4.1 CARACTERIZAÇÃO DA AMOSTRA	45
4.2 AVALIAÇÃO OTORRINOLARINGOLÓGICA.....	46
4.3 AVALIAÇÃO AUDIOLÓGICA	47
4.3.1 Imitanciometria	47
4.3.2 Audiometria tonal liminar	48
4.3.3. Potencial evocado auditivo de tronco encefálico (PEATE)	48
4.4 ANÁLISE DAS GENEALOGIAS	49
4.5. INVESTIGAÇÃO MOLECULAR.....	51
4.5.1. Análise da mutação c.35delG	51
4.5.2. Análise das mutações del (<i>GJB6-13S1830</i>), del (<i>GJB6-D13S1854</i>) e A1555G no gene 12Sr RNA	51
4.5.3. Análise de mutações no éxon 2 do gene <i>GJB2</i>	52
4.5.4. Genótipos e frequências alélicas e genotípicas	54
4.5.5. Descrição das famílias com mutações no gene <i>GJB2</i>	55
4.6 GRUPO COM MUTAÇÃO C.35DELG VERSUS GRUPO SEM MUTAÇÃO C.35DELG	58
5. DISCUSSÃO	62
6. CONCLUSÃO	71

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	72
APÊNDICES	81
ANEXOS	108

1. INTRODUÇÃO

1.1 ASPECTOS GERAIS DA AUDIÇÃO

O sistema auditivo é constituído por orelha externa, orelha média, orelha interna e vias auditivas. Ele integra um sistema especializado de comunicação e, tanto nos humanos quanto em outros animais, permite monitorar os eventos ambientais que possam representar situações de perigo. Nos humanos permite também o processamento de eventos acústicos, como a fala, tornando possível a comunicação como expressão do pensamento (MUNHOZ *et al.*, 2003).

A função da orelha é converter o som em impulso nervoso (GUYTON, 1988). Ela se divide em três partes: externa, média e interna, que dispõe, nessa ordem, de lateral para medial (MENEZES *et al.*, 2005).

As duas primeiras partes constituem o chamado *aparelho de condução* ou *transmissão*, captando e conduzindo, através de vibrações mecânicas dos seus componentes, a energia sonora até a orelha interna (MENEZES *et al.*, 2005). A orelha externa, que amplifica a pressão e favorece a localização dos sons, é constituída pelo pavilhão auricular, meato acústico externo e a face externa da membrana do tímpano (MUNHOZ *et al.*, 2003), enquanto a orelha média é constituída pela *membrana timpânica* (comumente denominada *tímpano*) e pelo *sistema ossicular*, o qual é composto por três ossículos denominados *martelo*, *bigorna* e *estribo* (GUYTON, 1984) (Figura 1A).

A orelha interna é o *aparelho de percepção*, que transforma essas vibrações em impulsos elétricos codificados e os encaminha ao sistema nervoso central para sua interpretação. Pode-se considerar o aparelho de condução como a “parte mecânica” da audição, sendo a orelha interna a “parte elétrica” (MENEZES *et al.*, 2005). A orelha interna dos mamíferos é composta por dois órgãos sensoriais: a cóclea, responsável pela audição, e o vestíbulo, responsável pelo equilíbrio (FRIEDMAN & AVRAHAM, 2009). Seguiremos com maiores detalhes sobre a cóclea, uma vez que a audição é o objeto de estudo deste trabalho.

A cóclea, que tem o aspecto de concha de caracol, é um sistema composto por três tubos diferentes enrolados paralelamente. Estes tubos são denominados: escala vestibular, escala média e escala timpânica. A escala vestibular e a escala média são separadas entre si pela *membrana de Reissner* (também denominada *membrana vestibular*), e a escala timpânica e a escala média são separadas uma da outra pela *membrana basilar*. A membrana de

Reissner é tão delgada e se movimenta com tanta facilidade que não impede por completo a passagem das vibrações sonoras da escala vestibular para a escala média, portanto, no que diz respeito à transmissão sonora, as escalas vestibular e média são consideradas uma câmara única. Apesar disto, esta membrana é importante porque mantém isolado um líquido especial, a endolinfa, na escala média. Esse líquido é necessário para o funcionamento normal das células ciliadas receptoras do som (GUYTON, 1984; MUNHOZ *et al.*, 2003) (Figura 1B).

O órgão de Corti, que se encontra na superfície das fibras basilares e da membrana basilar, é o órgão receptor que gera impulsos nervosos em resposta à vibração da membrana basilar. As células do órgão de Corti responsáveis por gerar o impulso nervoso em resposta aos estímulos mecânicos são as células ciliadas. Dois tipos de *células ciliadas*, uma fileira de *células ciliadas internas*, totalizando cerca de 3.500 células, e três fileiras de *células ciliadas externas*, totalizando cerca de 20.000 células, desempenham a função de receptores deste órgão (GUYTON, 1984) (Figura 1C).

Na superfície apical das células ciliadas externas, projetam-se microvilosidades especializadas, os estereocílios. Essas estruturas são necessárias para conversão do estímulo sonoro (energia mecânica) em sinal elétrico, pois oscilam em resposta ao som que, secundariamente ao movimento do estribo na janela oval, movimenta o líquido que circunda as células ciliadas. Essa deflexão dos estereocílios adjacentes abre os canais de transdução, existentes nos mesmos, permitindo influxo de potássio da endolinfa para ambos os tipos de células ciliadas, causando despolarização da membrana celular e ativando os canais de cálcio da superfície basolateral da membrana, que são sensíveis às alterações de voltagem. O subsequente influxo de cálcio provoca liberação de vesículas, contendo neurotransmissores, nos terminais sinápticos do VIII par craniano. Assim, após estímulo sonoro, as células ciliadas ficam hiperpolarizadas, com alta concentração de potássio intracelular, necessitando que o potássio seja removido para possibilitar excitações seguintes. Esse movimento de íons potássio das células ciliadas para as células de sustentação da cóclea retornando para a endolinfa é feito por meio de comunicações intercelulares especializadas, as junções comunicantes ou junções do tipo *gap*, existentes entre as células de sustentação, nos fibrócitos do ligamento espiral e limbo espiral (DAVIS, 2003 apud PIATTO *et al.*, 2005a). Estas junções são compostas por proteínas denominadas conexinas (PFEILSTICKER *et al.*, 2004), as quais são necessárias para a reciclagem do potássio, no entanto estas estruturas serão melhores descritas posteriormente.

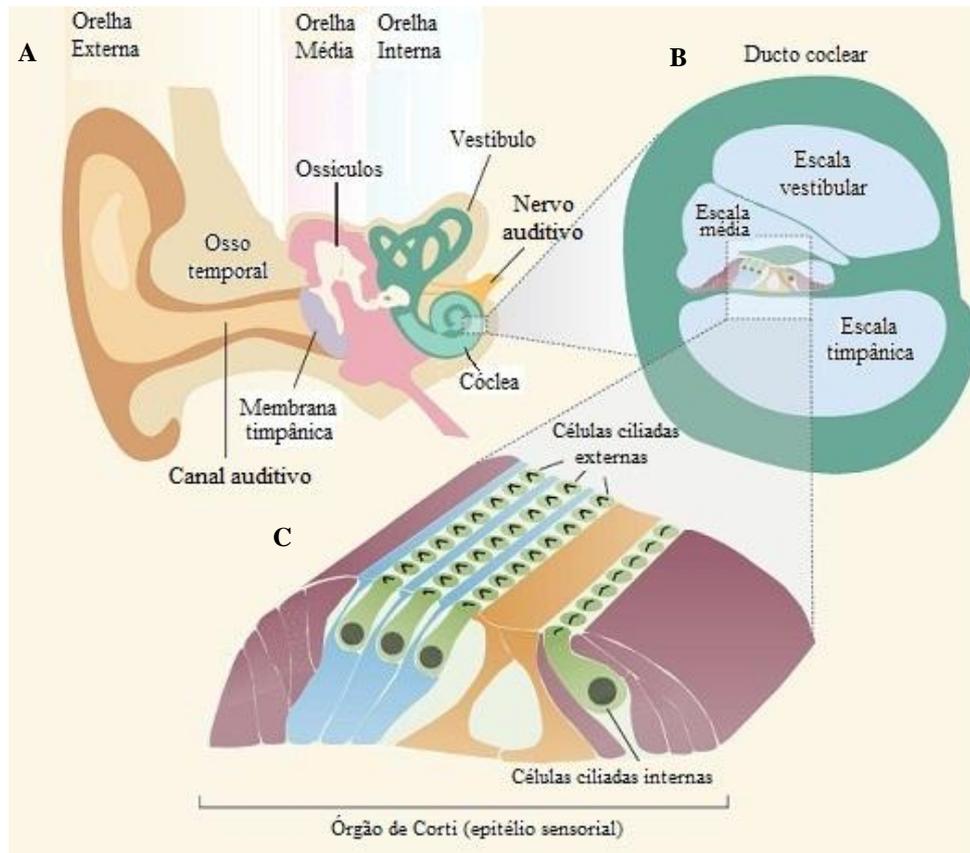


FIGURA 1: Ilustração esquemática da orelha humana. **A.** Orelhas externas, média e interna. **B.** Corte transversal do ducto coclear. **C.** Órgão de Corti, com destaque para as células ciliadas externas e internas. FONTE: Dror & Avraham, 2009

1.2 DEFICIÊNCIA AUDITIVA (DA) / SURDEZ

A capacidade de comunicação é um traço distintivo da espécie humana, sendo um dos maiores contribuintes para o bem estar de qualquer indivíduo. A audição é considerada a “pedra angular” sobre a qual se constrói o intrincado sistema da comunicação humana (NORTHERN & DOWNS, 1989).

Segundo Petit (1996), a DA é o déficit sensorial mais comum, uma vez que em cada mil crianças uma nasce com DA ou se torna afetado com DA profunda ou grave antes que a linguagem seja adquirida, enquanto outras duas ou quatro crianças em cada mil se tornarão deficientes auditivos antes da vida adulta.

Dados da Organização Mundial da Saúde (OMS) demonstram que cerca de 278 milhões de pessoas sofrem de DA incapacitante e que 70% dessas vivem em países de baixa renda (CZECHOWICZ *et al.*, 2010). O censo demográfico brasileiro de 2000 identificou

5.735.099 indivíduos, equivalente a de 3,4% da população brasileira desse período, caracterizados como “Incapaz, com alguma ou grande dificuldade permanente de ouvir”. Desses, 32,5% (1.861.687) eram da região nordeste, sendo 477.270 (25,6% dos casos do nordeste) na Bahia (IBGE, 2000).

A DA pode ser classificada com base em diversos critérios, incluindo a gravidade (leve ou de 20 a 39 dB, moderada ou de 40 a 69 dB, grave ou de 70 a 89 dB e profunda ou de 90 dB), idade de início (pré-lingual ou pós-lingual), e etiologia fisiológica (SCHRIJVER, 2004).

Segundo Lopes-Filho (1997), o tipo de DA está relacionado ao segmento anatômico em que a lesão está situada. Pode ser classificada em *deficiência auditiva condutiva*, quando as ondas sonoras não atingem a orelha interna de forma adequada em função de alterações na orelha externa e/ou média (membrana do tímpano, cadeia ossicular, janelas redonda ou oval, ou mesmo a tuba auditiva); *deficiência auditiva neurosensorial*, quando as causas estão localizadas na cóclea e/ou no nervo coclear (neste caso de deficiência auditiva o aparelho transmissor de som encontra-se normal), *deficiência auditiva mista*, quando o deficiente auditivo possui componentes condutivos e neurosensoriais na mesma orelha, e *deficiência auditiva central*, quando os distúrbios auditivos que ocorrem são em consequência de lesões na via auditiva central.

A DA pode ocorrer devido a fatores ambientais, genéticos ou pode ser decorrente da combinação desses dois fatores. A presbiacusia (DA relacionada com a idade) é, geralmente, considerada como multifatorial (MARRES, 1998).

1.2.1 Deficiência auditiva de origem genética

Nos países em desenvolvimento, há estudos escassos sobre a prevalência da deficiência auditiva genética (PIATTO *et al.*, 2005b). Nos países desenvolvidos entre os casos de DA a proporção cuja etiologia é hereditária, corresponde a cerca de 60%, enquanto que 30% dos casos são de DA adquirida e 10% de DA cuja etiologia é idiopática, ou seja, de causa não conhecida. A DA de causa genética pode ser *sindrômica*, quando associado à DA existem outros achados clínicos, ou *não-sindrômica* quando o indivíduo possui apenas a DA. Entre os casos de etiologia hereditária as formas não-sindrômicas e *sindrômicas* são

responsáveis por 70% e 30% dos casos, respectivamente (SKVORAK & MORTON, 1999; BITNER-GLINDZICZ, 2002; VAN LAER *et al.*, 2003).

Até o momento, mutações em cerca de 57 genes estão descritas como associadas com DA de origem genética (*Harvard Medical School Center for Hereditary Deafness*) e ao contrário do que se imaginado, muitos genes que estão associados com DA genética são expressos nas células de suporte distribuídas ao longo do ducto coclear ao invés de se expressarem nas células ciliadas (STEEL & BUSSOLI, 1999).

1.2.1.1 Deficiência auditiva síndrômica

A DA síndrômica acomete tanto a via condutiva como a sensório-neural, diferente da não-síndrômicas, que afeta essencialmente a via sensório-neural (PIATTO *et al.*, 2005a).

Das mais de 400 síndromes em que a DA é uma das características clínicas reconhecidas pode-se citar as síndromes de *Alport* (genes COL4A3, COL4A4 e COL4A5), *Branchio-oto-renal* (genes EYA1, SIX5 e SIX1 e locus 1q31), *Jervell & Lange-Nielsen* (genes KCNQ1 e KCNE1), *Norrie* (gene NDP), *Pendred* (genes SLC26A4 e FOXI1), *Stickler* (genes COL2A1, COL11A1, COL11A2 e COL9A1), *Treacher Collins* (gene TCOF1), *Usher* (genes MYO7A, USH1C, CDH23, PCDH15, SANS, USH2A, VLGR1, WHRN e USH3A e loci 14q32, 21q21, 15q22-23 e 3p23-24.2.) e *Waardenburg* (genes PAX3, MITF, SNAI2, EDNRB, EDN3 e SOX10 e loci 1p21-p13.3 e 8p23), sendo que as síndromes de Usher, de Pendred e de Jervell e Lange-Nielsen são as mais frequentes (TORIELLO *et al.*, 2004; VAN CAMP & SMITH, 2010).

1.2.1.2 Deficiência auditiva não-síndrômica

Recentes avanços na genética molecular da DA têm melhorado a capacidade de identificar a etiologia da DA hereditária (GREEN *et al.*, 1999).

Como citado anteriormente, o padrão de herança autossômico recessivo é o mais frequente entre os casos de DA hereditária não-síndrômica, correspondendo a cerca de 75%-85%, enquanto que o padrão de herança autossômica dominante corresponde a cerca de 12-

13%, e os casos ligados ao X ou de herança mitocondrial a cerca de 2%-3% dos casos (BITNER-GLINDZICZ, 2002; VAN LAER *et al.*, 2003).

Até o momento foram descritos 35 genes associados com DA cujo padrão de herança é autossômico recessivo, 22 genes associados com DA cujo padrão de herança é autossômico dominante, 2 genes associados com DA cujo padrão de herança é ligado ao X e 2 genes mitocondriais. Alguns genes são associados com diferentes padrões de herança da DA. Os genes *COL11A2*, *GJB2* (Conexina 26), *GJB3* (Conexina 31), *GJB6* (Conexina 30), *MYO6*, *MYO7A*, *TMC1* e *TECTA*, são associados com herança autossômica recessiva ou dominante. Além disso, há *loci* mapeados em que o gene com a mutação responsável pela DA ainda não foi identificado (Quadro 1) (VAN CAMP & SMITH, 2010).

PADRÃO DE HERANÇA	LOCI	Nº LOCI SEM GENE IDENTIFICADO*	Nº DE GENES IDENTIFICADOS	GENES
Autossômico recessivo	DFNB 1 - 85	31	35	<i>CDH23</i> , <i>CLDN14</i> , <i>COL11A2</i> , <i>ESPN</i> , <i>ESRRB</i> , <i>GJB2</i> (Cx26), <i>GJB3</i> (Cx31), <i>GJB6</i> (Cx30), <i>GRXCR1</i> , <i>HGF</i> , <i>LHFPL5</i> , <i>LOXHD1</i> , <i>MARVELD2</i> , <i>MYO15A</i> , <i>MYO3A</i> , <i>MYO6</i> , <i>MYO7A</i> , <i>OTOA</i> , <i>OTOF</i> , <i>PCDH15</i> , <i>PJKV</i> , <i>PTPRQ</i> , <i>RDX</i> , <i>LRTOMT/COMT2</i> , <i>SLC26A4</i> , <i>SLC26A5</i> , <i>STRC</i> , <i>TECTA</i> , <i>TMC1</i> , <i>TMIE</i> , <i>TMPRSS3</i> , <i>TPRN</i> , <i>TRIOBP</i> , <i>USH1C</i> , <i>WHRN</i>
Autossômico dominante	DFNA 1 - 60	27	22	<i>ACTG1</i> , <i>CCDC50</i> , <i>COCH</i> , <i>COL11A2</i> , <i>CRYM</i> , <i>DFNA5</i> , <i>DIAPH1</i> , <i>EYA4</i> , <i>GJB2</i> (Cx26), <i>GJB6</i> (Cx30), <i>GJB3</i> (Cx31), <i>KCNQ4</i> , <i>MYH14</i> , <i>MYO7A</i> , <i>TECTA</i> , <i>MYH9</i> , <i>MYO1A</i> , <i>MYO6</i> , <i>POU4F3</i> , <i>TFCP2L3</i> , <i>TMC1</i> , <i>WFS1</i>
Ligado ao X	DFBX 1- 5	3	2	<i>PRPS1</i> , <i>POU3F4</i>
Ligado ao Y	DFNY 1	1	-	-
Materno (mitocondrial)	-	-	2	<i>MTRNR1</i> , <i>MTTS1</i>

* *Loci* sem gene (s) associado (s) com DA identificado (s)

QUADRO 1: Descrição dos genes segundo o padrão de herança da DA com destaque em negrito para os genes associados com diferentes padrões de herança. FONTE: Van Camp & Smith, 2010

Como previamente comentado, a fisiologia da audição é um processo complexo que envolve diferentes estruturas para seu funcionamento adequado. Portanto, as causas da DA são variadas e, entre os casos genéticos, diferentes mutações em diferentes genes ou mesmo em um único gene podem estar associadas com a DA genética.

Convencionou-se denominar as diferentes localizações cromossômicas das formas não-sindrômicas de DA genética com a sigla DFN (proveniente do inglês *deafness*) acrescida das letras A ou B, significando forma de transmissão autossômica dominante (DFNA) e recessiva (DFNB), respectivamente. Quando se denominar DFN isoladamente ou seguido pela letra X trata-se de DA de transmissão ligada ao cromossomo X e quando seguida da letra Y trata-se de DA de transmissão ligada ao cromossomo Y. Após as letras, há um número inteiro, indicando a ordem da descoberta do gene (VAN CAMP & SMITH, 2010).

1.3 CONEXINAS

As conexinas (Cx) são proteínas que compõem os canais das junções *gap* (junções comunicantes do tipo fenda) (PFEILSTICKER *et al.*, 2004). Segundo informações depositadas no acesso MIM *121011 do banco *Online Mendelian Inheritance in Man* (OMIM) no *National Center for Biotechnology Information* (NCBI), essas junções foram primeiramente caracterizadas por microscopia eletrônica como estruturas da membrana plasmática regionalmente especializada em manter contato com células aderentes. Elas são responsáveis pela comunicação direta entre células adjacentes possibilitando trocas de eletrólitos, mensageiros secundários e metabólitos do citoplasma de uma célula para outra (PFEILSTICKER *et al.*, 2004). Elas têm assim papel fundamental em muitos processos biológicos importantes, incluindo o desenvolvimento cardíaco, a fertilidade, o sistema imunológico e a sinalização elétrica no sistema nervoso (HARRIS, 2001).

As junções *gap* são estruturas da membrana plasmática formadas por centenas ou milhares de canais de comunicação intercelular. Cada canal é constituído pelo acoplamento de dois hemicanais independentes (denominados conexons) presentes nas membranas plasmáticas de células adjacentes. Seis subunidades de conexinas oligomerizam-se para constituir um hemicanal, o qual é distribuído para a membrana plasmática pela via secretória, provavelmente auxiliada por microtúbulos associados às vesículas (SAEZ *et al.*, 2003; SHAW *et al.*, 2007). Os conexons são denominados segundo sua composição de conexinas como

canais homotípicos ou heterotípicos e como canais homoméricos ou heteroméricos (KELSELL *et al.*, 2001) (Figura 2).

As conexinas são designadas pela sua massa molecular, que ocorre na faixa de 26 - 59 kD (KELSELL *et al.*, 2001). Outro sistema de nomenclatura divide as proteínas das junções *gap* em duas categorias, alfa e beta, de acordo com semelhanças na seqüência de nucleotídeos e de aminoácidos. Por exemplo, Cx43, proteína de 43 kD, é designada proteína alfa-1 (A1) das junções fenda (*GJ*, do inglês *gap junction*), ou seja, *GJA1*, enquanto Cx32 e CX26 são chamadas de proteínas beta-1 (*GJB1*) e beta-2 (*GJB2*) das junções fenda, respectivamente. Esta nomenclatura salienta que as Cx32 e Cx26 são mais homólogas entre si do que quando qualquer destas duas é comparada em relação a Cx43 (NCBI, MIM *121011).

Até o momento foram descritos 21 genes humanos de conexinas (SÖHL & WILLECKE, 2004), que codificam proteínas transmembrânicas e compartilham mesmo domínio estrutural (DOBROWOLSKI & WILLECKE, 2009).

As conexinas são proteínas que têm quatro domínios transmembrânicos (KELSELL *et al.*, 2001). O terminal carboxila e o terminal amino, bem como a alça entre o segundo e o terceiro domínio transmembrânico, são citoplasmáticos (Figura 3) (RABIONET *et al.*, 2002). A seqüência de conservação entre os membros da família conexina é mais evidente nos quatro domínios transmembrânicos (LAIRD, 2006).

Na orelha interna dos vertebrados, a maioria das células são amplamente associadas via junções *gap* (NICKEL *et al.*, 2006; FORGE *et al.*, 2003), sugerindo, segundo Nickel e Forge (2008) um papel fundamental da comunicação das junções fenda no funcionamento do ouvido interno. As conexinas Cx 26 (*GJB2*), Cx 30 (*GJB6*), Cx 31 (*GJB3*), Cx 32 (*GJB1*), e Cx43 (*GJA1*) são expressas na orelha interna onde cumprem papel importante na audição normal (SCHRIJVER *et al.*, 2004). Sendo assim, mutações nos genes que codificam algumas destas conexinas influenciam na função dessas junções, alterando as sinapses elétricas das células ciliadas, e, levando a perda auditiva (DEL CASTILLO *et al.*, 2002; PALLARES-RUIZ *et al.*, 2002; PFEILSTICKER *et al.*, 2004; ROUX *et al.*, 2004).

Foi demonstrado que mutações nos genes que codificam as conexinas beta (*GJB*) podem causar doenças de pele, neuropatia periférica e perda auditiva neurosensorial (WHITE & PAUL, 1999; RABIONET *et al.*, 2000). No genoma humano, a maioria dos genes que codificam conexinas beta foram mapeadas em dois *loci*, um no cromossomo 1 e outro no cromossomo 13, sendo eles 1p34-p35 e 13q11-q12, respectivamente (KELSELL *et al.*, 2001).

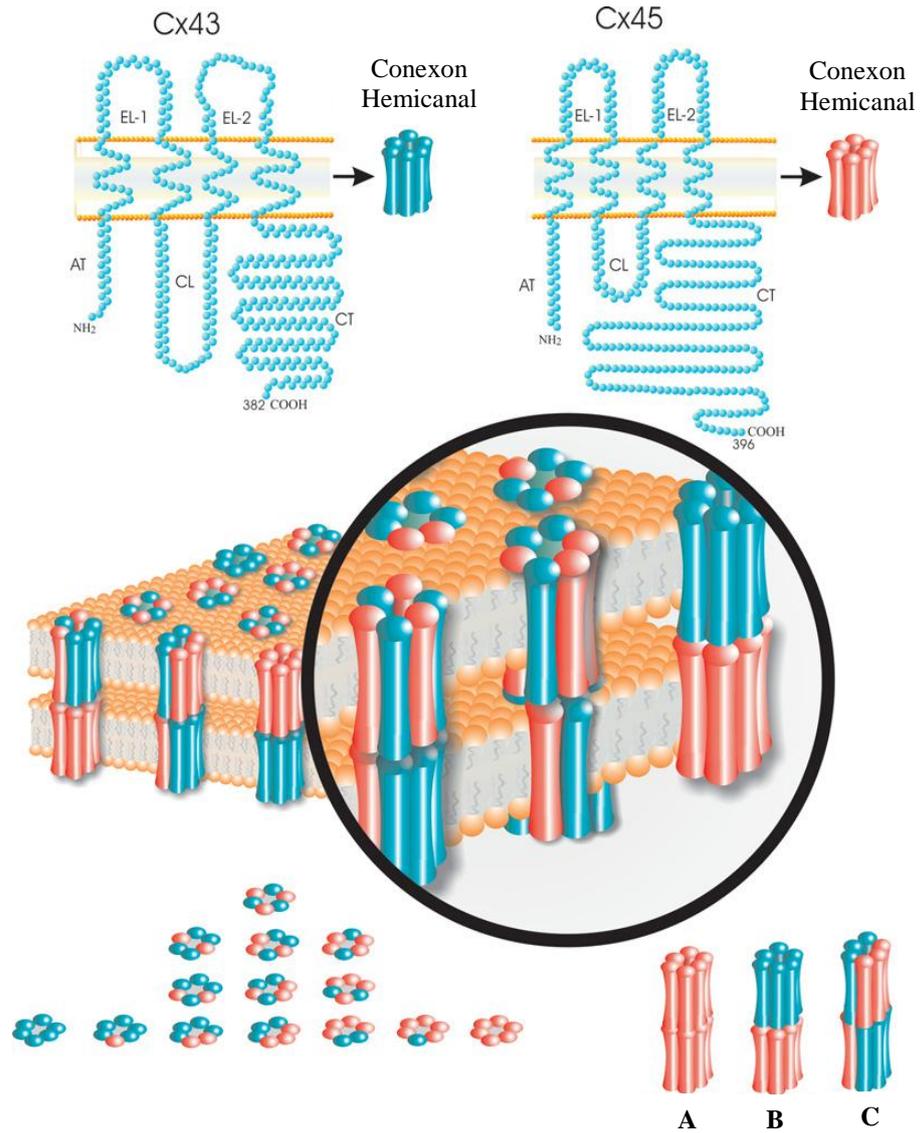


FIGURA 2: Imagem das conexas Cx43 e Cx45 nas junções comunicantes. **A.** Homotípico e Homomérico; **B.** Heterotípico e homomérico; **C.** Heterotípico e Heteromérico. FONTE: Laird, 2006

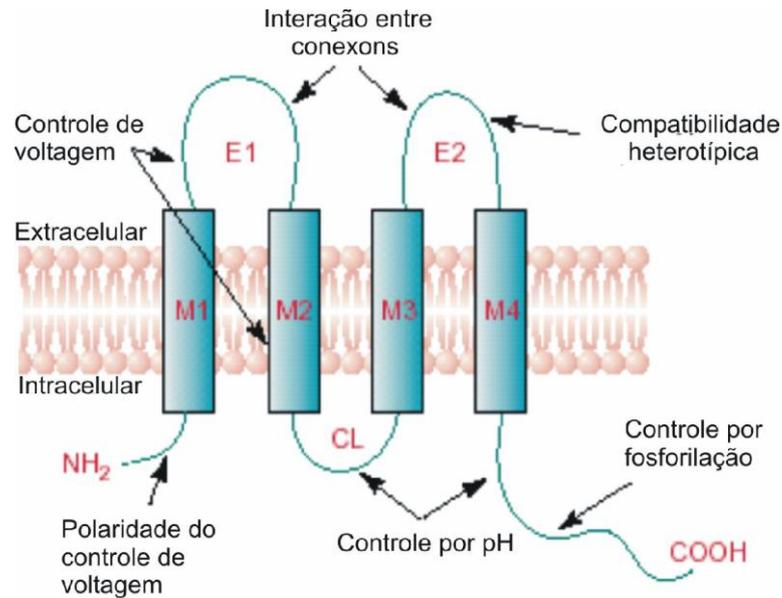


FIGURA 3: Elementos que interagem nas junções *gap*: CL (alça intracelular); COOH (terminal carboxila); E1 e E2 (domínios extracelulares); M1-4 (domínios transmembrânicos) e NH₂ (terminal amino). FONTE: Rabionet *et al.*, 2002

Mutações no *locus* 13q11-q12, principalmente no gene *GJB2*, que codifica a Cx 26, são implicadas como uma das principais causas de DA hereditária, especialmente nos tipos recessivos (KELSELL *et al.*, 1997; ESTIVILL *et al.*, 1998; KENNESON *et al.*, 2002; MIM #220290; BALLANA *et al.*, 2010).

1.4 GENE *GJB2*

O gene *GJB2* foi o primeiro gene associado com DA genética não-sindrômica com padrão de herança autossômico recessivo e foi descrito por Kelsell *et al.* (1997).

Como informado anteriormente, este gene está localizado no cromossomo 13 (13q12) e codifica uma proteína de 226 aminoácidos, denominada conexina 26 (Cx26) (LEE *et al.*, 1992).

Kiang *et al.* (1997) observaram que este gene possui dois éxons, sendo o éxon 1 não codificante. A região promotora deste gene é altamente conservada entre os humanos e os ratos (MIM *121011 - NCBI, 2010) (Figura 4).

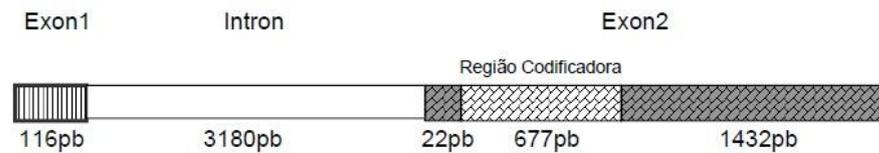


FIGURA 4: Desenho esquemático da estrutura do gene *GJB2* humano. FONTE: Magni, 2007

Até o momento cerca de 110 mutações neste gene são descritas como associadas com DA não-sindrômica, sendo que destas mutações, cerca de 91 são herdadas com padrão autossômico recessivo, 9 com padrão autossômico dominante e 10 com patogenicidade ainda não definida (BALLANA *et al.*, 2010). Apesar deste número apresentado no site *The Connexin-deafness homepage*, apenas 22 alelos mutantes associados com DA de padrão de herança autossômico recessivo e 6 alelos mutantes associados com DA de padrão de herança autossômico dominante estão descritos no acesso MIM *121011 do OMIM / NCBI.

1.4.1 Mutação c.35delG no gene *GJB2*

Das mutações descritas até o momento no gene *GJB2* e que estão associados com DA genética, a c.35delG, que compreende uma mutação de ponto com a deleção de uma base guanina na posição 35 da região codificante desse gene, é a mais comum entre os indivíduos com DA não-sindrômica de padrão autossômico recessivo (GASPARINI *et al.*, 2000).

Segundo Pfeilsticker *et al.* (2004), cerca de 26 a 30% dos indivíduos homocigotos para a mutação c.35delG possuem DA grave, enquanto outros 30 a 57% possuem DA profunda. Eles também mencionam que alguns autores acreditam na hipótese que perdas auditivas progressivas, como a presbiacusia, poderiam estar relacionadas a mutações em genes da Cx 26.

O estudo realizado por Gasparini *et al.* (2000) mostra elevada frequência de portadores da mutação c.35delG entre os ouvintes na maioria dos países europeus, onde observaram maior frequência de portadores da mutação c.35delG na região sul, em oposição às regiões norte e central da Europa. Os estudos da população de Portugal, da Itália e da Espanha, três populações que contribuíram significativamente para a miscigenação presente na Bahia, mostraram alto índice de alelos com a mutação c.35delG. Em Portugal, a frequência de portadores desta mutação foi de 1/45 (4/179), na Espanha foi de 1/40 (5/200) e na Itália de

1/32 (8/255). O estudo de Gasparini *et al.* (2000) sugere origem única para c.35delG, em algum lugar da Europa ou do Médio Oriente.

No Brasil, Piatto *et al.* (2005b) avaliaram a mutação (c.35delG) em 223 recém-nascidos do Hospital de Base de São José do Rio Preto, em São Paulo (SP), e identificaram cinco heterozigotos, ou seja, 2,24% dos recém-nascidos portavam um alelo com tal mutação. Em outro rastreamento realizado em 620 neonatos, na região de Campinas (SP), foi determinada a frequência de 0,97% de portadores da mutação c.35delG, ou seja, 1:103 heterozigotos (SARTORATO *et al.*, 2000). Nenhum estudo molecular em indivíduos com DA foi realizado na Bahia. No entanto, foi realizada análise da mutação c.35delG em amostras de afro-descendentes, sem DA, da cidade de Salvador, que mostrou frequência de 1% de portadores da mutação c.35delG, metade da frequência observada entre brasileiros descendentes de europeus (1 em 50). Neste estudo, foram avaliados, também, dois outros grupos de brasileiros, um constituído por descendentes de asiáticos e outro por descendentes de europeus. A frequência observada entre os descendentes de europeus foi similar à observada na população europeia, enquanto que nos descendentes asiáticos não houve ocorrência desta mutação em nenhuma amostra. Isto indica que a estratégia para o rastreio genético de DA no Brasil deve levar em conta a heterogeneidade étnica do país (OLIVEIRA *et al.*, 2004).

1.5 GENE *GJB6*

O gene *GJB6*, assim como o gene *GJB2*, está localizado no cromossomo 13 (localização13q12) (DEL CASTILLO *et al.*, 2002). Ele codifica proteína, denominada conexina 30 (Cx30), com 261 aminoácidos e 76% de identidade com a proteína codificada pelo gene *GJB2*. Análise de expressão em camundongos revelou que esta proteína é expressa nos seguintes órgãos: traquéia, tireóide, cérebro e cóclea (GRIFA *et al.*, 1999).

Quando nenhuma mutação é encontrada no gene Cx26 ou em pacientes heterozigotos para c.35delG, mutações no gene Cx30, pela sua estreita relação revelada para identidade entre as proteínas e proximidade de sua localização cromossômica a do gene Cx26, podem ser consideradas como responsáveis por DA, sendo ambos os genes designados como estando no locus DFNB1. Esse fato é explicado, pois além da proximidade do local, a Cx26 e Cx30 podem formar canais heterotípicos dos conexons tendo, na cóclea, a mesma distribuição

celular. Portanto, as hipóteses fisiopatológicas, em relação às deficiências auditivas associadas à Cx26 e Cx30, são semelhantes. Uma deleção envolvendo o gene *GJB6* denominada del (*GJB6-D13S1830*) - deleção de 309pb - é, dentre as mutações que envolvem as conexinas, a segunda mutação mais freqüente em indivíduos com DA genética não-sindrômica em algumas populações (DEL CASTILLO *et al.*, 2002).

Segundo del Castillo *et al.* (2003), esta mutação é muito comum em indivíduos com DA não-sindrômica da Espanha, França, Israel, Reino Unido e Brasil. Homozigotos para a del (*GJB6-D13S1830*), assim como os heterozigotos associados à ocorrência de um alelo mutante do gene *GJB2*, possuem DA de grave a profunda (NAJMABADI *et al.*, 2002).

Alguns estudos realizados com brasileiros com DA evidenciam a contribuição da mutação del (*GJB6-D13S1830*). Oliveira *et al.* (2007) e Batissoco *et al.* (2009), por exemplo, encontraram essa mutação, respectivamente, em 5 dos 645 e em 3 dos 300 indivíduos analisados. Outra deleção envolvendo o gene *GJB6*, denominada del (*GJB6-D13S1854*), correspondendo à deleção de 232pb, também é freqüente em indivíduos com de DA não-sindrômica de alguns países, como é o caso da Itália, Inglaterra e Brasil. Neste estudo a mutação del (*GJB6-D13S1854*) foi detectada em 22,2% dos casos de DA genética não-sindrômica, heterozigotos para mutações no gene *GJB2* e cuja heterozigose não foi associada com a mutação del (*GJB6-13S1830*) na Inglaterra, enquanto no Brasil a mutação esteve presente em 6,3% e no norte da Itália em 1,9% dos casos (DEL CASTILLO *et al.*, 2005). No Brasil Oliveira *et al.* (2007) também encontraram a mutação del (*GJB6-D13S1854*) em 5 dos 645 indivíduos analisados.

Além destas duas mutações, outra mutação neste gene, denominada T5M (troca de treonina por metionina na posição 5 da seqüência de aminoácidos), é descrita como causadora de DA, no entanto, está associada a casos de DA cujo padrão de herança é autossômico dominante (DFNA3B) (GRIFA *et al.*, 1999; NCBI, MIM ID *604418).

1.6 MUTAÇÕES MITOCONDRIAIS E DEFICIÊNCIA AUDITIVA

A DA genética além de ser causada por mutações em genes do DNA nuclear, também pode ser causada por mutações no DNA mitocondrial. Mutações no DNA mitocondrial têm sido associadas tanto com DA sindrômica quanto com DA não-sindrômica (FISCHEL-GHODSIAN, 1999; VAN CAMP & SMITH, 2010).

O DNA mitocondrial codifica 13 RNA-mensageiros (mRNA), 2 RNAríbssômicos (rRNA) e 22 RNA-transportadores (tRNA) (ANDERSON *et al.*, 1981).

A DA não-sindrômica pode ser causada por mutações em três genes mitocondriais (NCBI, MIM ID #500008): 12S rRNA ou MTRNR1 (NCBI, MIM ID *561000), tRNA Ser (UCN) ou MTTS1 (NCBI, MIM ID *590080) e CO1 ou MTCO1 (NCBI, MIM ID *516030).

O primeiro estudo para associar mutações mitocondriais e DA genética não-sindrômica identificou a mutação A1555G no gene mitocondrial 12S rRNA. Tal identificação permitiu classificar esta variação de DA como padrão de herança materno. Estudos realizados no Brasil também evidenciam a contribuição dessas mutações para os casos de DA genética não-sindrômica no país (FAGUNDES *et al.*, 2005). Abreu-Silva *et al.* (2006) ao analisar indivíduos brasileiros com DA encontraram a mutação A1555G em 2% dos 203 indivíduos analisadas.

Outras mutação mitocondriais são responsáveis pela DA de causa genética como é o caso das mutações A7445G, 7472insC, T7510TC, T7511C, G7444A e A7445C no gene tRNA Ser (UCN) (SEVIOR, 1998; NCBI, MIM ID *590080).

1.6.1 Mutação A1555G

A mutação de ponto A1555G no DNA mitocondrial está associada com DA não-sindrômica ou DA induzida por antibióticos aminoglicosídeos (PREZANT *et al.*, 1993; ESTIVILL *et al.*, 1998; SHOHAT *et al.*, 1999).

Os aminoglicosídeos, tais como: gentamicina, estreptomicina, canamicina e trombamicina, são medicamentos clinicamente importantes, sendo utilizadas para combater bactérias gram-negativas, principalmente em infecções crônicas como tuberculose e em infecções associadas com fibrose cística (LORTHOLARY *et al.*, 1995). Esses medicamentos são conhecidos por exercer sua função antimicrobiana ao ligar-se à subunidade ribossômica 16S levando a má tradução ou interrupção prematura da síntese protéica bacteriana (NOLLER, 1991).

Os ribossomos bacterianos se assemelham mais aos ribossomos mitocondriais que aos ribossomos do citoplasma. A mutação A1555G ocorre em região altamente conservada na subunidade ribossômica e essa troca gera um pareamento G-C (Figura 5) no 12S rRNA que

facilita a ligação dos aminoglicosídeos (HUTCHIN *et al.*, 1993; ZIMMERMANN *et al.*, 1990; BRAVERMAN *et al.*, 1996).

Na ausência de exposição aos aminoglicosídeos, a mutação conduz a um fenótipo que varia de DA severa a perda auditiva moderada ou até mesmo a audição aparentemente normal (PREZANT *et al.*, 1993; ESTIVILL *et al.*, 1998).

Bravo *et al.* (2006), avaliaram dois grupos, um grupo de pacientes com DA pós-lingual com a mutação A1555G no gene mitocondrial 12S rRNA e um grupo de portadores desta mutação sem queixa de DA, quanto as características audiológicas. Eles observaram que a mutação mitocondrial A1555G provoca uma forma de DA coclear, caracterizada por perda mais severa da audição em altas frequências e que apesar da expressão da mutação ser variável, destacando-se diferenças na idade de aquisição e no grau da perda, alterações cocleares estão presentes em todos os que possuem a mutação A1555G.

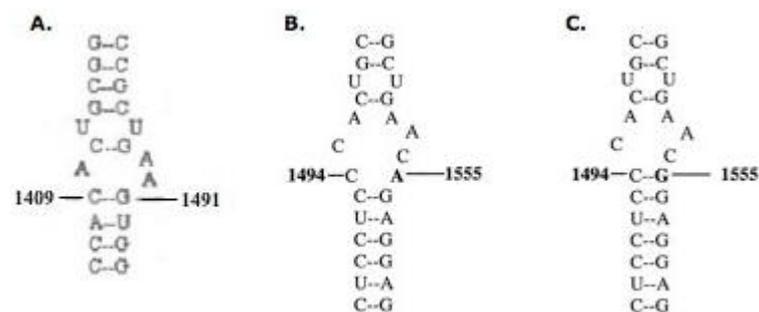


FIGURA 5: Localização da mutação A1555G no 12S rRNA mitocondrial em comparação com o 16S rRNA na *E. coli* e com o 12S rRNA mitocondrial humano sem a respectiva mutação. **A.** Região correspondente ao 16S rRNA da *E. coli*; **B.** Região correspondente ao 12SrRNA mitocondrial humano sem a mutação A1555G; **C.** Região correspondente ao 12SrRNA mitocondrial humano com a mutação A1555G. FONTE: Guix, 2007

Abreu-Silva *et al.* (2006) ao avaliar a contribuição das mutações mitocondriais para os casos de DA em brasileiros, verificaram que mutação mitocondrial A1555G é uma causa comum de DA no Brasil, destacando o relato prévio desta característica em outros estudos, e recomendando que a mesma seja rastreada no diagnóstico da DA. Entre os seus resultados observou-se a presença da mutação em um caso cujo padrão de herança era sugestivo de herança autossômica recessiva e em um caso de DA isolada, destacando desta forma que se tivessem utilizado o critério de transmissão materna ou DA familiar como critério de seleção, as mutações responsáveis pela DA nestes dois casos não teriam sido detectadas.

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Estudar as bases moleculares da deficiência auditiva em pacientes provenientes de Monte Santo-BA.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Obter genealogia das famílias dos afetados para definir o padrão de herança, identificar casamentos consanguíneos e possíveis portadores;
- Caracterizar o perfil clínico e epidemiológico dos pacientes com deficiência auditiva;
- Analisar mutações no éxon 2 do gene GJB2, as del (GJB6-13S1830) e del (GJB6-D13S1854) no gene GJB6 e a mutação A1555G no gene 12SrRNA para definir o perfil mutacional da deficiência auditiva em Monte Santo – BA;
- Sugerir ações de saúde pública relacionadas à promoção da saúde e prevenção da deficiência auditiva.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 CASUÍSTICA

Realizou-se estudo descritivo de corte transversal a partir de amostra constituída por 84 indivíduos com DA do município de Monte Santo–BA. A coleta de dados foi realizada entre os anos de 2008 e 2010. Monte Santo localiza-se no nordeste baiano distando 352 km da capital baiana. Sua área territorial é de 3.285,166 km² com cerca de 16 habitantes por km² (IBGE, 2010). A coleta de dados foi realizada entre os anos de 2008 e 2010.

O recrutamento dos pacientes foi realizado com auxílio dos agentes comunitários de saúde (ACS) do município, bem como por informação direta do grupo de pesquisa durante viagens de campo. Os agentes comunitários foram orientados para informarem sobre o projeto aos familiares de indivíduos com DA, tanto na sede como nos povoados, principalmente aos que possuíam DA congênita e não desenvolveram a fala e/ou aos que possuíam DA recorrente na família.

Os pacientes foram triados através de avaliação otorrinolaringológica, para investigação de possíveis etiologias ambientais ou sinais e características clínicas associadas com DA, e audiológica, para caracterizar a DA. Além dessas avaliações, foi preenchida ficha para análise genealógica e aplicado um questionário (Apêndice A) para a obtenção de dados demográficos, história familiar e clínica de cada paciente. As informações adquiridas foram armazenadas em banco de dados e os nomes dos pacientes foram substituídos por códigos. Para análise molecular, foram coletados 5 mL de sangue total dos pacientes e alguns familiares em tubo de ensaio contendo EDTA.

Este projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Centro de Pesquisa Gonçalo Moniz da Fundação Oswaldo Cruz (CPqGM/FIOCRUZ) através do parecer N° 182/2008, protocolo 274 (Anexo A). Todos os responsáveis ou acompanhantes dos participantes foram informados sobre o projeto, bem como sobre os procedimentos e condutas da coleta do material biológico. Após explicação sobre o projeto, os pacientes (ou responsáveis) assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE) (Anexo B).

Foram considerados como critério de inclusão:

- 1) Paciente com história de DA sem associação aparente com síndrome;
- 2) Pacientes naturais ou com familiares em Monte Santo-BA;

3) TCLE assinado pelo paciente ou responsável.

Foram considerados como critério de exclusão:

1) Pacientes com sinais ou características clínicas que pudessem estar associadas com DA síndrômica;

2) Pacientes que não naturais de Monte Santo-BA.

3) Desistência de participar do estudo.

3.2 AVALIAÇÃO OTORRINOLARINGOLÓGICA

Foram examinadas regiões auriculares (pavilhão auricular, conduto auditivo externo e membrana timpânica) e orofaríngeas (tonsilas palatinas, palatos, úvula, respiração, unidades dentárias, septo e meatos). Esta avaliação visou identificar características que poderiam estar relacionadas com DA síndrômica ou de causa ambiental (como exemplo otite).

3.3 AVALIAÇÃO AUDIOLÓGICA

A avaliação audiológica foi realizada em dois momentos. Primeiro para triagem dos pacientes com perda sugestivamente neurossensorial pela imitanciometria. Em muitas síndromes associadas com DA há alterações nas orelhas externas e médias, a perda auditiva causada por alterações nessa região é classificada como perda condutiva. Desta forma, a seleção de pacientes com DA neurossensorial visou minimizar a inclusão equivocada de paciente com possível DA síndrômica. Este teste consta da timpanometria, que avalia a complacência da membrana timpânica, e a estimativa dos limiares do reflexo acústico nas frequências de 0,5, 1, 2 e 4 kHz. No segundo momento, para confirmar a perda neurossensorial e estabelecer os perfis audiológicos, os pacientes incluídos foram avaliados com testes mais específicos cujos aparelhos estão disponíveis na Clínica Escola de Fonoaudiologia da União Metropolitana de Educação e Cultura (UNIME), em Lauro de Freitas-BA, município que fica a 365 km de Monte Santo. Esta clínica atende pacientes de Salvador e Região Metropolitana. Os pacientes incluídos neste projeto seguiram protocolo para inclusão no programa para aquisição de aparelho auditivo desta instituição.

3.3.1 Audiometria tonal liminar

Foram determinados os limiares de audibilidade por via aérea nas de frequências de 0,25 a 8 kHz, utilizando-se fone de ouvido, e realização da via óssea nas frequências de 0,5, 1, 2 e 4 kHz, quando os limiares auditivos por via aérea foram iguais ou superiores a 25 dBNA, através de um vibrador ósseo.

3.3.2 Medidas de imitância acústica

Realização da timpanometria para verificar a complacência da membrana timpânica através da colocação de uma sonda no meato acústico externo e a pesquisa dos reflexos acústicos (RA) contralaterais nas frequências de 0,5 a 4 kHz, no qual o estímulo acústico é gerado por um fone de ouvido colocado no ouvido contralateral e o RA captado através de uma sonda colocada na orelha testada (imitanciômetro: Interacoustics/AZ7).

3.3.3 Potencial evocado auditivo de tronco encefálico (PEATE)

Para a realização desta avaliação os pacientes ficaram deitados sob maca em sala tratada acusticamente. Com pasta abrasiva, foi realizada limpeza para retirar oleosidade da pele nos locais onde foram colocados os eletrodos. Estes ficavam fixados com esparadrapos, juntamente com gel eletrolítico, nas seguintes posições:

- Eletrodo A1: mastóide da orelha esquerda
- Eletrodo A2: mastóide da orelha direita
- Eletrodo FPZ: vértex (eletrodo de referencia)
- Eletrodo Terra: frente

Os fones de inserção foram colocados nas orelhas testadas. Os parâmetros utilizados foram os seguintes: os cliques utilizados tiveram duração de 01ms, que abrangem uma faixa de frequência de 2 a 4KHz. A taxa de repetição dos estímulos foi de 13 por segundo e a

polaridade do estímulo foi a rarefeita. A intensidade do clique foi de 100 dBNA, pelo fato de serem indivíduos com DA. Foram ainda promediados 2000 cliques, sendo apresentados por duas vezes em cada orelha, para verificar a reprodutibilidade das ondas, para assim garantir fidedignidade do exame. Antes do início da gravação das ondas do PEATE, a impedância dos eletrodos sobre a pele foram medidos e deviam estar até no máximo 3 Kohm, para não prejudicar a qualidade da coleta. Foram aplicados filtros de 30-3000 kHz e a janela de análise foi de 10ms. Após a gravação do exame foi feita a marcação das latências e amplitudes das ondas quando presentes.

3.4 EXTRAÇÃO DE DNA

O DNA foi extraído dos leucócitos obtidos das amostras de sangue periférico por técnicas de extração salina adaptadas de LAHIRI & NURNBERGER *et al.* (1991) ou MILLER *et al.* (1988) e estocado a -20°C no Laboratório Avançado de Saúde Pública (LASP)/CPqGM/FIOCRUZ-BA.

3.5 GENOTIPAGEM

As amostras foram inicialmente analisadas para a determinação de alelos referentes à presença ou ausência da mutação c.35delG no gene *GJB2*, das deleções del (*GJB6-13S1830*) e del (*GJB6-D13S1854*) que envolvem a perda de região do gene *GJB6*, da mutação A1555G, no gene 12Sr RNA. As três primeiras mutações ocorrem no genoma nuclear enquanto a última no genoma mitocondrial. Além disso, a região codificante do gene *GJB2* foi investigada, por meio de sequenciamento, quanto à presença de outras mutações que pudessem estar associadas com DA genética.

Como a mutação c.35delG é mais frequentemente associada aos casos de DA genética em diferentes regiões do mundo, principalmente em populações caucasianas, todas as amostras dos pacientes foram primeiramente analisadas para esta mutação. Em seguida, como esta mutação não foi encontrada em todas as amostras, foram analisadas as demais mutações

selecionadas para este estudo e posteriormente, por seqüenciamento, a região codificante do gene *GJB2*.

3.5.1 Mutação c.35delG

Para análise da mutação c.35delG no gene *GJB2* utilizou-se *primers* cujas seqüências foram disponibilizadas por Magni (2007): *Primer F*: 5' – TCTTTTCCAGAGCAAACCGC-3' e *Primer R*: 5' – GCTGGTGGAGTGTTTGTTCACACCCGC – 3'. O ciclo utilizado constou de primeira etapa: 94°C por 6 minutos e 59°C por 2 minutos, uma vez; segunda etapa com 35 ciclos: 72°C por 1 minuto, 94°C por 30 segundos e 59°C por 1 minuto; e terceira etapa constou de um ciclo de extensão a 72°C por 10 minutos.

Após amplificação o segmento de 89pb, foi submetido a digestão enzimática com a enzima *Bst*NI (isoesquisômero da *Mva*I). Para a digestão foram utilizadas as seguintes concentrações finais: *Buffer*2 0,9X; BSA 9,9X e 0,33 U da enzima de restrição *Bst*NI. Sendo que, para um volume final de 15µL adicionamos 10µL do produto da PCR. Em seguida incubou-se em banho-maria a 60°C *overnight* (aproximadamente 16 horas). Os fragmentos foram visualizados em gel de poliacrilamida 10% [40% (29:1)] corado com nitrato de prata. Realizou-se a corrida eletroforética por 1 hora e 40 minutos a 100V. Observou-se fragmentos de 60 e 29 pb para alelos selvagens e de 89 pb para alelos mutantes. Desta forma, uma banda de 60 pb foi detectada quando houve homozigose para o alelo selvagem, uma banda de 89 pb para alelos homozigotos mutantes e duas bandas, uma de 60 pb, para alelo selvagem (a banda de 29 pb não é visualizada), e outra de 89 pb, para o alelo mutante, quando houve heterozigose (WILCOX *et al.*, 2000).

3.5.2 Mutações del (*GJB6-D13S1830*) e del (*GJB6-D13S1854*)

Para a análise de mutações envolvendo o gene *GJB6* foram estudadas duas deleções: a del (*GJB6-13S1830*) - *primers* 5'- TTTAGGGCATGATTGGGGTGATTT -3' / 5'- CACCATGCGTAGCCTTAACCATTTT -3' - e a del (*GJB6-D13S1854*) - *primers* 5'- TCATAGTGAAGAAGACTCGATGCTGTTT -3' / 5'- CAGCGGCTACCCTAGTTGTGGT -3'.

As análises destas duas mutações foram realizadas em mesmo ensaio, segundo DEL CASTILLO *et al.* (2005). Este ensaio inclui também *primer* para a análise do alelo selvagem. Os *primer* utilizados para este fim foram: 5'- CGTCTTTGGGGGTGTTGCTT -3' / 5'- CATGAAGAGGGCGTACAAGTTAGAA -3'. O ciclo utilizado constou de primeira etapa: 94°C por 6 minutos e 60°C por 2 minutos, uma vez; segunda etapa com 5 ciclos *touchdown*: 72°C por 1 minuto, 94°C por 40 segundos e 65°C (-1°C por ciclo) por 40 segundos; terceira etapa: 72°C por 1 minuto, 94°C por 40 segundos e 60°C por 40 segundos; e quarta etapa constou de um ciclo de extensão a 72°C por 4 minutos. O alelo selvagem produziu fragmentos com 333pb, o alelo com a mutação del (*GJB6-D13S1830*) produz fragmentos com 460pb e o alelo com a mutação del (*GJB6-D13S1854*) produz fragmentos com 564pb. Desta forma os homozigotos para o alelo selvagem foram observados como apresentando uma banda de 333pb, enquanto os homozigotos para os alelos mutantes del (*GJB6-D13S1830*) e mutante del (*GJB6-D13S1854*) seriam observados como uma banda de 460pb e 564pb, respectivamente. Para heterozigotos seriam observadas duas bandas. Em caso de heterozigoto selvagem / del (*GJB6-D13S1830*) seria observada uma banda de 333pb e outra de 460pb, no caso do heterozigoto selvagem / del (*GJB6-D13S1854*) seria observada uma banda de 333pb e outra de 564pb, enquanto para heterozigoto del (*GJB6-D13S1830*) / del (*GJB6-D13S1854*) seria observada uma banda de 460pb e outra de 564pb. Para genotipagem, os segmentos foram visualizados em gel de poliacrilamida 8% [40% (29:1)] corado com nitrato de prata. Realizou-se a corrida eletroforética por 2 horas a 100V.

3.5.3 Mutação A1555G

Para a análise da mutação A1555G no gene 12S rRNA foram utilizados os *primer*: *Primer F* 5'- AGAAATGGGCTACATTTTCTACCC-3' e *Primer R* - 5'- GTTCGTCCAAGTGCACCTTCCA-3'. O ciclo utilizado constou de primeira etapa: 94°C por 6 minutos e 60°C por 2 minutos, uma vez; segunda etapa com 5 ciclos *touchdown*: 72°C por 1 minuto, 94°C por 40 segundos e 65°C (-1°C por ciclo) por 40 segundos; terceira etapa: 72°C por 1 minuto, 94°C por 40 segundos e 60°C por 40 segundos; e quarta etapa constou de um ciclo de extensão a 72°C por 4 minutos. Os fragmentos desta amplificação têm 248pb. Após amplificação do segmento, foi realizada digestão enzimática com a enzima *BsmAI*. Para a digestão utilizou-se as seguintes concentrações finais: 0,9X Buffer4 e 0,25 U da enzima de

restrição *BsmAI*. Sendo que, para um volume final de 15µL adicionamos 4,2 µL de Buffer4 (1X), 0,8 µL de enzima na concentração de 5.000 U/mL e 10µL do produto da PCR. Em seguida incubou-se em banho-maria a 55°C *overnight* (aproximadamente 16 horas). Os fragmentos foram visualizados em gel de poliacrilamida 8% [40% (29:1)] corado com nitrato de prata. Realizou-se a corrida eletroforética por 1 hora e 40 minutos a 100V. Duas bandas, uma com 197pb e outra com 51pb, foram observadas para alelo selvagem e uma banda de 248pb seria observada para alelo mutante. Desta forma, para amostras homozigotas para alelo selvagem foram observadas duas bandas, uma de 197pb e outra de 51pb. Em amostras homozigotas para alelo mutante seria observada apenas uma banda de 248pb, enquanto em amostras heterozigotas seriam observadas três bandas, uma de 248pb, outra de 197pb e outra de 51pb (TÓTH, 2003).

3.5.4 Análise do éxon 2 do gene *GJB2*

As amostras foram seqüenciadas para pesquisa de mutações no éxon 2, região codificante do gene *GJB2*. Para esta análise foram utilizados *primer* desenhados e cedidos pelo Laboratório de Genética Humana do Centro de Biologia Molecular e Engenharia Genética (CBMEG) - UNICAMP, com este propósito eles dividiram o éxon 2 em duas regiões. Desta forma, utilizaram-se dois pares de *primers*: um que amplifica uma região de 332pb (Primer F: CTCCTGTCTGTCCTAGC e Primer R: GACACGAAGATCAGCTGC) e outro que amplifica uma região de 547pb (Primer F: GCTACGATCACTACTTCCC e Primer R: GGTTGCCTCATCCCTC) cobrindo a região codificante do gene. O ciclo utilizado para amplificação dos segmentos constou de primeira etapa: 95°C por 5 minutos, uma vez; segunda etapa com 30 ciclos: 94°C por 1 minuto, 62°C por 1 minuto e 72°C por 1 minuto; e terceira etapa constou de um ciclo de extensão a 72°C por 5 minutos. Os produtos da amplificação foram visualizados em gel de agarose 1% após eletroforese a 100V por 40 minutos e coloração com brometo de etídio.

Os segmentos amplificados foram purificados através de *kits* comerciais (*PureLink™ PCR Purification Kit – Invitrogen* ou *Illustra™* ou *GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification Kit – GE Healthcare*), segundo as recomendações dos fabricantes.

A partir do produto da PCR purificado, a reação de sequenciamento foi feita em ambas direções (*forward* e *reverse*) utilizando os mesmos *primers* usados para amplificação e o

BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit, da *Applied Biosystems*. O sequenciamento foi realizado em volume final de 10 µL. Utilizou-se 5 µL de produto de PCR purificado, 2,0 µL de *primer* a 2,0pmol, 0,75 µL de tampão *Save Money 5X*, 1 µL de Big Dye e completou com água (1,25uL). O ciclo desta reação foi composto duas etapas: primeira etapa de 96°C por 1 minuto, uma vez e segunda etapa de 30 ciclos: 96°C por 15 segundos, 50°C por 15 segundos e 60°C por 4 minutos. A precipitação do DNA foi realizada através da utilização de etanol 70% / isopropanol 65%.

A reação de sequenciamento foi submetida à eletroforese capilar utilizando o sequenciador ABI 3100, da *Applied Biosystems*, após etapa de desnaturação. Esta etapa constou de ressuspensão do DNA precipitado em 10 µL de formamida, desnaturação, no termociclador, a 95°C por 5 minutos, seguida de choque térmico por 2 minutos em gelo ou freezer -20°C. As seqüências geradas foram analisadas no programa *Bioedit* (HALL, 1999), utilizamos como referência a seqüência NG_008358.1 armazenada no NCBI.

3.6 NOMENCLATURA DAS MUTAÇÕES NO GENE *GJB2*

Utilizou-se nomenclatura segundo Den Dunnen & Antonarakis (2000) para descrever mutações encontradas neste estudo. Como referência genômica utilizaram-se as seqüências NG_008358.1 e NT_024524.14, como referência da região codificante utilizou-se a seqüência NM_004004.5 e como referência protéica utilizou-se a seqüência NP_003995.2, todas armazenadas no NCBI.

Nos textos utilizou-se na primeira citação das mutações a nomenclatura com base na seqüência codificante (para a mutação correspondente a deleção de uma guanina entre os nucleotídeos 30 e 35 da região codificante do éxon 2 e para as substituições nas regiões intrônicas, 5`UTR e 3`UTR) ou na seqüência protéica seguida, entre parênteses, pela nomenclatura utilizada frequentemente nas publicações da área. Nas citações seguintes utilizou-se apenas a nomenclatura proposta por Den Dunnen & Antonarakis (2000) baseada na seqüência da região codificante ou protéica como descrito anteriormente.

3.7 ANÁLISE DOS DADOS

Para a caracterização demográfica e clínica dos pacientes, bem como, para comparação entre o grupo com mutação e o grupo sem mutação foi considerado o total de indivíduos incluídos no estudo. Para cálculo de frequência genotípica e alélica utilizou-se o total de núcleos familiares. Cada núcleo familiar neste trabalho é representado por pai, mãe e filhos.

As frequências alélicas e genotípicas foram calculadas através de contagem direta dos alelos e genótipos. Utilizou-se para frequência dos genótipos o cálculo de porcentagem e para cálculo da frequência dos alelos a fórmula:

$$(HET + 2HMM) / 2N$$

(onde HET = número de indivíduos heterozigotos, HMM = número de indivíduos homozigotos mutantes, N = número de alelos totais, que é igual ao dobro do número de amostras analisadas)

O teste de X^2 e o teste exato de Fisher foram utilizados para comparar proporções entre os grupos.

Os dados obtidos neste estudo serão resumidos (Apêndice B) em formato de artigo para posterior submissão.

4. RESULTADOS

4.1 CARACTERIZAÇÃO DA AMOSTRA

Oitenta e quatro indivíduos com queixa de deficiência auditiva (DA) do município de Monte Santo-BA foram incluídos no presente estudo entre os anos de 2008 e 2010. Esses pacientes correspondem a 38 genealogias e 63 núcleos familiares. A partir das genealogias obtidas, observou-se total de 1.585 indivíduos, desse total 166 possuem DA, porém 82, dos quais 70 residem no município de Monte Santo, foram referidos por familiares, mas não foram incluídos no presente estudo, pois não foram encaminhados ao projeto, bem como, não foram identificados durante viagens de campo. Houve relato de outros casos de DA em 86,5% das famílias para as quais essa informação estava disponível. Uma família não soube relatar se havia outro caso de DA na família e, portanto, não foi considerada para esse cálculo. Em 5 famílias (13,5%) não houve relato de recorrência da DA.

Dos pacientes incluídos no estudo 54,8% foram do sexo masculino. Com relação a autodenominação de cor/raça, 33,9% autodenominaram-se brancos e 66,1% mulato/moreno. Nenhum paciente se autodenominou da cor/raça negra ou com outra denominação. A média de idade dos participantes foi de 32,4 anos (variando de 2 – 70 anos), estando a maioria (27,4%) na faixa dos 40 anos (31 – 40 anos) (Tabela 1).

Em relação à caracterização da DA observou-se que a DA ocorreu bilateralmente em 98,7% dos pacientes e que em 90,9% dos casos a DA foi relatada pré-lingual. No grupo de indivíduos com DA pré-lingual a idade variou de 6 a 70 anos (média de 33 anos). A idade média de percepção da DA entre os casos relatados como pré-linguais foi de 30,6 meses (2 anos e 6 meses) e variou de 1 a 144 meses, ou seja, de 1 mês a 12 anos . Entre os casos pós-linguais a idade variou de 31 a 62 anos (média de 44 anos). Em relação aos possíveis fatores ambientes associados com DA entre os indivíduos com DA pós-lingual observou-se relato de exposição a ruído em 16,7% deles e de doenças infecciosas (rubéola e sarampo) em todos os casos pós-linguais, sendo que em 16,7% desses houve relato de meningite e em 83,3% houve relato de sarampo. Apenas 18,6% dos pacientes tiveram acompanhamento médico especializado anterior ao período de inclusão no projeto.

TABELA 1: Caracterização demográfica e clínica dos 84 indivíduos com DA incluídos no estudo

Variáveis	N*	Percentual ou média (mínimo - máximo) ± desvio-padrão
Caracterização demográfica		
Sexo (masculino)	84	54,8%
Autodenominação cor/raça (branca)	62	33,9%
Idade (anos)	84	32,4 (2 – 70) ± 16,6
Faixa etária	84	
0 – 10	84	11,9%
11 – 20	84	13,1%
21 – 30	84	20,2%
31 – 40	84	27,4%
41 – 50	84	13,1%
> 50	84	14,3%
Caracterização clínica da DA		
Consanguinidade entre os pais (por núcleo familiar)	63	47,6%
Recorrência de deficiência auditiva (amostra total)	83	92,8%
Recorrência de deficiência auditiva (por núcleo familiar)	63	49,2%
Deficiência auditiva pré-lingual	77	90,9%
Idade de percepção de DA nos casos pré-linguais (meses)	70	30,6 (1 - 144) ± 29,7
DA Bilateral	79	98,7%
DA Progressiva	69	20,3%
Presença de zumbido	72	45,8%
Presença de tontura	73	52,1%
Exposição a ruído (casos pós-linguais)	6	16,7%
Doenças infecciosas associadas com DA (casos pós-linguais)	6	100%
Meningite (casos pós-linguais)	6	16,7%
Sarampo (casos pós-linguais)	6	83,3%
Acompanhamento médico especializado	59	18,6%

*Número de amostras disponíveis por variável analisada.

4.2 AVALIAÇÃO OTORRINOLARINGOLÓGICA

Quarenta e nove pacientes foram avaliados por otorrinolaringologista. Quarenta e quatro pacientes (89,8%) possuíam membrana timpânica com aspecto íntegro, coloração branco-nacarada. Quatro pacientes (8,2%) apresentaram membrana timpânica com aspecto anormal (2 com perfuração, 1 com leve retração e 1 com rolha de cera). Sete pacientes apresentaram achados que podem interferir na avaliação audiológica ou estarem relacionados com DA, como: perfuração da membrana timpânica, 2 casos, inflamação, 4 casos (2 bilaterais e 2 em apenas uma das orelhas) ou rolha de cera, 1 caso (Tabela 2).

4.3 AVALIAÇÃO AUDIOLÓGICA

4.3.1 Imitanciometria

Esta avaliação foi realizada por fonoaudiólogo em 45 pacientes. O teste de imitanciometria consta da timpanometria (avaliar a complacência da membrana timpânica) e a estimativa dos limiares do reflexo acústico nas frequências de 0,5; 1; 2 e 4 Khz. Alguns pacientes não foram avaliados audiologicamente, pois apresentaram alterações otorrinolaringológicas ou por serem incluídos após o ano de 2008. Entre as alterações observou-se otite externa e perfuração de membrana timpânica que impossibilitaram a realização da avaliação. Os pacientes sem avaliação serão avaliados posteriormente na Clínica Escola de Fonoaudiologia da UNIME.

Dos 45 pacientes avaliados, 42 tiveram curva tipo A, compatível com complacência normal da membrana timpânica, e 3 tipo C, compatível com alteração da complacência da membrana timpânica provavelmente por causa de disfunção tubária. Vinte pacientes apresentaram reflexo em pelo menos uma frequência avaliada em uma das orelhas, esta situação, associado com queixa de DA possibilita inferir que a perda auditiva seja do tipo neurosensorial, e 25 pacientes apresentaram ausência de reflexo acústico em todas as frequências avaliadas e em ambas as orelhas, porém devido à queixa de perda auditiva e nenhum histórico de alterações de orelha média relatados na anamnese, também podem ser incluídos como supostos pacientes com perda auditiva neurosensorial. Para confirmação do tipo de perda auditiva destes pacientes é necessária realização de testes mais específicos (audiometria tonal limiar e PEATE). Estes testes foram realizados na Clínica Escola de Fonoaudiologia da UNIME e os pacientes não avaliados até o momento seguirão com as avaliações nessa clínica (Tabela 2).

TABELA 2: Descrição das avaliações otorrinolaringológicas e audiológicas

Variáveis	N	Percentual
Avaliação otorrinolaringológica (N= 49)		
Membrana timpânica		
Aspecto íntegro, coloração branco-nacarada	44	89,8%
Perfuração da membrana timpânica	2	4,1%
Leve retração da membrana timpânica	1	2,0%
Rolha ceruminosa	1	2,0%
Inflamação em pelo menos uma orelha	4	8,2%
Avaliação audiológica		
Imitanciometria (N= 45)		
Curva tipo A	42	93,3%
Curva tipo B	3	6,6%
Reflexo acústico em pelo menos uma frequência	20	44,4%
Reflexo acústico em nenhuma frequência	25	55,6%
Audiometria Tonal Liminar (N= 24)		
Grau severo	3	12,5%
Grau severo a profundo	1	4,2%
Grau profundo	20	83,3%
Potencial Evocado Auditivo de Tronco Encefálico (PEATE) (N= 23)		
Ausência das ondas I e III	2	8,7%
Ausência de resposta	19	82,6%
Ausência de resposta associada com microfonismococlear	1	4,40%

4.3.2 Audiometria tonal liminar

Vinte e quatro pacientes avaliados por audiometria tonal limiar tiveram perda a partir do grau severo. Três pacientes (12,5%) dos 24 avaliados tiveram DA de grau severo, 4,2% (1/24) grau severo a profundo e 83,3% (20/24) DA profunda (Tabela 2). As perdas foram observadas tanto na análise da via óssea como na via aérea sugerindo DA neurosensorial.

4.3.3. Potencial evocado auditivo de tronco encefálico (PEATE)

Dos 23 pacientes com avaliação do PEATE, 8,7% (2/23) tiveram ausência das ondas I e III, 82,6% (19/23) não apresentaram resposta e 1 (4,4%) apresentou ausência de resposta associada com microfonismo coclear (Tabela 2). Exceto nesse último caso onde se observou a

presença de microfonismo a DA pode ser classificada como neurossensorial, como sugerido pelos achados da imitanciometria e da audiometria limiar tonal. No caso onde foi observada presença de microfonismo coclear o indivíduo pode apresentar DA neurossensorial ou neuropatia auditiva.

4.4 ANÁLISE DAS GENEALOGIAS

Ao analisar as características dos 63 núcleos familiares incluídos no estudo observou-se que a filiação biológica a partir dos pais citados foi relatada em todos participantes analisados. Foi relatada consanguinidade em cerca da metade (47,6%) dos núcleos familiares, sendo que em 7,9% dos núcleos não souberam informar sobre consanguinidade. A existência de outros casos de DA na família foi relatada por 92,8% dos pacientes, sendo que houve de recorrência da DA em 84,2% das genealogias e em 49,2% dos núcleos familiares incluídos neste trabalho. Estes achados reforçam a origem genética da DA nessa região.

A família com maior número de pacientes participando do projeto é a família 10, a qual é responsável por 11,9% dos pacientes incluídos, seguida das famílias 1 e 5, contribuindo cada uma com 8,3% e da família 17 com 7,1% dos casos. A partir das famílias incluídas neste estudo foram relatados outros 82 indivíduos com DA (Apêndice C).

Doze dos 82 não incluídos no presente estudo residem em outro município. Sendo que um reside em outra cidade baiana (Tucano) e 11 residem no estado de São Paulo. Há também familiares em diferentes cidades baianas e estados brasileiros e esses, se portadores de mutação associada com DA, podem estar contribuindo com os casos de DA destes lugares (Apêndice D). Estas informações não foram obtidas de 9 famílias (famílias 30, 32, 33, 34, 39, 45, 46, 47 e 48).

Os casos de DA incluídos neste trabalho possuem padrão de herança predominantemente sugestivo de herança autossômica recessiva. A única exceção foi o caso da família Nº 10 (Figura 6) onde se observou DA herdada com padrão autossômico dominante.

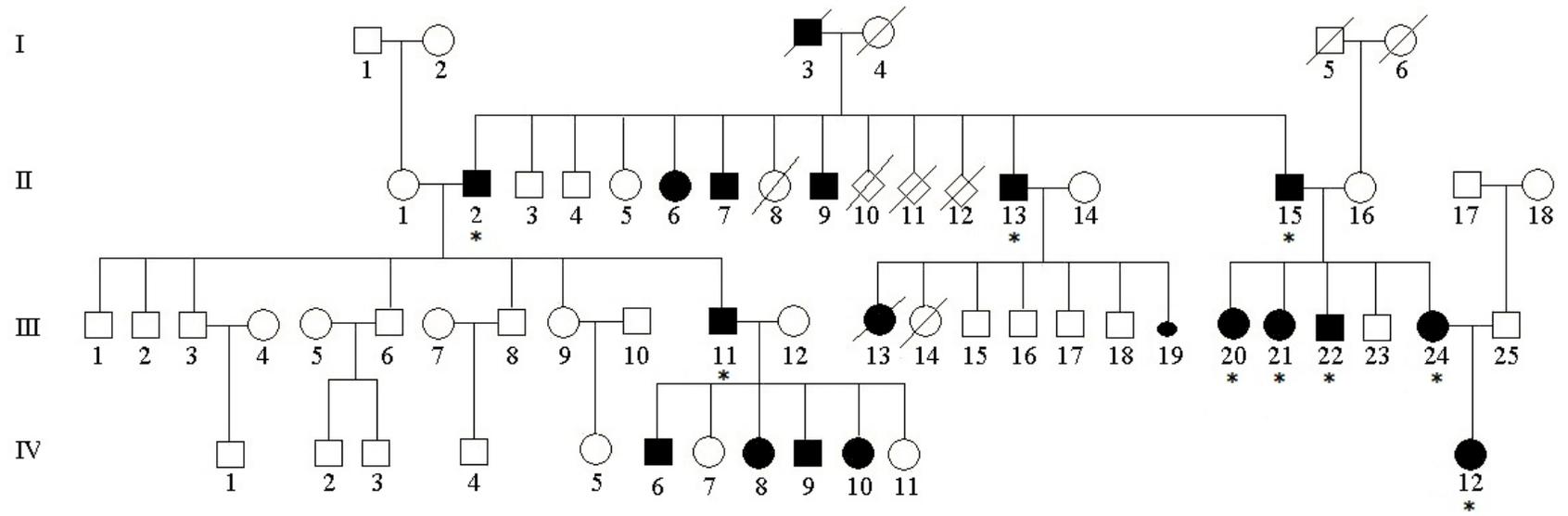


FIGURA 6: Heredograma da família N° 10 com indivíduos incluídos no estudo indicados por asterisco.

4.5. INVESTIGAÇÃO MOLECULAR

4.5.1. Análise da mutação c.35delG

A mutação c.35delG (35delG) no gene *GJB2* foi encontrada (Figura 7) em 25% dos pacientes, correspondendo a 23,7% das genealogias e 23,8% dos núcleos familiares. Todos indivíduos com a mutação foram confirmados por repetição da técnica utilizada. Em 23,8% dos indivíduos, os quais correspondem a 21,1% das genealogias e 22,2% dos núcleos familiares, encontrou-se genótipo homozigoto para mutação c.35delG enquanto em 1,2% dos indivíduos encontrou-se genótipo heterozigoto.

A frequência do alelo com a mutação c.35delG, entre os afetados, foi de 24,4%.

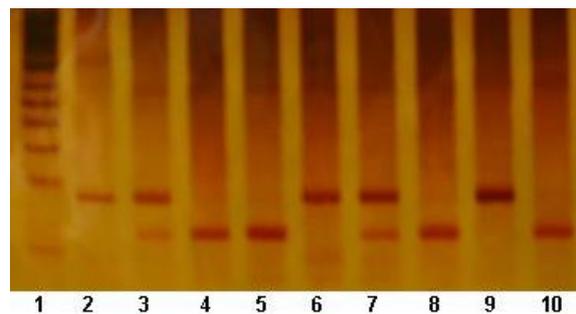


FIGURA 7: Gel de acrilamida a 10% corado com nitrato de prata demonstrando a genotipagem da mutação c.35delG através das técnicas de PCR/RFLP (*Bst*NI). 1 - marcador de 50pb, 2 - segmento não submetido à digestão (87pb), 4, 5, 8 e 10 - homozigotos selvagens (60pb), 3 e 7 - heterozigotos (60 e 87 pb) e 6 e 9 os homozigotos mutantes (87pb).

4.5.2. Análise das mutações del (*GJB6-13S1830*), del (*GJB6-D13S1854*) e A1555G no gene 12Sr RNA

As deleções del (*GJB6-13S1830*) e del (*GJB6-D13S1854*), no gene *GJB6*, e a mutação A1555G, no gene mitocondrial 12S rRNA, não foram observadas nas amostras do presente estudo.

4.5.3. Análise de mutações no éxon 2 do gene *GJB2*

Os indivíduos com a mutação c.35delG em homozigose não foram incluídos nesta análise de sequenciamento do éxon 2 do gene *GJB2*, além disso 3 amostras também não foram analisadas, pois devido a qualidade das amostras não foi possível amplificá-las. Dessa forma, 61 amostras, o que corresponde a um total de 122 alelos, foram analisadas por sequenciamento para a investigação de mutações patogênicas no éxon 2 do gene *GJB2*.

Com esta análise encontram-se no éxon 2 do gene *GJB2* outras sete diferentes mutações em 36,1% dos indivíduos analisados. Em uma família com 9 afetados, 14,8% dos analisados, encontrou-se a mutação p.R75Q (R75Q ou Arg75Gln) em heterozigose (Figura 6). Encontrou-se ainda 21,3% (13/61) de indivíduos com outras mutações no éxon 2 do gene *GJB2*. Quatro delas - c.-15C>T (-15C>T), p.V27I (V27I ou p.Val27Ile), p.M34T (M34T ou p.Met34Thr) e c.*1C>T (682C>T) - são descritas como polimorfismos sem efeito patogênico (BALLANA *et al.*, 2010) e as mutações c.-22-12C>T (IVS1-12C>T) e p.K168R (K168R ou p.Lys168Arg) cuja patogenicidade ainda não está definida (ROUX *et al.*, 2004; BALLANA *et al.*, 2010; BATASSOCO *et al.*, 2009; DINH *et al.*, 2009). Informações sobre algumas dessas mutações estão disponíveis no banco de SNP do NCBI (Quadro 2).

Mutação ¹	dbSNP	Patogênica	Classificação da variação	Nomenclatura				Alelos	Alelo
				NG_008358.1	NM_004004.5	NP_003995.2	NT_024524.14	(RefSNP)	Ancestral
IVS1-12 C>T ²	rs9578260	ND	SNP*	g.8361C>T	c.-22-12C>T	-	g.1743754G>A	A/G	G
-15C>T ³	rs72561725	Não	SNP*	g.8380C>T	c.-15C>T	-	g.1743735G>A	C/T	SI
35delG ⁴	rs80338939	Sim	DIP**	g.8429delG	c.35delG	p.Gly12fx	g.1743686delC	-/G	SI
V27I ⁵	rs2274084	Não	SNP*	g.8473G>A	c.79G>A	p.Val27Ile (p.V27I)	g.1743642C>T	C/T	C
M34T ⁵	rs35887622	Não	SNP*	g.8495T>C	c.101T>C	p.Met34Thr (M34T)	g.1743620A>G	C/T	SI
R75Q ⁵	rs28931593	Sim	SNP*	g.8618G>A	c.224G>A	p.Arg75Gln (p.R75Q)	g.1743497C>T	A/G	G
K168R ⁵	SI	ND	SNP*	g.8897A>G	c.503A>G	p.Lys168Arg (p.K168R)	g.1743218T>C	SI	SI
682C>T ⁶	SI	Não	SNP*	g.9076C>T	c.*1C>T	SI	g.1743039G>A	SI	SI

Quadro 2: Caracterização das mutações encontradas no presente estudo. ¹Nomenclatura das mutações segundo a descrição em publicações da área; ²Mutação no íntron 1; ³Mutação na região UTR5; ⁴Mutação *frameshift*; ⁵Mutação *missense*; ⁶Mutação na região UTR3; **Single Nucleotide Polymorphism*; ***Deletion / Insertion Polymorphism*; **SI**= Sem informação no NCBI; **ND**= Patogenicidade não definida.

4.5.4. Genótipos e frequências alélicas e genotípicas

Com a análise do éxon 2 do gene *GJB2* observaram-se 11 diferentes genótipos (Tabela 3). Dois desses, c.35delG em homozigose e p.R75Q em heterozigose, são conhecidamente associados com DA genética, confirmando-se, assim, etiologia genética da DA em 35,8% dos pacientes com avaliação molecular completa, ou seja, excluindo-se apenas 3 amostras cuja análise do sequenciamento não foi realizada devido a qualidade da amostra.

TABELA 3: Descrição dos genótipos com respectivos números de indivíduos com DA genotipados e frequências (%) na amostra.

Genótipo	N* Disponível para análise	Frequência dos genótipos (%)
Patogênico		
c.35delG / c.35delG	84	23,8
p.R75Q / +	61	14,8
Não Patogênico		
+ / +	81	53,1
c.-22-12C>T / +	61	6,6
c.-22-12C>T / p.V27I	61	1,6
c.-15 C>T / +	61	1,6
c.35delG / +	84	1,2
p.V27I / +	61	6,6
p.M34T / +	61	1,6
p.K168R / +	61	1,6
c.*1C>T / +	61	1,6

+ : Alelo selvagem; * O número de pacientes variou para os diferentes genótipos, pois algumas amostras não foram analisadas por sequenciamento.

Os alelos mutantes mais frequentes na amostra foram c.35delG com 24,4% e p.R75Q com 7,4%, seguidos dos alelos c.-22-12C>T e p.V27I, ambos com frequência igual a 4,1%. Os demais alelos tiveram cada um frequência alélica igual a 0,8% (Tabela 4).

TABELA 4: Frequências alélicas das mutações analisadas em indivíduos com DA de Monte Santo-BA.

Mutação / Gene	Frequência do alelo mutante (%)
Patogênica	
c.35delG / <i>GJB2</i>	24,4
p.R75Q / <i>GJB2</i>	7,4
del (<i>GJB6</i> -13S1830) / <i>GJB6</i>	0,0
del (<i>GJB6</i> -D13S1854) / <i>GJB6</i>	0,0
A1555G / 12SrRNA	0,0
Não patogênica	
c.-15C>T / <i>GJB2</i>	0,8
p.V27I / <i>GJB2</i>	4,1
c.*1C>T ou 682C>T / <i>GJB2</i>	0,8
p.M34T / <i>GJB2</i>	0,8
Patogenicidade não estabelecida	
c.-22-12C>T / <i>GJB2</i>	4,1
p.K168R / <i>GJB2</i>	0,8

4.5.5. Descrição das famílias com mutações no gene *GJB2*

A análise da mutação c.35delG confirmou a origem genética da DA em 8 famílias (Nº 05, Nº 06, Nº 12, Nº 17, Nº 19, Nº 21, Nº 41 e Nº 42) (Tabela 5). Nas famílias Nº 17 e Nº 41 observou-se apenas um paciente com a mutação c.35delG em homozigose apesar dessas famílias apresentarem 6 e 4 pacientes, respectivamente, incluídos no projeto.

O indivíduo com a mutação c.35delG em homozigose da família Nº 17 está identificado como o sétimo indivíduo da quarta geração (IV-7) (Figura 8). Os pacientes III-32 e II-37 dessa família possuem DA adquirida com a idade (presbiacusia). A família Nº 21, na qual todos os três pacientes foram analisados (irmãos: III-3, III-4 e III-5 na Figura 9) e também possuem a mutação c.35delG em homozigose, relatou parentesco com indivíduo III-18 da família Nº 17, no entanto, não foi possível unificar as duas genealogias.

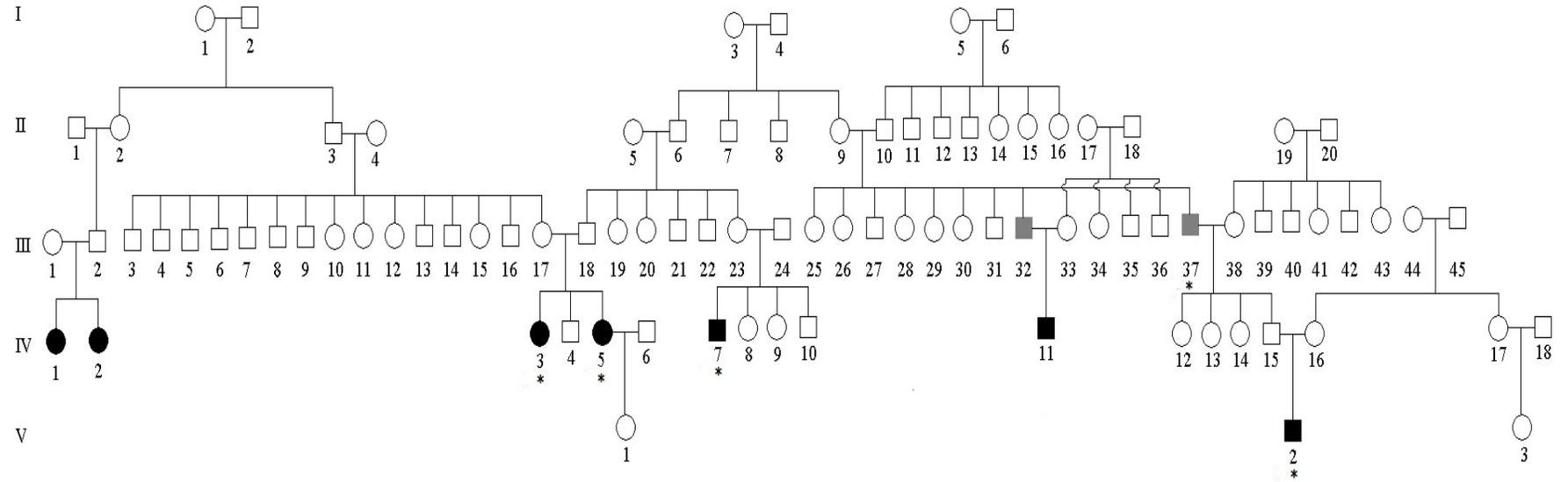


FIGURA 8: Heredograma da família N° 17 com indivíduos incluídos no estudo indicados por asterisco.

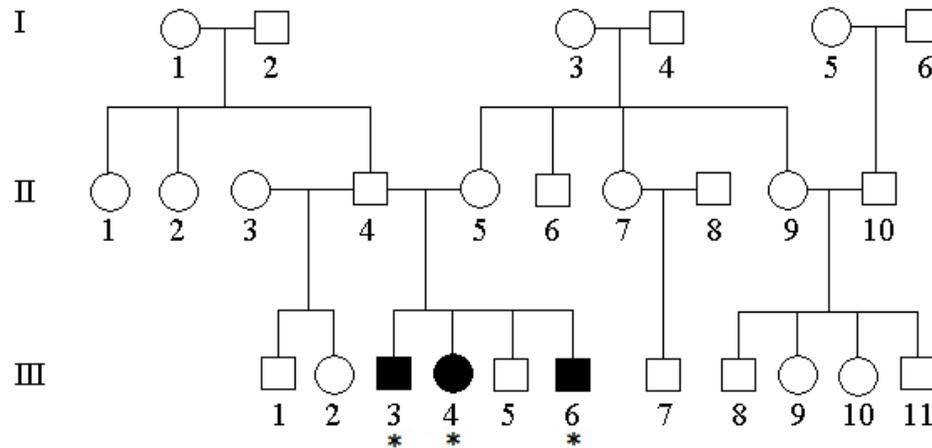


FIGURA 9: Heredograma da família N° 21 com os indivíduos incluídos no estudo indicados por asterisco.

O paciente da família N° 41 (Apêndice E: Figura 10) com genótipo homozigoto mutante para c.35delG é o paciente 13 da geração IV (IV-13). Nos demais pacientes dessa família, incluídos no presente estudo, encontrou-se em dois indivíduos, irmãos (IV-2 e IV-3), a mutação c.-22-12 C>T e em um indivíduo (V-1) a mutação c.-15 C>T, ambas em heterozigose em todos os casos (Tabelas 5 e 6).

A mutação c.-22-12 C>T, além de ser encontrada em pacientes da família N°41, também foi encontrada em outros 3 pacientes de diferentes famílias: N° 18 (Apêndice E: Figura 11), N° 39 e N° 45 (Tabelas 5 e 6). Dados genealógicos não foram obtidos dessas duas últimas famílias.

Dois pacientes com a mutação c.-22-12 C>T se autodenomiram e foram classificados fenotipicamente como mulatos, dois foram classificados fenotipicamente como brancos e para um paciente não temos informação sobre autodenominação e classificação fenotípica. O paciente que possui a mutação c.-15 C>T foi classificado fenotipicamente como branco.

A mutação p.V27I foi encontrada em heterozigose com a mutação c.-22-12 C>T em um indivíduo com DA da família N° 18 (Apêndice E: Figura 11) e em heterozigose com alelo selvagem no éxon 2 do gene *GJB2* em outros 4 pacientes, um da família N° 18, dois da família N° 9 (Apêndice F: Figura 12) e um da família N° 30 (Tabelas 5 e 6). Dados genealógicos não foram obtidos dessa última família. Dos cinco pacientes que possuem a mutação p.V27I quatro se

autodenominaram e foram classificados fenotipicamente como mulatos e para um paciente não foi obtida informação sobre autodenominação e classificação fenotípica da cor/raça.

Outras mutações foram encontradas em heterozigose nas famílias N° 23, mutação p.M34T (Apêndice F: Figura 13), N° 02, mutação p.K168R (Apêndice G: Figura 14) e N° 29, mutação c.*1C>T (Apêndice G: figura 15). O paciente que possui a mutação p.M34T se autodenominou e foi classificado fenotipicamente como branco, o paciente com a mutação p.K168R se autodenominou mulato e o paciente com a mutação c.*1C>T se autodenominou branco, no entanto, foi classificado fenotipicamente como mulato.

A caracterização clínica dos pacientes que possuem as mutações não patogênicas, bem como as mutações sem patogenicidade estabelecida pode ser encontrada na Tabela 6.

Na família N° 10 encontrou-se a mutação a p.R75Q em heterozigose em todos casos analisados (Figura 6). A maioria, 8 pacientes, dos indivíduos dessa família incluídos no estudo reside na mesma localidade. As avaliações otorrinolaringológicas e audiológicas não foram realizadas ainda nestes pacientes.

4.6 GRUPO COM MUTAÇÃO C.35DELG *VERSUS* GRUPO SEM MUTAÇÃO C.35DELG

Ao comparar os grupos de indivíduos com mutação c.35delG com o grupo de indivíduos sem essa mutação (Tabela 7) observou-se que a caracterização da cor/raça do paciente por autodenominação apresentou diferença tendendo a significância com predominância de cor/raça branca nos pacientes com c.35delG. No entanto, ao avaliar a característica cor/raça branca por avaliação fenotípica os grupos não se mostraram estatisticamente diferentes.

Observou-se diferença estatisticamente significativa para a variável “relato de zumbido”, com predominância de relatos no grupo sem mutação. Para as demais variáveis analisadas não se observou diferença entre os grupos.

TABELA 5: Caracterização da DA nas famílias com mutações no éxon 2 do gene *GBJ2*.

Mutação	Família	Genótipo	Nº pacientes Incluídos	Nº pacientes com mutação	DA familiar	DA Congênita	DA bilateral	DA progressiva
c.35delG	05	HMM	05	05	Sim	Sim	Sim	Não
	06	HMM	07	07	Sim	Sim	Sim	1 Sim / 6 Não
	12	HMM	01	01	Sim	Não	Sim	Sim
	17	HMM	06	01	Sim	4 Sim / 1 Não	Sim	Não
	19	HMM	01	01	Sim	Sim	Sim	Não
	21	HMM	03	03	Sim	Sim	Sim	1 Sim / 2 Não
	27	HET	01	01	Sim	Sim	Sim	Sim
	41	HMM	04	01	Sim	Sim	Sim	Não informado
	42	HMM	01	01	Sim	Não	Sim	Sim
p.R75Q	10	HET	09	09	Sim	Sim	8 Sim / 1 Não informado	1 Sim / 3 Não / 5 Não informados
c.-22-12 C>T	18	HET	02	01	Sim	Não informado	Sim	Não
	39	HET	01	01	Sim	Não	Sim	Sim
	41	HET	04	02	Sim	Sim	Sim	Não
	45	HET	01	01	Sim	Não informado	Sim	Sim
p.V27I	09	HET	05	02	Sim	1 Sim / 1 Não	Sim	Não
	18	HET	02	02	Sim	Não	Sim / Não	Sim / Não
	30	HET	01	01	Sim	Sim	Sim	Não
c.-15 C>T	41	HET	04	01	Sim	Não informado	Sim	Não informado
p.M34T	23	HET	02	01	Sim	Não	Não	Sim
p.K168R	02	HET	01	01	Sim	Sim	Não informado	Não informado
c.*1C>T	29	HET	01	01	Não	Não	Sim	Não

HMM - homozigoto mutante; HET – heterozigoto

TABELA 6: Caracterização clínica dos pacientes que possuem mutações não patogênicas ou mutações sem patogenicidade estabelecida

Mutação	Família	Identificação do paciente na genealogia da família	DA Congênita	Reage a algum som	Estabelece comunicação oral	Doenças infecciosas associadas com DA	Achados Orelhas	Avaliação audiológica
c.-22-12C>T	18	III-22	-	Sim	Sim	Nenhuma	A	-
	39	-	Não	Não	Não	Sarampo	-	-
	41	IV-2	Sim	Sim	Não	Sarampo e caxumba	-	-
	41	IV-3	Sim	Sim	Não	Sarampo e caxumba	-	-
	45	-	-	Sim	Não	Sarampo e IVAS	-	-
p.V27I	9	II-2	Não	Sim	Sim	-	-	-
	9	III-4	Sim	Sim	Não	Meningite, sarampo e IVAS	B	E
	18	III-22	-	Sim	Sim	Nenhuma	A	-
	18	II-13	Não	Sim	Sim	Caxumba, sarampo e IVAS	C	-
	30	-	Sim	Sim	Não	Rubéola	D	F
c.-15 C>T	41	V-1	-	Não	Não	Catapora	-	-
p.M34T	23	III-2	Não	Sim	Sim	Sarampo e IVAS	B	G
p.K168R	2	II-3	Sim	Sim	Não	IVAS e rubéola	B	G
c.*1C>T	29	III-1	Não	Sim	Não	Meningite, sarampo e IVAS	B	G

A= Perfuração da membrana timpânica esquerda; B= Sem alteração; C= Perfuração da membrana timpânica direita; D= Conduitos auditivos são curtos sem estenose; F= DA profunda e neurosensorial com presença de reflexo apenas em 0,5 KHZ; F= DA profunda e neurosensorial, sem reflexo acústico em ambas orelhas; G= Imitanciometria compatível com DA neurosensorial e ausência de reflexo acústico.

TABELA 7: Comparação entre os grupos de indivíduos com c.35delG com o grupo sem c.35delG

Variável (N disponível*)	Com c.35delG (%)	Sem c.35delG (%)	P valor
Gênero masculino (84)	61,9	<u>52,4</u>	<u>0,613</u>
Autodenominação cor/raça branca (62)	52,9	<u>26,7</u>	<u>0,051</u>
Análise fenotípica cor/raça branca (68)	50,0	<u>33,3</u>	<u>0,274</u>
Consanguinidade entre pais (71)	57,9	50,0	<u>0,601</u>
DA familiar (83)	100,0	<u>90,0</u>	<u>0,330</u>
DA congênita (77)	<u>100,0</u>	<u>87,7</u>	<u>0,180</u>
DA bilateral (79)	100,0	<u>98,3</u>	1,000
DA progressiva (69)	25,0	<u>18,4</u>	<u>0,528</u>
DA profunda (28)	<u>60,0</u>	83,3	<u>0,207</u>
Zumbido (72)	25,0	<u>53,8</u>	<u>0,036</u>
Tontura (73)	38,1	<u>57,7</u>	<u>0,195</u>
Meningite e sarampo (74)	33,3	<u>56,6</u>	<u>0,121</u>

*Houve variação no número de indivíduos analisados por variável, pois considerou-se para cálculo apenas indivíduos com respostas consistentes, ou seja, onde estivessem claras. No caso da variável “DA profunda” o número de indivíduos ficou limitado, pois dependeu da disponibilidade de transporte dos pacientes até o serviço da UNIME que fica em Lauro de Freitas que fica a 365 km de Monte Santo.

5. DISCUSSÃO

O presente estudo visou investigar as bases moleculares da DA em pacientes afetados provenientes de Monte Santo-BA. Nessa região há um grande número de casos de DA com recorrência familiar, levando a acreditar em possível causa genética.

A amostra estudada foi composta por casos de ocorrência esporádica e familiar, congênitos e pós-natal, com ou sem relato de doenças infecciosas associadas com DA e foi composta também por indivíduos de diferentes faixas etárias. Não foram incluídos pacientes com DA associada a síndromes.

Mutações no *locus* DFNB1, principalmente no gene *GJB2*, que codifica a Cx26, são implicadas como uma das principais causas de DA hereditária, especialmente nos tipos recessivos (KELSELL *et al.*, 1997; ESTIVILL *et al.*, 1998; KENNESON *et al.*, 2002; NCBI, MIM #220290; BALLANA *et al.*, 2010). A DA causada por mutações nesse *locus*, é geralmente pré-lingual (JANECKE *et al.*, 2002). No presente trabalho apesar de não terem sido selecionados apenas casos de DA pré-lingual, a maior parte dos casos 90,9% foi de DA relatada como pré-lingual. Foram investigadas mutações nesse *locus*: mutação c.35delG e outras mutações que ocorrem no éxon 2 do gene *GJB2*, bem como duas mutações que envolvem o gene *GJB6*, del (*GJB6*-D13S1830) e del (*GJB6*-D13S1854). Apesar de não ter sido identificado evidência de DA com padrão de herança materna entre as famílias do presente estudo, foi incluída investigação da mutação A1555G, no gene 12Sr RNA. Abreu-Silva *et al.* (2006) ao analisar amostras de pacientes de São Paulo-Brasil observou a presença dessa em um caso cujo padrão de herança era sugestivo de herança autossômica recessiva e em um caso de DA isolada.

Neste estudo 79,5% dos casos relataram algum tipo de doença infecciosa como meningite, caxumba, sarampo, infecções das vias aéreas superiores (IVAS), catapora ou rubéola. Batissoco *et al.* (2009), também incluíram os casos com fatores ambientes na amostra estudada e relatam que, apesar da diferença no critério de seleção da amostra, seus resultados não diferiram dos resultados do trabalho realizado por Oliveira *et al.* (2007). Relato de algum tipo de doença infecciosa que pode estar associada com causa de DA foi observada em 66,7% dos pacientes com mutação c.35delG, desta forma, demonstramos que relato de doenças infecciosas não deve ser critério para exclusão de casos na investigação genética como causa de DA.

Os estudos que investigam a etiologia genética da DA costumam incluir nas suas amostras apenas indivíduos não aparentados (MURGIA *et al.*, 1999; ROUX *et al.*, 2004; XIAO & XIE, 2004; MARLIN *et al.*, 2005; MEDICA *et al.*, 2005; OLIVEIRA *et al.*, 2007; BAYSAL *et al.*, 2008; BONYADI *et al.*, 2009; BATISSOCO *et al.*, 2009; DAI *et al.*, 2009; AL-QAHTANI *et al.*, 2010). Neste estudo foram incluídos indivíduos aparentados bem como indivíduos não aparentados, desta forma, para fins de comparação com demais estudos, será considerado apenas um indivíduo por núcleo familiar, sendo um total de 63 indivíduos e 126 alelos. Desses indivíduos considerados para análise genotípica 14 possuíam genótipo homozigoto para mutação c.35delG e não foram sequenciados para verificar a presença de outras mutações no éxon 2 do gene *GJB2*, além disso 2 no caso de dois indivíduos essa análise também não foi realizada devido à qualidade das amostras. Sendo assim para os cálculos referentes às mutações identificadas por sequenciamento foram considerados 47 indivíduos correspondendo a 94 alelos.

Em relação à mutação c.35delG os resultados do presente estudo mostraram que a frequência de indivíduos homozigotos foi igual a 22,2% e assemelha-se ao encontrado em estudo realizado na Croácia, onde Medica *et al.* (2005) observaram 25,4% de afetados, com DA não-sindrômica pré-lingual, homozigotos para mutação c.35delG. No entanto, foi menor que o observado em estudo realizado na Itália, onde Murgia *et al.* (1999) encontrou esse genótipo em 30,2% dos afetados, e maior que estudos realizados no Brasil bem como em outros países/localidades como Irã, França, República de Altai, Turquia, China, Reino da Arábia Saudita e Itália, nesse caso em estudo realizado no norte do país (ROUX *et al.*, 2004; XIAO & XIE, 2004; POSUKH *et al.*, 2005; OLIVEIRA *et al.*, 2007; BAYSAL *et al.*, 2008; BATISSOCO *et al.*, 2009; BONYADI *et al.*, 2009; DAI *et al.*, 2009; PRIMIGNANI *et al.*, 2009; AL-QAHTANI *et al.*, 2010) (Tabela 8).

A frequência do alelo c.35delG encontrada no presente trabalho (23,0%) foi semelhante à encontrada em estudo realizado no Brasil (20,3%) e no Irã (18,2%), menor que a encontrada em estudo realizado na Croácia (29,4%) e maior que a encontrada em outro estudo brasileiro (9,8%) e em estudos realizados em outros países como França (11,9%) e Turquia (6,8%) (ROUX *et al.*; 2004; MEDICA *et al.*, 2005; OLIVEIRA *et al.*, 2007; BAYSAL *et al.*, 2008; BATISSOCO *et al.*, 2009; BONYADI *et al.*, 2009).

TABELA 8: Frequência do genótipo homozigoto para mutação c.35delG em indivíduos com DA em diferentes populações

Localidade	Frequência Genotípica HMM(%)	Referência
Monte Santo - BA/Brasil	23,0	Presente estudo
São Paulo - SP/Brasil	7,3	BATISSOCO <i>et al.</i> , 2009
Brasil	14,0	OLIVEIRA <i>et al.</i> , 2007
Brasil	3,0	OLIVEIRA <i>et al.</i> , 2007
França	6,3	ROUX <i>et al.</i> , 2004
Itália	30,2	MURGIA <i>et al.</i> , 1999
Itália (norte)	16,9	PRIMIGNANI <i>et al.</i> , 2009
Croácia	25,4	MEDICA <i>et al.</i> , 2005
República de Altai (todos russos)	9,2	POSUKH <i>et al.</i> , 2005
Turquia	5,3	BAYSAL <i>et al.</i> , 2008
Irã (noroeste; povo turco do Azerbaijão)	15,3	BONYADI <i>et al.</i> , 2009
China	0,8	XIAO & XIE, 2004
China	0,1	DAI <i>et al.</i> , 2009
Reino da Arábia Saudita	6,4	AL-QAHTANI <i>et al.</i> , 2010

*Indivíduos com a mutação e que não fazem parte da mesma família; **Não descreveu se os indivíduos incluídos no respectivo estudo são relacionados.

A frequência alélica encontrada no presente trabalho pode indicar certa homogeneidade dos casos de DA genética no município de Monte Santo-BA, com destaque para elevada recorrência da DA nas famílias com a mutação c.35delG.

A diferença entre a frequência de homozigotos para mutação c.35delG do estudo realizado na Itália, onde a frequência de homozigotos com a mutação foi maior que a encontrada neste trabalho, e dos estudos realizados em outras localidades como São Paulo-Brasil, França, Milwaukee-WI/Estados Unidos, República de Altai (todos russos), Turquia, China e Reino da Arábia Saudita, onde a frequência foi menor que a encontrada neste estudo, poder ter ocorrido devido à composição genética da população. Essa diferença poderia ser explicada por efeito fundador. Van Laer *et al.* (2001) encontraram evidências de que a alta frequência do alelo c.35delG no gene *GJB2* na população branca é resultado de efeito fundador. Gasparini *et al.* (2000) e sugerem origem única para mutação c.35delG na Europa ou no Médio Oriente.

Estudos da população de Portugal, da Itália e da Espanha, três populações que contribuíram significativamente para a miscigenação da Bahia, mostraram alto índice de alelos com a mutação c.35delG. Em Portugal, a frequência de portadores desta mutação em

amostra populacional foi de 1/45 (4/179), na Espanha foi de 1/40 (5/200) e na Itália de 1/32 (8/255) (GASPARINI *et al.*, 2000). A elevada frequência do alelo c.35delG nos estudos da Itália e da Croácia poderia ser explicada por efeito fundador com o alelo introduzido e se mantendo nesses lugares há muitas gerações, enquanto, a baixa frequência desse alelo nas amostras dos estudos realizados em localidade como Milwaukee-WI/Estados Unidos, República de Altai (todos russos), Turquia, Irã (turcos do Azerbaijão), China e Reino da Arábia Saudita pode representar a introdução recente desse alelo na população ou a sub-estruturação da população dessas localidades através de casamentos preferenciais entre nativos.

Provavelmente a mutação c.35delG também foi introduzida recentemente em Monte Santo-BA, no entanto, a frequência dessa mutação pode ser maior que a encontrada nesses países pela homogeneidade da população de Monte Santo ocasionada por endocruzamento e endogamia. Na amostra do presente estudo observou-se relato de consangüinidade entre os pais de 52,1% dos pacientes. Além disso, relatos de casamentos consanguíneos em Monte Santo têm sido observados em outros trabalhos do grupo (AMORIM *et al.*, 2007).

A predominância de pacientes classificados como brancos com genótipo homozigoto para a mutação c.35delG encontrada neste trabalho era esperada, pois segundo Green *et al.* (1999), esta mutação é mais freqüente em caucasianos. Desta forma, a mutação c.35delG pode ocorrer na região de Monte Santo devido a efeito fundador de colonizadores de origem européia ou de seus descendentes. No entanto, estudo de ancestralidade genômica é necessário para verificar a contribuição da ancestralidade européia nos pacientes com c.35delG desse município.

Heterogeneidade genética em pacientes com DA genética com padrão autossômico recessivo provenientes de família com casos de consanguinidade foi observado por Lezirovitz *et al.* (2008). No presente trabalho também se encontrou casos familiares (família Nº 17 e Nº 41) de DA com heterogeneidade. Nos casos do presente estudo encontrou-se a mutação c.35delG em alguns indivíduos, mas não se encontrou a mutação responsável pela DA nos outros integrantes dessas famílias. Como observado no presente estudo, onde 35,8% dos 81 afetados análise molecular completa possui DA genética causada por mutações no éxon 2 do gene *GJB2*, a DA no município de Monte Santo é heterogênea. Considerando o elevado número (92,8%) de relato de DA familiar, provavelmente os demais casos de DA nesse município podem ser genéticos e possuir mutações em outros genes. A heterogeneidade da DA nas famílias Nº 17 e Nº 41 pode ser explicada por endocruzamento da população e manutenção dos alelos com mutações associadas com DA - mutação c.35delG e outra(s)

possível(eis) mutação(ões) não identificada(s) no presente estudo - por endogamia nessas famílias durante muitas gerações.

As mutações del (*GJB6-D13S1830*) e del (*GJB6-D13S1854*) no gene *GJB6* e a mutação mitocondrial A1555G, no gene 12S rRNA não foram encontradas no presente trabalho diferentemente de outros estudos brasileiros. No Brasil Piatto *et al.* (2004) encontraram quatro heterozigotos para a mutação c.35delG sendo a mutação del (*GJB6-D13S1830*) detectada em um destes heterozigotos, representando 25% dos heterozigotos para a mutação c.35delG, Batissoco *et al.* (2009) encontraram a del (*GJB6-D13S1830*) em heterozigose com a mutação c.35delG em 3 das 300 amostras analisadas e Oliveira *et al.* (2007) ao analisar 645 indivíduos com DA encontram cada uma das mutações del (*GJB6-D13S1830*) e del (*GJB6-D13S1854*) em cinco amostras. Essas duas deleções são encontradas no *locus* DFNB1 e, como citado anteriormente, a DA causada por mutações nesse *locus*, é geralmente pré-lingual (OLIVEIRA *et al.*, 2007). Nas amostras do presente estudo 90,9% dos casos foram relatados como pré-linguais e, portanto, essas mutações poderiam estar contribuindo com os casos de DA em Monte Santo-BA.

Em relação à mutação A1555G, no gene 12S rRNA, apesar dessa mutação não ter sido encontrada nas amostras do presente estudo, foi encontrada em outras amostras brasileiras. Abreu-Silva *et al.* (2006) ao analisar amostras de pacientes de São Paulo-Brasil observou a presença da mutação A1555G, no gene 12Sr RNA, em um caso cujo padrão de herança era sugestivo de herança autossômica recessiva. Oliveira *et al.* (2007) ao analisar 645 amostras de indivíduos com DA de origem brasileira encontraram essa mutação em amostras de três indivíduos com DA profunda e relato de tratamento com aminoglicosídeos. Apesar dos indivíduos avaliados por Oliveira *et al.* (2007) possuírem essa mutação associada com relato de tratamento com aminoglicosídeos, alguns estudos relatam DA causada por essa mutação em casos sem essa exposição, ressaltando que nesses pacientes essa mutação conduz a um fenótipo que varia de DA severa a moderada ou até mesmo a audição aparentemente normal (PREZANT *et al.*, 1993; ESTIVILL *et al.*, 1998).

A mutação p.R75Q encontrada na família N° 10 é responsável pela DA cujo padrão de herança é autossômico dominante. No presente estudo, o padrão autossômico foi corroborado pelo fato da família não relatar consanguinidade. Essa mutação também tem sido descrita em casos de DA associados com queratodermia palmoplantar (UYGUNER *et al.*, 2002; FELDMANN *et al.*, 2005), sendo relatada em uma família da Turquia (UYGUNER *et al.*, 2002), duas famílias francesas (FELDMANN *et al.*, 2005), uma família de origem russa (POSUKH *et al.*, 2005) e em um paciente dos 207 analisados por Oliveira *et al.* (2007) no

Brasil. Os pacientes incluídos no presente estudo precisarão ser melhor avaliados clinicamente para confirmar se a DA neste caso é isolada ou sindrômica.

Informações sobre algumas das mutações encontradas na análise do éxon 2 do gene *GJB2* estão disponíveis no banco de *SNP* do *NCBI* (Quadro 3). Entre as informações encontradas nesse banco estão descrições das frequências genotípica e alélica para as mutações c.-22-12C>T, c.-15C>T, p.V27I e p.M34T (Tabela 9) em diferentes populações, estas informações demonstram que estas mutações são relativamente frequentes em diferentes populações. As mutações p.V27I, p.M34T, c.-15C>T e c.*2C>T (682C>T) no gene *GJB2*, descritas como não patogênicas e como polimorfismos, também foram encontradas em outros trabalhos realizados com pacientes com DA do Brasil, dos Estados Unidos, da França, em afro-americanos e hispano-caribenhos, iranianos, chineses (CHALESHTORI *et al.*, 2004; ERBE *et al.*, 2004; ROUX *et al.*, 2004; OLIVEIRA *et al.*, 2007; SAMANICH *et al.*, 2007; BATISSOCO *et al.*, 2009; BONYADI *et al.*, 2009; DAI *et al.*, 2009).

A mutação c.-22-12C>T (IVS1-12C>T) foi descrita por Roux *et al.* (2004) como mutação nova com efeito patogênico desconhecido, no entanto, relataram que segundo programas de predição de *splicing* esta mutação deveria ser silenciosa. Eles destacam também que esta mutação foi encontrada em homozigose em um paciente de Guadalupe que possuía também a mutação -34T>C no gene *GJB2* em um dos cromossomos. Esta mutação está descrita no “*The Connexin-Deafness Homepage*” (BALLANA *et al.*, 2010) como mutação cujo efeito patogênico é desconhecido. No presente trabalho a mutação c.-22-12C>T foi encontrada em 5 pacientes com fenótipos diferentes. Um paciente foi avaliado por otorrinolaringologista e apresentou perfuração da membrana timpânica (indício de DA ambiental), estabelece comunicação através da linguagem oral e é heterozigoto composto para a mutação p.V27I. Outros 3 pacientes conseguem escutar sons de voz, quando alta ou próximo a orelha, e 2 relataram dor na orelha.

A mutação p.K168R foi descrita recentemente e seu efeito em relação à patogenicidade ainda não está definido (OLIVEIRA *et al.*, 2007; BATISSOCO *et al.*, 2009). Batissoco *et al.* (2009) ao analisarem 300 indivíduos com DA aparentemente não-sindrômica encontrou 2 indivíduos heterozigotos para esta mutação. Analisou ainda 50 amostras de brasileiros descendentes de europeus e 50 amostras de afro-brasileiros, não havendo presença da mutação. A análise em *software* específico para determinar o possível efeito desta mutação no fenótipo mostrou que pode se tratar de uma variante não patogênica.

Neste trabalho encontrou-se elevado número (79,5%) de pacientes com relatos de doenças infecciosas, sendo que 100,0% dos casos sem mutação identificada também possuíam

relato de algum tipo de doença infecciosa que segundo a literatura pode está associada com DA. Portanto, não se pode descartar essa causa ambiental entre os afetados com DA onde não foram encontradas mutações causais de DA desse estudo.

Silva *et al.* (2006), avaliaram 53 indivíduos com DA que participam da APADA - BA (Associação de Pais e Amigos dos deficientes auditivos do Estado da Bahia) e identificaram como principal fator etiológico responsável pela DA na população avaliada a rubéola materna, responsável por 32% dos casos de surdez, seguida pela meningite piogênica em 20% dos casos. Nesse estudo realizado por Silva *et al.* (2006) a DA não teve etiologia esclarecida em 15% dos casos, a prematuridade foi relatada em 9%, a hereditariedade (pai ou mãe surdo) e icterícia neonatal, com 6% cada, otite média crônica representou 4%, uso de misoprostol durante a gestação, sarampo, ototoxicidade e caxumba também estiveram presentes, cada um com 2%.

Os dados descritos acima caracterizam uma amostra de indivíduos com DA da Bahia. Em relação a especificação de origem genética da DA provavelmente eles sub-estimaram os casos genéticos uma vez que só consideraram como DA de etiologia genética aqueles onde pelo menos um dos pais também possuíam DA, podendo, desta forma, ter excluído dessa classificação etiológica indivíduos com DA herdada com padrão autossômico recessivo onde pais e mães não fossem afetados. Provavelmente esses pacientes estariam incluídos no grupo de indivíduos caracterizados como DA sem etiologia esclarecida. Apesar disso, o estudo de Silva *et al.* (2006) é importante para destacar o quanto os fatores ambientais estão sendo associados com os casos de DA na Bahia, bem como para reforçar a importância da inclusão de profissionais especialistas em genética para melhor definição da etiologia da DA nos pacientes da Bahia.

Não se pode desconsiderar que a DA na amostra do presente trabalho seja predominantemente de origem genética uma vez que 92,8% dos casos foram relatados como casos familiares, diferente do que foi encontrado por Silva *et al.* (2006). Como apenas 35,8% dos casos de DA da amostra do presente estudo são causados por mutações no éxon 2 do gene *GJB2*, mutações em outros genes estão contribuindo na determinação da DA em Monte Santo-BA.

TABELA 9: Adaptação de informações populacionais, frequências genotípicas e alélicas das mutações c.-22-12C>T, c.-15C>T, p.V27I e p.M34T, depositadas no banco de SNP do NCBI para comparação com as frequências encontradas neste estudo.

c.-22-12C>T (rs72561725)						
Populações analisadas	Nº de cromossomos	Frequência genotípica			Frequência alélica	
		A/A*	A/G*	G/G*	A*	G*
P1 ¹	204	0,020	0,088	0,892	0,064	0,936
CAUC1 ²	62	-	-	1,000	-	1,000
AFR1 ³	48	0,083	0,292	0,625	0,229	0,771
HISP1 ⁴	46	-	0,087	0,913	0,043	0,957
PAC1 ⁵	48	-	-	1,000	-	1,000
Monte Santo	94	-	0,085	0,915	0,042	0,958

c.-15C>T (rs72561725)						
Populações analisadas	Nº de cromossomos	Frequência genotípica			Frequência alélica	
		C/C	C/T	T/T	C	T
P1 ¹	204	0,951	0,049	-	0,975	0,025
CAUC1 ²	62	1,000	-	-	1,000	-
AFR1 ³	48	0,792	0,208	-	0,896	0,104
HISP1 ⁴	46	1,000	-	-	1,000	-
PAC1 ⁵	48	1,000	-	-	1,000	-
Monte Santo	94	0,979	0,021	-	0,989	0,011

p.V27I (rs2274084)						
Populações analisadas	Nº de cromossomos	Frequência genotípica			Frequência alélica	
		C/C*	C/T*	T/T*	C*	T*
P1 ¹	204	0,912	0,078	0,010	0,951	0,049
CAUC1 ²	62	1,000	-	-	1,000	-
AFR1 ³	48	0,958	0,042	-	0,979	0,021
HISP1 ⁴	46	0,913	0,087	-	0,957	0,043
PAC1 ⁵	48	0,750	0,208	0,042	0,854	0,146
pilot.1.CHB+JPT ⁷	88	-	-	-	0,636	0,364
JBIC-allele ⁸	1480	-	-	-	0,606	0,394
HapMap-CEU ¹⁰	120	1,000	-	-	1,000	-
HapMap-HCB ¹¹	88	0,409	0,432	0,159	0,625	0,375
HapMap-JPT ¹²	88	0,386	0,432	0,182	0,602	0,398
HapMap-YRI ¹³	20	1,000	-	-	1,000	-
Monte Santo	94	0,936	0,064	-	0,968	0,032

TABELA 9 (continuação): Adaptação de informações populacionais, frequências genótípicas e alélicas das mutações c.-22-12C>T, c.-15C>T, p.V27I e p.M34T, depositadas no banco de SNP do NCBI para comparação com as frequências encontradas neste estudo.

Populações analisadas	Nº de cromossomos	p.M34T (rs35887622)				
		Frequência genotípica			Frequência alélica	
		A/A*	A/G*	G/G*	A*	G*
P1 ¹	204	0,980	0,020	-	0,990	0,010
CAUC1 ²	62	0,935	0,065	-	0,968	0,032
AFR1 ³	48	1,000	-	-	1,000	-
HISP1 ⁴	46	1,000	-	-	1,000	-
PAC1 ⁵	48	1,000	-	-	1,000	-
pilot.1.CEU ⁶	72	-	-	-	0,986	0,014
AGI_ASP population ⁹	78	0,949	0,051	-	0,974	0,026
HapMap-CEU ¹⁰	120	0,967	0,033	-	0,983	0,017
HapMap-HCB ¹¹	90	1,000	-	-	1,000	-
HapMap-JPT ¹²	90	1,000	-	-	1,000	-
HapMap-YRI ¹³	120	1,000	-	-	1,000	-
Monte Santo	94	0,936	0,064	-	0,968	0,032

*Alelos complementares aos descritos na nomenclatura da mutação.

¹DNA humano de 102 indivíduos que se autodenominara: ³africano / afro-americano (24 amostras), ²caucásia (31), ⁴hispanicos (23) e ⁵do litoral do pacífico (24); ⁶Estudo piloto do consorcio internacional *HapMap* constituído por 36 indivíduos de Utah – USA da coleção do *Centre d'Etude du Polymorphisme Humain* (CEPH); ⁷Estudo piloto do consorcio internacional *HapMap* constituído por 44 indivíduos de origem chinesa (Beijing) e japonesa (Tóquio); ⁸Japoneses (752 amostras); ⁹Amostras de origem caucasiana e afro-americana de repositório de células coriônicas aparentemente normais; ¹⁰Indivíduos residentes de Utah com origem no nordeste e oeste da Europa, amostras do CEPH incluídas no *HapMap*; ¹¹Chineses de Beijing, amostras incluídas no *HapMap*; ¹²Japoneses de Tóquio, amostras incluídas no *HapMap*; ¹³Dezoito Iorubás de Ibadan - Nigéria, incluídas no *HapMap*.

No presente trabalho a DA foi relatada como congênita em 90,9% dos casos, a idade média de percepção da DA nesses casos foi de 30,6 meses (2 anos e 6 meses) e variou de 1 a 144 meses. Além disso, apenas 18,6% dos pacientes incluídos no estudo tiveram acompanhamento especializado anterior ao projeto. Estes dados demonstram a necessidade de medidas de divulgação e esclarecimento sobre DA, principalmente sobre possíveis tratamentos e melhora na qualidade de vida após estabelecimento do tratamento da DA, no município de Monte Santo-BA, bem como, reforçam a importância da realização do teste da orelhinha (triagem auditiva neonatal) nos recém nascidos. O presente estudo reforça a importância destacada por estudos brasileiros da investigação de mutações no gene *GJB2* para confirmação da etiologia da DA (OLIVEIRA *et al.*, 2002; PIATTO *et al.*, 2004; OLIVEIRA *et al.*, 2007; BATISSOCO *et al.*, 2009; CORDEIRO-SILVA *et al.*, 2010).

6. CONCLUSÃO

A DA encontrada na amostra do presente estudo foi predominantemente familiar e com padrão de herança autossômico recessivo. No entanto, uma família exibiu padrão autossômico dominante, reforçando a heterogeneidade genética da surdez

Duas mutações, c.35delG e p.R75Q, no éxon 2 do gene *GJB2* contribuíram com a maioria dos casos de DA na amostra estudada. Outras seis mutações no éxon 2 do gene *GJB2* foram encontradas na amostra, sendo quatro conhecidas como não patogênicas e duas cuja patogenicidade é desconhecida.

As mutações del (*GJB6-13S1830*) e del (*GJB6-D13S1854*) no gene *GJB6*, *A1555G* no gene 12S rRNA não foram detectadas nos pacientes estudados nesta amostra.

No grupo com mutação c.35delG observou-se maior número de pacientes que se autodenomiram e/ou foram classificados fenotipicamente como brancos do que o observado no grupo sem essa mutação.

A etiologia genética contribuiu de forma importante, o que ficou evidenciado pelo número de afetados com mutações patogênicas no gene *GJB2* e número de relato de deficiência auditiva familiar.

Esta investigação molecular permitirá a realização de aconselhamento genético adequado para as famílias com as mutações definidas.

Os resultados demonstram a necessidade de medidas de divulgação e esclarecimento sobre deficiência auditiva.

Os resultados reforçam a importância da realização do teste da orelhinha (triagem auditiva neonatal) nos recém nascidos do município de Monte Santo – BA.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABREU-SILVA, R.S.; LEZIROVITZ, K.; BRAGA, M.C.C.; SPINELLI, M.; PIRANA, S.; DELLA-ROSA, V.A.; OTTO, P.A.; MINGRONI-NETTO, R.C. Prevalence of the A1555G (12S rRNA) and tRNASer(UCN) mitochondrial mutations in hearing-impaired Brazilian patients. **Braz J Med Biol Res.** 39(2), 219-226, 2006.
- ANDERSON, S., BANKIER, A. T., BARRELL, B. G., DE BRUIJN, M. H. L., COULSON, A. R., DROUIN, J., EPERON, I. C.; NIERLICH, D. P.; ROE, B. A.; SANGER, F.; SCHREIER, P. H.; SMITH, A. J. H.; STADEN, R.; YOUNG, I. G. Sequence and organization of the human mitochondrial genome. **Nature**, 290: 457-465, 1981.
- AL-QAHTANI, M.H.; BAGHLAB, I.; CHAUDHARY, A.G.; ABUZENADAH, A.M.; BAMANIE, A.; DAGHISTANI, K.J.; SAFIEH, M.; FIDA, L.; DALLOL, A. Spectrum of GJB2 Mutations in a Cohort of Nonsyndromic Hearing Loss Cases from the Kingdom of Saudi Arabia. **GENETIC TESTING AND MOLECULAR BIOMARKERS**, Volume 14, Number 1, 2010.
- AMORIM, T.; ABÉ-SANDES, K.; CASTILLA, E.; GROSSI, G.; VIEIRA, T.; QUEIROZ, I.; PURIFICAÇÃO, A.; ORIOLI, I.; ACOSTA, A.X. Genetics in the “Sertão”: Study of frequent monogenic disorders in Monte Santo – a small city of the state of Bahia – northeastern Brazil. **Acta Bioquímica Latinoamericana**, supl 1, 195, 2007.
- BALLANA, E.; VENTAYOL, M.; RABIONET, R.; GASPARINI, P.; ESTIVILL, X. **Connexins and deafness Homepage**. Disponível em <<http://davinci.crg.es/deafness>> Acesso em julho 2010.
- BATISSOCO, A.C.; ABREU-SILVA, R.S.; BRAGA, M.C.C.; LEZIROVITZ, K.; DELLA-ROSA, V.; ALFREDO, JR, T.; OTTO, P.A.; MINGRONI-NETTO, R.C. Prevalence of GJB2 (Connexin-26) and GJB6 (Connexin-30) Mutations in a Cohort of 300 Brazilian Hearing-Impaired Individuals: Implications for Diagnosis and Genetic Counseling. **EAR & HEARING**, VOL. 30, NO. 1, 1–7, 2009.
- BAYSAL, E.; BAYAZIT1, Y. A.; CEYLANER, S.; ALATAS, N.; DONMEZ, B.; CEYLANER, G.; SAN, I.; KORKMAZ, B.; YILMAZ, A.; MENEVSE, A.; ALTUNYAY, S.; GUNDUZ, B.; GOKSU, N.; ARSLAN, A.; EKMEKCI, A. GJB2 and mitochondrial A1555G gene mutations in nonsyndromic profound hearing loss and carrier frequencies in healthy individuals. **Journal of Genetics**, Vol. 87, No. 1, April 2008.
- BITNER-GLINDZICZ, M. Hereditary deafness and phenotyping in humans. **Br Med Bulln**; 63: 73-94, 2002.
- BONYADI, M.; ESMAEILI, M.; ABHARI, M.; LOTFI, A. Mutation Analysis of Familial GJB2-Related Deafness in Iranian Azeri Turkish Patients. **GENETIC TESTING AND MOLECULAR BIOMARKERS**. Volume 13, Number 5, 2009.
- BRAVERMAN, I.; JABER, L.; LEVI, H.; ADELMAN, C.; ARNOS, K.S.; FISCHEL-GHODSIAN, N. *et al.* Audiovestibular findings in patients with deafness caused by a

mitochondrial susceptibility mutation and precipitated by an inherited nuclear mutation or aminoglycosides. **Arch Otolaryngol Head Neck Surg**, 122 : 1001-4, 1996.

BRAVO, O.; BALLANA, E.; XAVIER ESTIVILL, X. Cochlear alterations in deaf and unaffected subjects carrying the deafness-associated A1555G mutation in the mitochondrial 12S rRNA gene. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, 344, 511–516, 2006.

CHALESHTORI, M.H.; DOWLATI, M.; FARHUD, D.D.; RAD, L.H.; SASANFAR, R.; HOSEINIPOUR, A.; ZOHOUR, M.M.; TOLOOI, A.; GHADAMI, M.; POURJAFARI, H.R.; OSHAGHII, M.A.; PATTON, M.A. Two Novel Mutations and Predominant 35delG Mutation in the Connexin 26 Gene (GJB2) in Iranian Populations. **Iranian J Publ Health**, Vol. 33, No. 2, pp.14-19, 2004.

CORDEIRO-SILVA, M.F.; BARBOSA, A.; SANTIAGO, M.; PROVETTI, M.; DETTOGNI, R.S.; TOVAR, T.T; RABBI-BORTOLINI, E.; LOURO, I.D. Mutation analysis of GJB2 and GJB6 genes in Southeastern Brazilians with hereditary nonsyndromic deafness. **Mol Biol Rep**. 2010.

CZECHOWICZ, J.A.; MESSNER, A.H.; ALARCON-MATUTTI, E.; ALARCON, J.; QUINONES-CALDERON, G.; MONTANO, S.; ZUNT, J.R. Hearing impairment and poverty: The epidemiology of ear disease in Peruvian schoolchildren. ORIGINAL RESEARCH—OTOLOGY AND NEUROTOLOGY. **Otolaryngology–Head and Neck Surgery**, 142, 272-277, 2010.

DAI, P.; YU, F.; HAN, B.; LIU, X.; WANG, G.; LI, Q.; YUAN, Y.; LIU, X.; HUANG, D.; KANG, D.; ZHANG, X.; YUAN, H.; YAO, K.; HAO, J.; HE, J.; HE, Y.; WANG, Y.; YE, Q.; YU, Y.; LIN, H.; LIU, L.; DENG, W.; ZHU, X.; YOU, Y.; CUI, J.; HOU, N.; XU, X.; ZHANG, J.; TANG, L.; SONG, R.; LIN, Y.; SUN, S.; ZHANG, R.; WU, H.; MA, Y.; ZHU, S.; WU, B.; HAN, D.; WONG, L.-J.C. GJB2 mutation spectrum in 2063 Chinese patients with nonsyndromic hearing impairment. **Journal of Translational Medicine**, 7:26, 2009.

DAVIS, R.L. Gradients of neurotrophins, ion channels, and tuning in the cochlea. **Neuroscientist**, 9: 311-6, 2003.

DEL CASTILLO, I.; VILLAMAR, M.; MORENO-PELAYO, M.A.; DEL CASTILLO, F.J.; ALVAREZ, A.; TELLERIA, D.; MENENDEZ, I.; MORENO, F. A deletion involving the connexin 30 gene in nonsyndromic hearing impairment. **N Engl J Med**, 346: 243-249, 2002.

DEL CASTILLO, I.; MORENO-PELAYO, M.A.; DEL CASTILLO, F.J.; BROWNSTEIN, Z.; MARLIN, S.; ADINA, Q. *et al.*: Prevalence and evolutionary origins of the del (GJB6-D13S1830) mutation in the DFNB1 locus in hearingimpaired subjects: a multicenter study. **Am J Hum Genet**, 73(6):1452-1458, 2003.

DEL CASTILLO, F.J.; RODRÍGUEZ-BALLESTEROS, M.; ÁLVAREZ, A.; HUTCHIN, T.; LEONARDI, E. *et al.* A novel deletion involving the connexin-30 gene, del(GJB6-D13S1854), found in trans with mutations in the GJB2 gene (connexin-26) in subjects with DFNB1 non-syndromic hearing impairment. **J Med Genet**, 42:588–594, 2005.

DEN DUNNEN, .JT.; ANTONARAKIS, S.E. **Hum.Mutat.** 15: 7-12, (2000). Disponível em < <http://www.hgvs.org/mutnomen/examplesDNA.html#sub>> Acesso em julho 2010.

DINH, E. H.; AHMAD, S; CHANG, Q; TANG, W.; STONG, B.; LIN, X. Diverse deafness mechanisms of connexin mutations revealed by studies using *in vitro* approaches and mouse models. **Brain Res.**, June 24; 1277: 52–69, 2009.

DOBROWOLSKI, R.; WILLECKE, K. Forum Review Article: Connexin-Caused Genetic Diseases and Corresponding Mouse Models. **ANTIOXIDANTS & REDOX SIGNALING** Volume 11, Number 2, 2009.

DROR, A.A.; AVRAHAM, K.B. Hearing Loss: Mechanisms Revealed by Genetics and Cell Biology. **Annu. Rev. Genet.**, 43:411–37, 2009.

ERBE, C.B.; HARRIS, K.C.; RUNGE-SAMUELSON, C.L.; FLANARY, V.A.; WACKYM, P.A. Connexin 26 and Connexin 30 Mutations in Children with Nonsyndromic Hearing Loss. **The Laryngoscope**, 114: April 2004.

ESTIVILL, X.; FORTINA, P.; SURREY, S.; RABIONET, R.; MELCHIONDA, S.; D'AGRUMA, L.; MANSFIELD, E.; RAPPAPORT, E.; GOVEA, N.; MILA, M.; ZELANTE, L.; GASPARINI, P. Connexin-26 mutations in sporadic and inherited sensorineural deafness. **Lancet**, 351: 394–398, 1998.

FAGUNDES, F.A.P.; MORINIGO, E.A.; SARTORATO, E.L. **Estudo de mutações em genes mitocondriais em indivíduos portadores de surdez neurossensorial não-sindrômica candidatos ou submetidos ao implante coclear.** 2005.

FELDMANN, D.; DENOYELLE, F.; BLONS, H.; LYONNET, S.; LOUNDON, N.; ROUILLON, I.; HADJ-RABIA, S.; PETIT, C.; COUDERC, R.; GARABEDIAN, E.N.; MARLIN, S. The GJB2 mutation R75Q can cause nonsyndromic hearing loss DFNA3 or hereditary palmoplantar keratoderma with deafness. **Am J Med Genet A**, 137:225–7, 2005.

FISCHEL-GHODSIAN, N. Mitochondrial deafness mutations reviewed. **Hum. Mutat.**, 13, 261–270, 1999.

FORGE, A.; BECKER, D.; CASALOTTI, S. et al. Gap junctions in the inner ear: comparison of distribution patterns in different vertebrates and assessment of connexin composition in mammals. **J Comp Neurol.**, 467:207–231, 2003.

FRIEDMAN, L.M.; AVRAHAM , K.B. MicroRNAs and epigenetic regulation in the mammalian inner ear: implications for deafness. **Mamm Genome**, 20:581–603, 2009.

GASPARINI, P.; RABIONET, R.; BARBUJANI, G.; MELCHIONDA, S.; PETERSEN8, M.; BRØNDUM-NIELSEN, K.; METSPALU, A.; OITMAA, E.; PISANO, M.; FORTINA, P.; ZELANTE, L.; ESTIVILL, X.; THE GENETIC ANALYSIS CONSORTIUM OF GJB2 35DELG. High carrier frequency of the 35delG deafness mutation in European populations. **European Journal of Human Genetics**, 8, 19–23, 2000.

GREEN, G.E.; SCOTT D.A.; MCDONALD, J.M.; WOODWORTH, G.G.; SHEFFIELD, V.C.; SMITH, R.J.H. Carrier rates in the Midwestern United States for GJB2 mutations causing inherited deafness. **JAMA**, June 16, – Vol – 281, nº 23, 1999.

GRIFA, A.; WAGNER, C.A.; D'AMBROSIO, L.; MELCHIONDA, S.; BERNARDI, F.; LOPEZ-BIGAS, N.; RABIONET, R.; ARBONES, M.; MONICA, M. D.; ESTIVILL, X.; ZELANTE, L.; LANG, F.; GASPARINI, P. Mutations in GJB6 cause nonsyndromic autosomal dominant deafness at DFNA3 locus. **Nature Genet.** 23: 16-18, 1999.

GUIX, E.B. **Molecular basis of deafness linked to mitochondrial DNA mutations.** 2007.

GUYTON, A.C. **Fisiologia Humana.** 6ª edição. Editora Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 564 pág., 1988.

GUYTON, A.C. **Tratado de Fisiologia Médica.** 6ª edição. Editora Interamericana, Rio de Janeiro, 926 pág., 1984.

HALL, T.A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. **Nucl. Acids. Symp. Ser.** 41:95-98, 1999.

HARRIS, A.L. Emerging issues of connexin channels: biophysics fills the gap. **Q Rev Biophys** 34:325–472, 2001.

Harvard Medical School Center for Hereditary Deafness. **Deafness Gene Mutation Database.** Disponível em < <http://hearing.harvard.edu/index.htm> > Acesso em maio 2010.

HUTCHIN, T.; HAWORTH, I.; HIGASHI, K.; Fischel-Ghodsian, N.; Stoneking, M.; Saha, N. *et al.* A molecular basis for human hypersensitivity to aminoglycoside antibiotics. **Nucleic Acids Res.**, 21:4174-4179, 1993.

IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Censo de 2000. Disponível em < <http://www.ibge.gov.br/censo/default.php> > Acesso em maio 2010.

JANECKE, A.R.; HIRST-STADLMANN, A.; GUNTHER, B.; UTERMANN, B.; MULLER, T.; LOFFLER, J. *et al.* Progressive hearing loss, and recurrent sudden sensorineural hearing loss associated with GJB2 mutations: phenotypic spectrum and frequencies of GJB2 mutations in Austria. **Hum Genet**, 111: 145–53, 2002.

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

KELSELL, D.P.; WEI-LI DI; HOUSEMAN, M.J. REVIEW ARTICLE: Connexin Mutations in Skin Disease and Hearing Loss. **Am. J. Hum. Genet.** 68:559–568, 2001.

KENNESON, A.; VAN NAARDEN, B.K.; BOYLE, C. GJB2 (Connexin26) variants and nonsyndromic sensorineural hearing loss: a HuGE review. **Genet Med**, 4: 258-74, 2002.

KIANG, D.T., JIN, N., TU, Z.-J., LIN, H.H. Upstream genomic sequence of the human connexin26 gene. **Gene**, 199: 165-171, 1997.

LAHIRI, D. K.; NURNBERGER JR., A. A rapid non-enzymatic method for the preparation of HMW DNA from blood for RFLP studies. **Nucleic Acids Res**, v. 19, p. 5444, 1991.

LAIRD, D.W. REVIEW ARTICLE: Life cycle of connexins in health and disease. **Biochem. J.**, 394, 527–543, 2006.

LEE, S.W.; TOMASETTO, C.; PAUL, D.; KEYOMARSI, K.; SAGER, R. Transcriptional downregulation of gap-junction proteins blocks junctional communication in human mammary tumor cell lines. **J. Cell Biol.** 118: 1213-1221, 1992.

LEZIROVITZ, K; PARDONO, E.; AURICCHIO, M. T. B. de MELLO; SILVA, F. L. de CARVALHO e; LOPES, J. J.; ABREU-SILVA, R. S.; ROMANOS, J.; BATISSOCO, A. C.; MINGRONI-NETTO, R. C. Unexpected genetic heterogeneity in a large consanguineous Brazilian pedigree presenting deafness. **European Journal of Human Genetics**, 16, 89–96, 2008.

LOPES-FILHO, O. **Deficiência auditiva**. In: Lopes-Filho O. Tratado de Fonoaudiologia. São Paulo: Roca. p. 3-24, 1997.

LORTHOLARY, O.; TOD, M.; COHEN, Y.; PETITJEAN, O. Aminoglycosides. **Med Clin North Am.**, 79:761-787, 1995.

MAGNI, C. **Deficiência auditiva não-sindrômica: avaliação genética (genes de conexinas) e fenotípica (clínica e audiológica)**. Tese de doutorado (Genética), Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2007.

MARLIN, S.; FELDMANN, D.; BLONS, H.; LOUNDON, N.; ROUILLON, I.; ALBERT, S.; CHAUVIN, P.; GARABÉDIAN, E.-N.; COUDERC, R.; ODENT, S.; JOANNARD, A.; SCHMERBER, S.; DELOBEL, B.; LEMAN, J.; JOURNEL, H.; CATROS, H.; LEMARECHAL, C.; DOLLFUS, H.; ELIOT, M.-M.; DELAUNOY, J.-L.; DAVID, A.; CALAIS, C.; DROUIN-GARRAUD, V.; OBSTOY, M.-F.; GOIZET, C.; DURIEZ, F.; FELLMANN, F.; HÉLIAS, J.; VIGNERON, J.; MONTAUT, B.; MATIN-COIGNARD, D.; FAIVRE, L.; BAUMANN, C.; LEWIN, P.; PETIT, C.; DENOYELLE, F. GJB2 and GJB6 Mutations: Genotypic and Phenotypic Correlations in a Large Cohort of Hearing-Impaired Patients. **Arch Otolaryngol Head Neck Surg.**, 131:481-487, 2005.

MARRES, H.A. Congenital abnormalities of the inner ear. Diseases of the Ear. Edited by Ludman H, Wright T. Bath, **Arnold & Oxford University Press**, pp 288–296, 1998.

MEDICA, I.; RUDOLF, G.; BALABAN, M.; PETERLIN, B. C.35delG/ GJB2 and del(GJB6-D13S1830) mutations in Croatians with prelingual non-syndromic hearing impairment. **BMC Ear, Nose and Throat Disorders**, 5:11, 2005.

MENEZES, P. DE L; NETO CALDAS, S.; DA MOTTA, M.A. **Biofísica da Audição**. Editora Lovise, São Paulo, 188 pág., 2005.

OMIM - On Line Mendelian Inheritance in Man. Disponível em <URL:<http://ncbi.nlm.nih.gov/omim/>> Acesso 20 janeiro 2011.

- MILLER, A.S.; DYKES, D.D.; POLESKY, H.F. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. **Nucleic Acids Res.** 16(3): 1215, 1988.
- MUNHOZ, M. S. L; CAOVILO, H. H.; SILVA, M. L. G.; GANANÇA, M. M. **Audiologia Clínica.** São Paulo: Editora Atheneu, 284 pág., 2003.
- MURGIA, A.; ORZAN, E.; POLLI, R.; MARTELLA, M.; VINANZI, C.; LEONARDI, E.; ARSLAN, E.; ZACCHELLO, F. Cx26 deafness: mutation analysis and clinical variability. **J Med Genet**, 36:829–832, 1999.
- NAJMABADI, H.; CUCCI, R.A.; SAHEBJAM, S. *et al.* GJB2 mutations in Iranian with autosomal recessive nonsyndromic sensorineural hearing loss. **Hum Mutat.** 19: 572, 2002.
- NCBI - National Center for Biotechnology Information: Online Mendelian Inheritance in Man (OMIM). Disponível em < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/omim/> > Acesso em maio de 2010.
- NICKEL R, BECKER D, FORGE A. Molecular and functional characterization of gap junctions in the avian inner ear. **J Neurosci**, 26:6190–6199, 2006.
- NICKEL, R; FORGE, A. Gap junctions and connexins in the inner ear: their roles in homeostasis and deafness. **Current Opinion in Otolaryngology & Head and Neck Surgery**, 16:452–457, 2008.
- NOLLER, H.F. Ribosomal RNA and translation. **Annu Rev Biochem.**, 60:191-227, 1991.
- NORTHERN, J.L.; DOWNS, M.P. **Audição em crianças.** 3a ed. São Paulo: Manole, 1989.
- OLIVEIRA, C.A.; MACIEL-GUERRA, A.T.; SARTORATO, E.L. Deafness resulting from mutations in the GJB2 (connexin 26) gene in Brazilian patients. **Clin Genet.**, 61: 354–358, 2002.
- OLIVEIRA, C.A; ALEXANDRINO, F.; ABE-SANDES, K; SILVA JR, W.A.; MACIELGUERRA, A.T.; MAGNA, L.A.; SARTORATO, E.L. Frequency of the 35delG Mutation in the GJB2 Gene in Samples of European, Asian, and African Brazilians. **Human Biology.** Apr 2004.
- OLIVEIRA, C.A; ALEXANDRINO, F.; VITACHI CHRISTIANI THALITA, V. C.; CARLOS, E. S.; LUIZ, R. C. J.; MACIELGUERRA, A.T.; SARTORATO, E.L.. Molecular Genetics Study of Deafness in Brazil: 8-Year Experience. **American Journal of Medical Genetics Part A**, Volume 143A Issue 14, Pages 1574 – 1579, 2007.
- PALLARES-RUIZ, N.; BLANCHET, P.; MONDAIN, M.; CLAUSTRES, M.; ROUX, A.F. A large deletion including most of GJB6 in recessive non-syndromic deafness: a digenic effect? **Eur J Hum Genet**, 10: 72–76, 2002.
- PETIT, C. Genes responsible for human hereditary deafness: symphony of a thousand. **Nat Genetics**; 14:385-391, 1996.

PFEILSTICKER, L.N.; STOLE, G.; SARTORATO, E.L.; DELFINO, D.; GUERRE, A.T.M. A investigação genética na surdez hereditária não síndrômica. **Rev Bras Otorrinolaringol**, v. 70, n. 2, p. 181-186, 2004.

PIATTO, V.B.; BERTOLLO, E.M.G.; SARTORATO, E.L.; MANIGLIA, J.V. Prevalence of the GJB2 mutations and the del (GJB6-D13S1830) mutation in Brazilian patients with deafness. **40th Inner Ear Biology (IEB) Workshop, Hearing Research**, Volume 196, Issues 1-2, p. 87-93, October 2004.

PIATTO, V.B.; NASCIMENTO, E.C.T.; ALEXANDRINO, F.; OLIVEIRA, C.A.; LOPES, A.C.P.; SARTORATO, E.L.; MANIGLIA, J.V. Genética molecular da deficiência auditiva não-sindrômica. **Rev Bras Otorrinolaringol**, v. 71, n. 2, p. 216-223, 2005a.

PIATTO, V.B.; OLIVEIRA, C.A.; ALEXANDRINO, F.; PIMPINATI, C.J.; SARTORATO, E.L. Perspectivas para triagem da deficiência auditiva genética: rastreamento da mutação 35delG em neonatos. **Jornal de Pediatria** - Vol. 81, Nº2, 2005b.

POSUKH, O.; PALLARES-RUIZ, N.; TADINOVA, V.; OSIPOVA, L.; CLAUSTRES, M.; ROUX, A.-F. Research article Open Access: First molecular screening of deafness in the Altai Republic population. **BMC Medical Genetics**, 6:12, 2005.

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.; SHOHAT, M.; FISCHEL-GHODSIAN, N. Mitochondrial ribosomal RNA mutation associated with both antibiotic-induced and non-syndromic deafness, **Nat. Genet.** 4, 289–294, 1993.

PREZANT, T.R.; CHALTRAW, W.E.; FISCHEL-GHODSIAN, N. (1996) Identification of an overexpressed yeast gene which prevents aminoglycoside toxicity. **Microbiology**, 142, 3407–3414, 1996.

PRIMIGNANI, P.; TROTTA, L.; CASTORINA, P.; LALATTA, F.; SIRONI, F.; CURCIO, C.; TRAVI, M.; AMBROSETTI, U.; CESARANI, A.; GARAVELLI, L.; FORMIGONI, P.; MILANI, D.; ALESSANDRA MURRI, A.; CUDA, D.; COVIELLO, D. A. Analysis of the GJB2 and GJB6 Genes in Italian Patients with Nonsyndromic Hearing Loss: Frequencies, Novel Mutations, Genotypes, and Degree of Hearing Loss. **GENETIC TESTING AND MOLECULAR BIOMARKERS**, Volume 13, Number 2, 2009.

RABIONET, R.; GASPARINI, P.; ESTIVILL, X. Molecular genetics of hearing impairment due to mutations in gap junction genes encoding beta connexins. **Hum Mutat** 16:190–202, 2000.

RABIONET, R.; LÓPEZ-BIGAS, N.; ARBONÈS, M.L.; ESTIVILL, X. Connexin mutations in hearing loss, dermatological and neurological disorders. **Trends Mol Med**, 8: 205–212, 2002.

ROUX, A.F.; PALLARES-RUIZ, N.; VIELLE, A.; FAUGERE, V.; TEMPLINC, L.D.; ARTIÈRES, F.; LINA, G.; MOLINARI, N.; BLANCHET, P.; MONDAIN, M.; CLAUSTRES, M. Molecular Epidemiology of DFNB1 deafness in France. **BMC Medical Genetics**, 5:5, 2004.

SAEZ, J.C.; BERTHOUD, V.M.; BRANES, M.C.; MARTINEZ, A.D.; BEYER, E.C. Plasma membrane channels formed by connexins: their regulation and functions. **Physiol Rev** 83: 1359–1400, 2003.

SAMANICH, J.; LOWES, C.; BURK, R.; SHANSKE, S.; LU, J. SHANSKE, A.; MORROW, B. E. Mutations in GJB2, GJB6, and Mitochondrial DNA Are Rare in African American and Caribbean Hispanic Individuals With Hearing Impairment. **American Journal of Medical Genetics Part A**, 143A:830–838, 2007.

SARTORATO, E.L.; GOTTARDI E, OLIVEIRA CA, MAGNA LA, ANNICHINO-BIZZACCHI JM, SEIXAS CA, *et al.* Determination of the frequency of the 35delG allele in Brazilian neonates. **Clin Genet**. 58:339-40, 2000.

SCHRIJVER I. Hereditary Non-Syndromic Sensorineural Hearing Loss: Transforming Silence to Sound. **Journal of Molecular Diagnostics**, Vol. 6, No. 4, November 2004.

SEVIOR, K.B.; HATAMUCHI, A.; STEWART, I.A.; BYKHOVSKAYA, Y.; ALLEN-POWELL, D.R.; FISCHEL-GHODSIAN, N.; MAW, M.A. Mitochondrial A7445G mutation in two pedigrees with palmoplantar keratoderma and deafness. **Am J Med Genet**, 75:179-85, 1998.

SHAW, R.M.; FAY, A.J.; PUTHENVEEDU, M.A.; VON ZASTROW, M.; JAN, Y.N.; JAN, L.Y. Microtubule plus-end-tracking proteins target gap junctions directly from the cell interior to adherens junctions. *Cell*, 128: 547–560, 2007.

SHOHAT, M.; FISCHEL-GHODSIAN, N.; LEGUM, C.; HALPERN, G. J. Aminoglycoside-induced deafness associated with the mitochondrial DNA mutation A1555G. **Am. J. Otolaryngol.**, 20, 64–67, 1999.

SILVA, L. P. A. DA; QUEIROS, F.; LIMA, I. Etiology of Hearing Impairment in Children and Adolescents of a Reference Center APADA in the city of Salvador, state of Bahia. **Rev Bras Otorrinolaringol**, 72(1):33-6, 2006.

SKVORAK, G. A. B.; MORTON, C. C. Genetic causes of nonsyndromic hearing loss. **Curr Opin Pediatr**, 11:5551-557, 1999.

SÖHL, G.; WILLECKE, K. Gap junctions and the connexin protein family. **Cardiovasc Res**, 62: 228–232, 2004.

STEEL, K. P.; BUSSOLI, T. J. Deafness genes, expressions of surprise. *TIG*, 15 (6):207-11, 1999.

TORIELLO, H. V.; REARDON, W.; GORLIN, R. J. Hereditary Hearing Loss and its Syndromes. **Oxford University Press**, Inc; Oxford: 2004.

TÓTH, T. **Non-Syndromic hereditary hearing impairment**, Thesis for Ph.D. degree. University of Debrecen Medical and Health Science Center, Department of Otorhinolaryngology Debrecen, 2003.

UYGUNER, O.; TUKEL, T.; BAYKAL, C.; ERIS, H.; EMIROGLU, M.; HAFIZ, G.; GHANBARI, A.; BASERER, N.; YUKSEL-APAK, M.; WOLLNIK, B. Short Report: The novel R75Q mutation in the GJB2 gene causes autosomal dominant hearing loss and palmoplantar keratoderma in a Turkish family. **Clin Genet**, 62: 306–309, 2002.

VAN CAMP, G.; SMITH, R. *Hereditary Hearing Loss Homepage*. Disponível em <<http://hereditaryhearingloss.org/>> Acesso em maio 2010.

VAN LAER, L.; COUCKE, P.; MUELLER, R. F.; CAETHOVEN, G.; FLOTHMANN, K.; PRASAD, S. D.; CHAMBERLIN, G. P.; HOUSEMAN, M.; TAYLOR, G. R.; VAN DE HEYNING, C. M.; FRANSEN, E.; ROWLAND, J.; CUCCI, R. A.; SMITH, R. J. H.; VAN CAMP, G. A common founder for the 35delG GJB2 gene mutation in connexin 26 hearing impairment. **J Med Genet**, 38:515–518, 2001.

VAN LAER, L.; CRYNS, K.; SMITH, R. J.; VAN CAMP, G. Nonsyndromic hearing loss. **Ear Hear**, 24: 275-88, 2003.

WHITE, T.W.; PAUL, D.L. Genetic diseases and gene knockouts reveal diverse connexin functions. **Annu Rev Physiol**, 61:283–310, 1999.

WILCOX, S. A.; OSBORN, A. H.; DAHL, H. H. A simple PCR test to detect the common 35delG mutation in the connexin 26 gene. **Mol Diagn** 5: 75-8, 2000.

XIAO, Z.-A.; XIE, D.-H. GJB2 (Cx26) gene mutations in Chinese patients with congenital sensorineural deafness and a report of one novel mutation. Chinese. **Medical Journal**, 117 (12) : 1797-1801, 2004.

ZIMMERMANN, R.A.; THOMAS, C.L.; WOWER, J. Structure and function of rRNA in the decoding domain and at the peptidyltransferase center. In: Hill WE, Moore PB, Dahlberg A, Schlessinger D, Garrett RA, Warner JR, editors. *The ribosome: structure, function and evolution*. Washington DC: **American Society for Microbiology**, p. 331-47, 1990.

APÊNDICE A

Questionário

A – CARACTERIZAÇÃO DA ENTREVISTA/ENTREVISTADOR

1.	Data da entrevista: _____	Entrevistador(a): _____	Local da Entrevista: _____
----	----------------------------------	--------------------------------	-----------------------------------

B – CARACTERIZAÇÃO DO ENTREVISTADO

2.	Nome do paciente: _____ Filiação Biológica: 1. Sim () 2. Não () 3. Não Sabe () Nome do Pai: _____ Nome da Mãe: _____		
3.	Data de Nasc: _____ Local de Nasc./Povoado: _____		
4.	Sexo: 1. Feminino () 2. Masculino ()		
5.	Local Resid./Povoado: _____ Endereço: _____ _____		
6.	Fone(s) p/ contato (1): _____	(2): _____	(3): _____
7.	Estado civil 1. solteiro(a) () 2. casado(a) () 3. união livre (vivem juntos) () 4. separado/divorciado(a) () 5. viúvo(a) () 0. Ignorado ()		
8.	Profissão: _____		

C – ANÁLISE FENOTÍPICA DO PACIENTE (Caracterização morfológica)

9.	Raça/Cor (Auto-denominação): 1. Negro () 2. Mulato/Moreno () 3. Branco () 0. Outros ()		
10.	Cabelo (Textura): 1. Crespo () 2. Ondulado () 3. Liso ()		
11.	Cabelo (Cor): 1. Preto () 2. Castanho () 3. Ruivo () 4. Loiro ()		
12.	Nariz: 1. Achatado () 2. Médio () 3. Fino ()		
13.	Lábios (Forma): 1. Grossos () 2. Medianos () 3. Finos ()		
14.	Olhos (Cor): 1. Claro () 2. Escuro ()		

15.	Pele (Cor): 1. Preta () 2. Marrom () 3. Branca ()
16.	Cor (Classificação): 1. Negro () 2. Mulato () 5. Branco () 0. Outros (): _____

D – ANCESTRALIDADE REFERIDA (Caracterização étnica dos pais e avós do paciente)

17.	Pai 1. Negro () 2. Mulato () 3. Branco () 4. Índio () 5. Outro (): _____ 0. Não sabe informar ()
18.	Mãe 1. Negro () 2. Mulato () 3. Branco () 4. Índio () 5. Outro (): _____ 0. Não sabe informar ()
19.	Avó Materna 1. Negro () 2. Mulato () 3. Branco () 4. Índio () 5. Outro (): _____ 0. Não sabe informar ()
20.	Avô Materno 1. Negro () 2. Mulato () 3. Branco () 4. Índio () 5. Outro (): _____ 0. Não sabe informar ()
21.	Avó Paterna 1. Negro () 2. Mulato () 3. Branco () 4. Índio () 5. Outro (): _____ 0. Não sabe informar ()
22.	Avô Paterno 1. Negro () 2. Mulato () 3. Branco () 4. Índio () 5. Outro (): _____ 0. Não sabe informar ()

E – HISTÓRICO FAMILIAR

23.	Consangüinidade entre os pais: 1. Sim () 2. Não () 3. Não Sabe () Grau: _____
24.	Outros casos de surdez na família: 1. Sim () 2. Não () 3. Não Sabe () Quem: _____ Há quanto tempo: _____ Exposição a ruído: 1. Sim () 2. Não () Trauma acústico: 1. Sim () 2. Não () Duração da exposição: _____

	Ocupação: _____
	Obs: _____
25.	Casos de doenças genéticas/malformações na família: 1. Sim () 2. Não () 3. Não Sabe ()
	Obs.: _____
26.	Abortos: 1. Sim () 2. Não () 3. Não Sabe ()
	Obs.: _____

F – AVALIAÇÃO DO APARELHO AUDITIVO

27.	<p>Como reage ao som:</p> <p>1. Trovão (): procura () sorri () assusta-se () sem resposta () desconforto ()</p> <p>2. Avião (): procura () sorri () assusta-se () sem resposta () desconforto ()</p> <p>3. Bater da Porta (): procura () sorri () assusta-se () sem resposta () desconforto ()</p> <p>4. Campainha (): procura () sorri () assusta-se () sem resposta () desconforto ()</p> <p>5. Telefone (): procura () sorri () assusta-se () sem resposta () desconforto ()</p> <p>6. Buzina (): procura () sorri () assusta-se () sem resposta () desconforto ()</p> <p>7. Voz (): procura () sorri () assusta-se () sem resposta () desconforto ()</p> <p>8. Outros (): Quais: _____</p> <p>Como reage: procura () sorri () assusta-se () sem resposta () desconforto ()</p> <p>9. Reage a todos os sons (): procura () sorri () assusta-se () sem resposta () desconforto ()</p> <p>Obs.: _____</p>
-----	--

G – CARACTERIZAÇÃO DO TIPO DE SURDEZ

28.	1. Bilateral () 2. Unilateral ()
29.	1. Não-progressiva () 2. Progressiva ()
30.	1. Leve () 2. Moderada () 3. Severa () 4. Profunda ()

31.	1. Condutiva () 2. Neurosensorial () 3. Mista ()
32.	Etiologia: 1. Congênita () 2. Pós-natal () Idade de início: _____ Época em que percebeu o problema: _____

H – SINAIS EXTRA-AUDITIVOS

33.	Displasias ectodérmicas: 1. Sim () 2. Não ()
34.	Distúrbios: 1. Dentes () 2. Unhas () 3. Pêlos () 4. Cabelo () 5. Sudorese () Obs: _____ _____

I – GESTAÇÃO

35.	Pré-natal: 1. Sim () 2. Não () A partir de: _____
36.	Intercorrências: 1. Sim () 2. Não () Obs.: _____ _____
37.	Infecções maternas: 1. Sim () 2. Não () 1. CMV () 2. rubéola () 3. toxoplasmose () 4. sífilis () 5. herpes () Outras doenças: 1. Sim () 2. Não () Quais: _____
38.	Uso de drogas pela mãe: 1. Sim () 2. Não () Quais: _____
39.	Tentativa de aborto na gestação: 1. Sim () 2. Não () Obs.: _____ _____
40.	Agressões durante a gravidez: 1. Sim () 2. Não () Obs.: _____ _____

41.	Raio X na gestação: 1. Sim () 2. Não () Obs: _____ _____
42.	Internações médicas e cirúrgicas: 1. Sim () 2. Não () Quando: _____ Motivo: _____ Por quanto tempo: _____

J – PERÍODO PERINATAL

43.	Intercorrências: 1. Sim () 2. Não () Obs.: _____ _____
44.	Parto: 1. normal () 2. cesárea () 3. fórceps () Local de nascimento: 1. Hospital 2. Casa 3. Outros Quais: _____ Permanência no hospital: 1. Sim () 2. Não () Obs.: _____ _____
45.	Peso ao nascer: _____ O bebê demorou para chorar: 1. Sim () 2. Não () Obs.: _____ _____
46.	Sofrimento fetal: 1. Sim () 2. Não () Cronologia: 1. termo () 2. pré-termo () 3. pós-termo () Transfusão: 1. Sim () 2. Não () 1. Anoxia () 2. Icterícia () 3. Incompatibilidade Rh () 4. Malformação () Uso de medicamentos: 1. Sim () 2. Não () Quais: _____

K – PERÍODO PÓS-NATAL

NEUROPSICOMOTOR

47.	1. Normal () 2. com atraso ()
48.	Dificuldade de sucção: 1. Sim () 2. Não () Sustentação de pescoço: _____ Sentou: _____ Engatinhou: _____ Andou: _____ Balbucio: _____ Primeiras palavras: _____ Tempo de amamentação: _____
OUVIDO	
49.	Dor: 1. Sim () 2. Não () Quando: _____
50.	Secreção: 1. Sim () 2. Não () Quando: _____ 1. Mucóide () 2. Catarral () 3. Purulenta () 4. Outro ()
51.	Sangramento: 1. Sim () 2. Não () Quando: _____
52.	Zumbido: 1. Sim () 2. Não () Quando: _____
53.	Tontura: 1. Sim () 2. Não () Quando: _____
GERAL	
54.	Problema de saúde: 1. Sim () 2. Não () Qual: _____
55.	Uso de medicamentos: 1. Sim () 2. Não () Quais: _____

56.	<p>Internações: 1. Sim () 2. Não ()</p> <p>Quantas vezes: _____</p> <p>Quantos dias cada internamento: _____</p> <p>Obs.: _____</p>
57.	<p>Cirurgias: 1. Sim () 2. Não ()</p> <p>Quais: _____</p> <p>Quando: _____</p> <p>Obs.: _____</p>
58.	<p>1. Meningite () 2. Sarampo () 3. Caxumba () 4. IVAS ()</p>
59.	<p>Exposição a ruído: _____</p> <p>Obs: _____</p>
60.	<p>Acompanhamento especializado: _____</p>
61.	<p>Exames complementares realizados: _____</p>

L – OBSERVAÇÕES DO ENTREVISTADOR

62.	<p>_____</p> <p>_____</p> <p>_____</p> <p>_____</p> <p>_____</p>
-----	--

M – AVALIAÇÃO FÍSICA DA ORELHA

63.	<p>Achados em Pavilhão Auricular direito e esquerdo:</p> <p>1. Normal () 2. Microtia () 3. Implantação baixa () 4. Outros ()</p> <p>Quais: _____</p>
64.	<p>Achados em Conduto Auditivo Externo direito e esquerdo:</p> <p>1. Normal ()</p> <p>2. Estenose ()</p> <p>3. Ausência ()</p> <p>4. Otorréia (): _____</p> <p>5. Otorragia (): _____</p> <p>6. Corpo estranho (): _____</p> <p>7. Outros (): _____</p>
65.	<p>Achados na membrana timpânica direita e esquerda:</p> <p>1. Otoscopia normal ()</p> <p>2. Retração com hiperemia da membrana de Schrapnell ()</p> <p>3. Retração com hiperemia ao longo do cabo do martelo ()</p> <p>4. Retração com hiperemia da membrana de Schrapnell e ao longo do cabo do martelo ()</p> <p>5. Retração de toda membrana timpânica ()</p>

APÊNDICE B

Texto em formato de artigo para posterior submissão. As referências estão incluídas no tópico “REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS” desta dissertação.

HETEROGENEIDADE GENÉTICA DA SURDEZ EM CIDADE DO SERTÃO DA BAHIA - BRASIL

Gabrielle Novais Manzoli¹, Danniell Sann Dias da Silva², Roberta Melo Calvoso Paulon¹, Iza Cristina Salles de Castro⁵, Luciene da Cruz Fernandes^{2,4}, Kiyoko Abe-Sandes^{1, 2}, Angelina Xavier Acosta^{1, 3}

¹Laboratório Avançado de Saúde Pública (LASP), Centro de Pesquisa Gonçalo Moniz (CPqGM), Fundação Osvaldo Cruz (FIOCRUZ) – Bahia – Brasil

²Universidade do Estado da Bahia

³Faculdade de Medicina da Bahia da Universidade Federal da Bahia

⁴União Metropolitana de Educação e Cultura

⁵Universidade Federal da Bahia (UFBA)

Resumo

A surdez genética é heterogênea em sua base molecular, fenótipo e padrão de herança. Apesar desta heterogeneidade, mutações no gene *GJB2* são as principais causas de surdez genética, especialmente entre aquelas com padrão autossômico recessivo (MIM #220290). Neste trabalho investigou-se a origem genética da deficiência auditiva (DA) em pacientes do município de Monte Santo-BA. Oitenta e seis indivíduos com DA, correspondendo a 38 famílias foram avaliados, responderam questionário clínico-epidemiológico e forneceram dados individuais e familiares para análise genealógica. Foram pesquisadas mutações no gene *GJB2*, as deleções (*GJB6*-13S1830) e (*GJB6*-D13S1854), no gene *GJB6* e a mutação A1555G, no gene mitocondrial 12S rRNA. A investigação foi iniciada pela mutação c.35delG no gene *GJB2*, através de PCR-RFLP com a enzima *Bst*NI, as amostras que não apresentaram essa variante foram genotipadas por sequenciamento do éxon 2 do gene *GJB2*. Cerca de 55% dos indivíduos foram do sexo masculino, a idade média foi de 32 anos (variando de 2–70 anos), 33,9% dos indivíduos referiram-se como brancos, houve relato de consanguinidade entre os pais em 52,1% dos casos, DA familiar foi relatada em 92,8% dos casos, sendo considerada pré-lingual em 90,9% e bilateral em 98,7%. Oito diferentes mutações foram encontradas no gene *GJB2*. Cerca de 24% dos indivíduos, correspondendo a 8 famílias, foram homocigotos e 1 (1,2%) foi heterocigoto para mutação c.35delG. Em uma família com 9 afetados foi encontrada a mutação p.R75Q no gene *GJB2*, que causa DA herdada com padrão dominante, em heterocigose, correspondendo a 14,8% dos pacientes analisados. Encontraram-se ainda 4 mutações relatadas como polimorfismo sem efeito patogênico: p.V27I, p.M34T, c.-15C>T e c.*2C>T, a primeira foi encontrada em 5,8% e as três últimas em 1,2% dos indivíduos e as mutações c.-22-12C>T (5,8%) e p.K168R (1,2%) sem patogenicidade estabelecida. As mutações del (*GJB6*-D13S1830) e del (*GJB6*-D13S1854) no gene *GJB6*, A1555G no gene 12S rRNA não foram detectadas nos pacientes estudados nesta amostra. Foi confirmada etiologia genética em 35,8% dos pacientes e foi observada heterogeneidade alélica e do padrão de herança. Provavelmente mutações em outros genes e/ou fatores ambientais são responsáveis pelos outros casos de DA nessa população.

Palavras-chave: Surdez. Conexinas. Gene *GJB2*. c.35delG. p.R75Q. Gene *GJB6*.

INTRODUÇÃO

Dados da Organização Mundial da Saúde (OMS) mostram que cerca de 278 milhões de pessoas sofrem de deficiência auditiva (DA) incapacitante e que 70% dessas vivem em países de baixa renda (CZECHOWICZ *et al.*, 2010). O censo demográfico brasileiro de 2000 identificou neste período 5.735.099 indivíduos com DA no país. Desses, 32,5% (1.861.687) eram da região nordeste, sendo 477.270 (25,6% dos casos do nordeste) da Bahia. Segundo Petit (1996), a DA é o déficit sensorial mais comum, uma vez que em cada mil crianças uma nasce com DA ou se torna afetado com DA profunda ou grave antes que a linguagem seja adquirida, enquanto outras duas ou quatro crianças em cada mil se tornarão afetadas com DA antes da vida adulta.

A DA pode ser classificada com base em diversos critérios, incluindo a gravidade (leve ou de 20 a 39 dB, moderada ou de 40 a 69 dB, grave ou de 70 a 89 dB e profunda ou de 90 dB), idade de início (pré-lingual ou pós-lingual), e etiologia fisiológica (SCHRIJVER, 2004). Segundo Lopes-Filho (1997), o tipo de DA está relacionado ao segmento anatômico em que a lesão está situada, podendo assim ser classificada em *deficiência auditiva condutiva*, causada por alterações na orelha externa e/ou média; *deficiência auditiva neurosensorial*, causada por alterações na cóclea e/ou no nervo coclear; *deficiência auditiva mista*, causada por alterações nos condutivos e neurosensoriais da mesma orelha, e *deficiência auditiva central*, causada por alterações na via auditiva central.

A DA pode ocorrer devido a fatores ambientais, genéticos, ou decorrente da combinação destes dois fatores. A presbiacusia (DA relacionada com a idade) é, geralmente, considerada como multifatorial (MARRES, 1998). Em cerca de 60% a DA é hereditária, enquanto em 30% é adquirida e em 10% a etiologia não é identificada. Entre os casos de etiologia hereditária as formas não-sindrômicas e sindrômica são responsáveis por 70% e 30% dos casos, respectivamente (BITNER-GLINDZICZ, 2002; VAN LAER *et al.*, 2003). Até o momento mutações em cerca de 57 genes estão descritas como associadas com DA de origem genética (*Harvard Medical School Center for Hereditary Deafness*). Trinta e cinco genes foram descritos como associados com DA não-sindrômica cujo padrão de herança é recessivo, 22 associados com DA não-sindrômica cujo padrão de herança é autossômico dominante e 02 associados com DA não-sindrômica cujo padrão de herança é ligado ao X (VAN CAMP & SMITH, 2010). Apesar do grande número de genes e mutações associadas com DA genética mutações no *locus* 13q11-q12 são uma das principais causas de DA hereditária, especialmente nos tipos recessivos (KELSELL *et al.*, 1997; ESTIVILL *et al.*, 1998; KENNESON *et al.*, 2002; MIM #220290; BALLANA *et al.*, 2010). Os genes *GJB2* e *GJB6* são encontrados nesse *locus* (DEL CASTILLO *et al.*, 2002). O gene *GJB2* codifica a proteína denominada conexina 26 (Cx26) (LEE *et al.*, 1992) e o gene *GJB6* codifica a proteína denominada conexina 30 (Cx30), esta apresenta 76% de identidade com a proteína Cx26 (GRIFA *et al.*, 1999).

Até o momento cerca de 110 mutações foram descritas no gene *GJB2* como associadas com DA não-sindrômica. Noventa e uma são associadas com DA herdada com padrão autossômico recessivo, 9 com padrão autossômico dominante e 10 com padrão de herança ainda não definido (BALLANA *et al.*, 2010). Destas mutações a c.35delG, que compreende uma mutação de ponto com a deleção de uma base guanina na posição 35 da região codificante desse gene, é a mais comum entre os pacientes com DA não-sindrômica de padrão autossômico recessivo (PIATTO *et al.*, 2005). Segundo Pfeilsticker *et al.* (2004), cerca de 26 a 30% dos indivíduos homocigotos para a mutação c.35delG terão DA grave, enquanto outros 30 a 57% terão DA profunda. Um estudo realizado por Gasparini *et al.* (2000) mostra elevada frequência de portadores da mutação c.35delG na maioria dos países europeus. No Brasil, Piatto *et al.* (2005), avaliaram esta mesma mutação (c.35delG) em 223 recém-nascidos no estado de São Paulo e identificaram 2,24% dos recém-nascidos com DA dessa mutação. Em

outro rastreamento realizado em 620 neonatos também no estado de São Paulo foi determinada a frequência de 0,97% de portadores da mutação c.35delG (SARTORATO *et al.*, 2000). Nenhum estudo molecular em afetados com DA foi realizado na Bahia. No entanto, analisou-se a mutação c.35delG em amostra de afro-descendentes, não afetados com DA, da cidade de Salvador, que mostrou frequência de 1,0% de portadores da mutação c.35delG (OLIVEIRA *et al.*, 2004).

Quando nenhuma mutação é encontrada no gene Cx26 ou em pacientes heterozigotos para c.35delG, mutações no gene Cx30, pela sua estreita relação revelada para identidade entre as proteínas e proximidade de sua localização cromossômica com o gene *GJB2*, podem ser consideradas como responsáveis por DA. A Cx26 e Cx30 podem formar canais heterotópicos dos conexons tendo, na cóclea, a mesma distribuição celular. Portanto, as hipóteses fisiopatológicas, em relação às deficiências auditivas associadas à Cx26 e Cx30, são semelhantes. Uma deleção envolvendo o gene *GJB6* denominada del (*GJB6-D13S1830*) - deleção de 309pb - é, dentre as mutações que envolvem as conexinas, a segunda mutação mais frequente em indivíduos com DA genética não-sindrômica em algumas populações (DEL CASTILLO *et al.*, 2002). Segundo del Castillo *et al.* (2003), esta mutação é muito comum em afetados com DA não-sindrômica da Espanha, França, Israel, Reino Unido e Brasil. Indivíduos homozigotos para essa deleção, assim como os heterozigotos associados à ocorrência de um alelo mutante do gene *GJB2*, são afetados com DA hereditária grave a profunda (NAJMABADI, *et al.*, 2002).

Segundo del Castillo *et al.* (2005), outra deleção envolvendo o gene *GJB6*, denominada del (*GJB6-D13S1854*), correspondendo à deleção de 232pb, também é frequente em indivíduos com DA não-sindrômica de alguns países, como é o caso da Itália, Inglaterra e Brasil.

Mutações no DNA mitocondrial também têm sido associadas tanto com DA sindrômica quanto com DA não-sindrômica (FISCHEL-GHODSIAN, 1999; VAN CAMP & SMITH, 2000). O primeiro estudo para associar mutações mitocondriais e DA genética não-sindrômica identificou a mutação A1555G no gene mitocondrial 12S rRNA. Tal identificação permitiu classificar esta variação de DA como padrão de herança materno. Estudos realizados no Brasil também evidenciam a contribuição dessa mutação para os casos de DA genética não-sindrômica no país (FAGUNDES *et al.*, 2005).

O município de Monte Santo, localizado no sertão do estado da Bahia – Brasil, possui, aproximadamente, 56.938 habitantes (IBGE, 2000). Neste município observa-se grande número de casos de DA com recorrência familiar, levando a acreditar em possível causa genética dos casos de DA deste município.

O objetivo deste trabalho foi investigar etiologia genética da DA através da análise de mutações nos genes *GJB2*, *GJB6* e 12Sr RNA (mtDNA), entre os pacientes de Monte Santo-Bahia-Brasil.

MATERIAIS E MÉTODOS

Pacientes

Oitenta e quatro indivíduos com queixa de deficiência auditiva (DA) do município de Monte Santo-Bahia-Brasil foram incluídos no presente estudo entre os anos de 2008 e 2010. Esses pacientes correspondem a 38 famílias, 63 núcleos familiares (pai, mãe e filhos).

O recrutamento dos pacientes foi realizado com auxílio dos agentes comunitários de saúde (ACS) do município, bem como por informação direta do grupo de pesquisa durante viagens de campo. Os agentes comunitários foram orientados para informarem sobre o projeto aos familiares de indivíduos com DA, tanto na sede como nos povoados, principalmente aos que possuíam DA congênita e não desenvolveram a fala e/ou aos que possuíam DA recorrente

na família. Os pacientes foram triados através de avaliação otorrinolaringológica, para investigação de possíveis etiologias ambientais ou sinais e características clínicas associadas com DA, e por avaliação audiológica, para caracterizar a DA. Além dessas avaliações foram obtidos dados genealógicos e aplicado questionário para a obtenção de dados demográficos, história familiar e clínica de cada paciente.

Foram considerados como critério de inclusão: 1) Paciente com queixa de DA sem associação aparente com síndrome; 2) Pacientes naturais ou que residissem em Monte Santo-BA; 3) Termo de consentimento livre e esclarecido assinado pelo paciente ou responsável. Foram considerados como critério de exclusão: 1) Pacientes com sinais ou características clínicas que pudessem estar associadas com DA sindrômica; 2) Pacientes que não residissem em Monte Santo-BA; 3) Consentimento informado não assinado pelo paciente ou responsável.

Este trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Centro de Pesquisa Gonçalo Moniz da Fundação Oswaldo Cruz (CPqGM/FIOCRUZ) através do parecer N° 182/2008. Todos os responsáveis pelos pacientes assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE).

Para a caracterização demográfica e clínica dos pacientes, bem como, para comparação entre o grupo com mutação e o grupo sem mutação foi considerado o total de indivíduos incluídos no estudo. Para cálculo de frequência genotípica e alélica utilizou-se também o total de indivíduos por núcleo familiar (apenas um indivíduo com DA por núcleo) e total de indivíduos por família (um paciente com mutação por família).

Análise molecular

O DNA foi extraído dos leucócitos obtidos das amostras de sangue periférico por técnicas de extração salina adaptadas de LAHIRI & NURNBERGER (1991) ou MILLER *et al.* (1988) e estocado a -20°C no Laboratório Avançado de Saúde Pública (LASP)/CPqGM/FIOCRUZ-BA.

Investigou-se mutações no gene *GJB2*, as deleções (*GJB6-13S1830*) e (*GJB6-D13S1854*), no gene *GJB6* e a mutação A1555G, no gene mitocondrial 12Sr RNA. A investigação foi iniciada pela mutação c.35delG no gene *GJB2*, através de PCR-RFLP com a enzima *Bst*NI, as amostras que não apresentaram essa variante foram avaliadas para as demais mutações e em seguida, sequenciou-se o éxon 2 do gene *GJB2*.

Para análise da mutação c.35delG utilizou-se *Primer* F: 5' – TCTTTTCCAGAGCAAACCGC- 3' e *Primer* R: 5' – GCTGGTGGAGTGTTTGTTCACACCCGC – 3' (SCOTT *et al.*, 1998; WILCOX *et al.*, 2000). Para mutações del (*GJB6-13S1830*) e del (*GJB6-D13S1854*) realizou-se ensaio multiplex segundo del Castillo *et al.* (2005), para mutação A1555G no gene 12Sr RNA: *Primer* F 5'– AGAAATGGGCTACATTTTCTACCC-3' e *Primer* R – 5'- GTTCGTCCAAGTGCACCTTCCA-3' (TÓTH, 2003) e para análise do éxon 2 do gene *GJB2* utilizou-se *primer* desenhados e condições de reação cedidos pelo Laboratório de Genética Humana do Centro de Biologia Molecular e Engenharia Genética (CBMEG) – UNICAMP.

Utilizou-se nomenclatura segundo den Dunnen & Antonarakis (2000) para descrever mutações encontradas neste estudo. Como referência genômica utilizaram-se as sequências NG_008358.1 e NT_024524.14, como referência da região codificante utilizou-se a sequência NM_004004.5 e como referência protéica utilizou-se a sequência NP_003995.2, todas armazenadas no NCBI. Utilizou-se na primeira citação das mutações a nomenclatura com base na sequência codificante (para a mutação correspondente a deleção de uma guanina entre os nucleotídeos 30 e 35 da região codificante do éxon 2 e para as substituições nas regiões

intrônicas, 5`UTR e 3`UTR) ou na seqüência protéica seguida, entre parênteses, pela nomenclatura utilizada frequentemente nas publicações da área. Nas citações seguintes utilizou-se apenas a nomenclatura proposta por den Dunnen & Antonarakis (2000) baseada na seqüência da região codificante ou protéica como descrito anteriormente.

Análise estatística

Para análise das freqüências alélicas e genotípicas considerou-se apenas um indivíduo com mutação por núcleo familiar. Essas freqüências foram calculadas através de contagem direta dos alelos. O teste de X^2 ou o teste exato de Fisher foi utilizado para testar as diferenças entre os grupos.

RESULTADOS

Caracterização da Amostra

Dos pacientes incluídos no estudo 54,8% foram do sexo masculino. A autodenominação de cor/raça branca foi relatada em 33,9% dos casos enquanto 66,1% autodenominaram-se mulatos. A média de idade dos participantes foi de 32 anos (variando de 2 – 70 anos), estando a maioria (27,4%) na faixa dos 40 anos (31 – 40 anos).

A partir das genealogias obtidas, observou-se total de 1.585 indivíduos, desse total 166 possuem DA, porém 82, dos quais 70 também residem no município de Monte Santo, foram referidos por familiares, mas não foram incluídos no presente estudo, pois não foram encaminhados ao projeto, bem como, não foram identificados durante viagens de campo.

Houve relato de outros casos de DA em 86,5% das famílias para as quais essa informação estava disponível. Uma família não soube relatar se havia outro caso de DA na família e, portanto, não foi considerada para esse cálculo. Em 5 famílias (13,5%) não houve relato de recorrência da DA.

Em relação à caracterização da DA observou-se que a DA ocorreu bilateralmente em 98,7% dos pacientes. Os pacientes avaliados audiologicamente possuíam DA com padrão sugestivo de DA neurossensorial. A maioria não possuía alterações nas orelhas externa e média, 89,4%, e possuíam DA profunda, 83,3%. Sendo que 90,9% dos casos foram relatados como DA pré-lingual. Neste grupo a idade variou de 6 a 70 anos (média 33 anos). A idade média de percepção da DA entre os casos relatados como pré-linguais foi de 30,6 meses (2 anos e 6 meses) e variou de 1 mês a 12 anos. Entre os 6 casos pós-linguais a idade variou de 31 a 62 anos (média de 44 anos). Nesse grupo em relação aos possíveis fatores ambientes associados com DA observou-se relato de exposição a ruído em 16,7% e de doenças infecciosas (rubéola e sarampo) em todos os casos pós-linguais, sendo que em 16,7% desses houve relato de meningite e em 83,3% houve relato de sarampo. Apenas 18,6% dos pacientes tiveram acompanhamento médico especializado anterior ao período de inclusão no projeto. Os casos de DA incluídos neste trabalho possuem padrão de herança predominantemente autossômico recessivo. A única exceção foi o caso da família N° 9 (Figura 1) onde se observou DA herdada com padrão autossômico dominante.

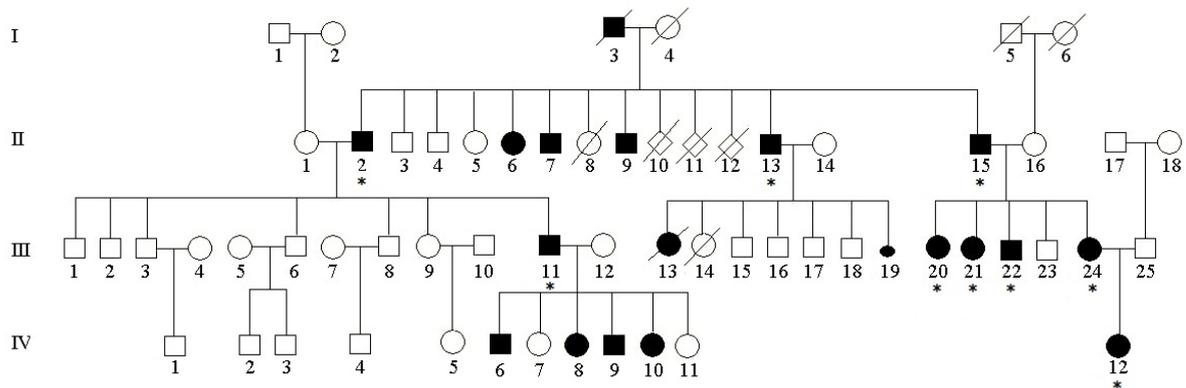


FIGURA 1: Heredograma da família N° 10 com indivíduos incluídos no estudo indicados por asterisco.

Investigação molecular

A mutação c.35delG no gene *GJB2* foi encontrada em 25,0% pacientes, correspondendo a 9 famílias. Em 23,8% dos indivíduos, 8 famílias, encontrou-se genótipo homozigoto para mutação c.35delG enquanto em 1,2% encontrou-se genótipo heterozigoto (Tabela 1).

Para cálculo da frequência alélica, como indivíduos aparentados foram incluídos no estudo e os artigos da área normalmente incluem apenas indivíduos não aparentados, utilizou-se o número de núcleo familiar que corresponde a 63 indivíduos e 126 alelos. Desta forma, a frequência do alelo com a mutação c.35delG, entre os afetados, foi de 23,0% (Tabela 2).

As deleções (*GJB6*-13S1830) e (*GJB6*-D13S1854), no gene *GJB6*, e a mutação A1555G, no gene mitocondrial 12S rRNA, não foram observadas nas amostras do presente estudo.

Além da mutação c.35delG, encontrou-se no éxon 2 do gene *GJB2* outras sete diferentes mutações. Em uma família com 9 afetados encontrou-se a mutação p.R75Q (R75Q ou Arg75Gln) em heterozigose correspondendo a 14,8% dos afetados analisados. Encontrou-se ainda 23,0% dos indivíduos com outras mutações no éxon 2 do gene *GJB2*. Quatro delas - c.-15C>T (-15C>T), p.V27I (V27I ou p.Val27Ile), p.M34T (M34T ou p.Met34Thr) e c.*1C>T (682C>T) – são descritas como polimorfismos (BALLANA *et al.*, 2010) e as mutação c.-22-12C>T (IVS1-12C>T) e p.K168R (K168R ou p.Lys168Arg) cuja patogenicidade ainda não está definida (ROUX *et al.*, 2004; BALLANA *et al.*, 2010; BATISSOCO *et al.*, 2009; DINH *et al.*, 2009). Informações sobre algumas dessas mutações estão disponíveis no banco de SNP do NCBI.

Com a análise do éxon 2 do gene *GJB2* observou-se 11 diferentes genótipos (Tabela 1). Dois desses, c.35delG em homozigose e p.R75Q em heterozigose, conhecidamente associados com DA genética, confirmando-se, assim, etiologia genética da DA em 35,8% dos indivíduos analisados.

Os alelos mutantes mais frequentes na amostra foram c.35delG com 24,4% e p.R75Q com 7,4%, seguidos dos alelos c.-22-12C>T e p.V27I, ambos com frequência igual a 4,1%. Os demais alelos tiveram cada um frequência alélica igual a 0,8% (Tabela 2).

TABELA 1: Descrição dos genótipos com respectivos números de indivíduos com DA genotipados e frequências (%) na amostra.

Genótipo	N* Disponível para análise	Frequência dos genótipos (%)
Patogênico		
c.35delG / c.35delG	84	23,8
p.R75Q / +	61	14,8
Não Patogênico		
+ / +	81	53,1
c.-22-12C>T / +	61	6,6
c.-22-12C>T / p.V27I	61	1,6
c.-15 C>T / +	61	1,6
c.35delG / +	84	1,2
p.V27I / +	61	6,6
p.M34T / +	61	1,6
p.K168R / +	61	1,6
c.*1C>T / +	61	1,6

+ : Alelo selvagem; * O número de pacientes variou para os diferentes genótipos, pois algumas amostras não foram analisadas por seqüenciamento.

TABELA 2: Frequências alélicas das mutações analisadas em indivíduos com DA de Monte Santo-BA.

Mutação / Gene	Frequência do alelo mutante (%)
Patogênica	
c.35delG / <i>GJB2</i>	24,4
p.R75Q / <i>GJB2</i>	7,4
del (<i>GJB6</i> -13S1830) / <i>GJB6</i>	0,0
del (<i>GJB6</i> -D13S1854) / <i>GJB6</i>	0,0
A1555G / 12SrRNA	0,0
Não patogênica	
c.-15C>T / <i>GJB2</i>	0,8
p.V27I / <i>GJB2</i>	4,1
c.*1C>T ou 682C>T / <i>GJB2</i>	0,8
p.M34T / <i>GJB2</i>	0,8
Patogenicidade não estabelecida	
c.-22-12C>T / <i>GJB2</i>	4,1
p.K168R / <i>GJB2</i>	0,8

DISCUSSÃO

Mutações no *locus* DFBN1, principalmente no gene *GJB2*, que codifica a Cx26, são implicadas como uma das principais causas de DA hereditária, especialmente nos tipos recessivos (KELSELL *et al.*, 1997; ESTIVILL *et al.*, 1998; KENNESON *et al.*, 2002; MIM #220290; BALLANA *et al.*, 2010). A DA causada por mutações nesse *locus*, é geralmente pré-lingual (JANECKE *et al.*, 2002). No presente trabalho apesar de não terem sido selecionados apenas casos de DA pré-lingual, a maior parte dos casos 90,9% foi de DA relatada como pré-lingual. Foram investigadas mutações nesse *locus*: mutação c.35delG e outras mutações que ocorrem no éxon 2 do gene *GJB2*, bem como duas mutações que envolvem o gene *GJB6*, del (*GJB6-D13S1830*) e del (*GJB6-D13S1854*). Apesar de não ter sido identificada evidência de DA com padrão de herança materna entre as famílias do presente estudo, foi incluída investigação da mutação A1555G, no gene 12S rRNA. Abreu-Silva *et al.* (2006) ao analisar amostras de pacientes de São Paulo-Brasil observou a presença dessa em um caso cujo padrão de herança era sugestivo de herança autossômica recessiva e em um caso de DA isolada.

A amostra estudada foi composta por casos de ocorrência esporádica e familiar, pré-linguais e pós-linguais, com ou sem relato de doenças infecciosas associadas com DA e foi composta também por indivíduos de diferentes faixas etárias. Não foram incluídos pacientes com DA associada a síndromes. Neste estudo 79,5% dos casos relataram algum tipo de doença infecciosa como meningite, caxumba, sarampo, infecções das vias aéreas superiores (IVAS), catapora ou rubéola. Batissoco *et al.* (2009), também incluíram os casos com fatores ambientais na amostra estudada e relatam que, apesar da diferença no critério de seleção da amostra, seus resultados não diferiram dos resultados do trabalho realizado por Oliveira *et al.* (2007). Relato de algum tipo de doença infecciosa que pode estar associada com causa de DA foi observada em 66,7% dos pacientes com mutação c.35delG, desta forma, demonstramos que relato de doenças infecciosas não deve ser critério para exclusão de casos na investigação genética como causa de DA.

Os estudos que investigam a etiologia genética da DA costumam incluir nas suas amostras apenas indivíduos não aparentados (MURGIA *et al.*, 1999; ROUX *et al.*, 2004; XIAO & XIE, 2004; MARLIN *et al.*, 2005; MEDICA *et al.*, 2005; OLIVEIRA *et al.*, 2007; BAYSAL *et al.*, 2008; BONYADI *et al.*, 2009; BATASSOCO *et al.*, 2009; DAI *et al.*, 2009; AL-QAHTANI *et al.*, 2010). Neste estudo foram incluídos indivíduos aparentados bem como indivíduos não aparentados, desta forma, para fins de comparação com demais estudos, será considerado apenas um indivíduo por núcleo familiar, sendo um total de 63 indivíduos e 126 alelos. Desses indivíduos considerados para análise genotípica 14 possuíam genótipo homozigoto para mutação c.35delG e não foram sequenciados para verificar a presença de outras mutações no éxon 2 do gene *GJB2*, além disso 2 no caso de dois indivíduos essa análise também não foi realizada devido à qualidade das amostras. Sendo assim para os cálculos referentes às mutações identificadas por sequenciamento foram considerados 47 indivíduos correspondendo a 94 alelos.

Em relação à mutação c.35delG os resultados do presente estudo mostraram que a frequência de indivíduos homozigotos foi igual a 22,2% e assemelha-se ao encontrado em estudo realizado na Croácia, onde Medica *et al.* (2005) observaram 25,4% de afetados, com DA não-sindrômica pré-lingual, homozigotos para mutação c.35delG. No entanto, foi menor que o observado em estudo realizado na Itália, onde Murgia *et al.* (1999) encontrou esse genótipo em 30,2% dos afetados, e maior que estudos realizados no Brasil bem como em outros países/localidades como Irã, França, República de Altai, Turquia, China, Reino da Arábia Saudita e Itália, nesse caso em estudo realizado no norte do país (ROUX *et al.*, 2004; XIAO & XIE, 2004; POSUKH *et al.*, 2005; OLIVEIRA *et al.*, 2007; BAYSAL *et al.*, 2008;

BATISSOCO et al., 2009; BONYADI et al., 2009; DAI et al., 2009; PRIMIGNANI et al., 2009; AL-QAHTANI et al., 2010) (Tabela 3).

A frequência do alelo c.35delG encontrada no presente trabalho (23,0%) foi semelhante à encontrada em estudo realizado no Brasil (20,3%) e no Irã (18,2%), menor que a encontrada em estudo realizado na Croácia (29,4%) e maior que a encontrada em outro estudo brasileiro (9,8%) e em estudos realizados em outros países como França (11,9%) e Turquia (6,8%) (ROUX et al.; 2004; MEDICA et al., 2005; OLIVEIRA et al., 2007; BAYSAL et al., 2008; BATISSOCO et al., 2009; BONYADI et al., 2009).

TABELA 3: Frequência do genótipo homozigoto para mutação c.35delG em indivíduos com DA em diferentes populações

Localidade	Frequência Genotípica HMM(%)	Referência
Monte Santo - BA/Brasil	23,0	Presente estudo
São Paulo - SP/Brasil	7,3	BATISSOCO <i>et al.</i> , 2009
Brasil	14,0	OLIVEIRA <i>et al.</i> , 2007
Brasil	3,0	OLIVEIRA <i>et al.</i> , 2007
França	6,3	ROUX <i>et al.</i> , 2004
Itália	30,2	MURGIA <i>et al.</i> , 1999
Itália (norte)	16,9	PRIMIGNANI <i>et al.</i> , 2009
Croácia	25,4	MEDICA <i>et al.</i> , 2005
República de Altai (todos russos)	9,2	POSUKH <i>et al.</i> , 2005
Turquia	5,3	BAYSAL <i>et al.</i> , 2008
Irã (noroeste; povo turco do Azerbaijão)	15,3	BONYADI <i>et al.</i> , 2009
China	0,8	XIAO & XIE, 2004
China	0,1	DAI <i>et al.</i> , 2009
Reino da Arábia Saudita	6,4	AL-QAHTANI <i>et al.</i> , 2010

*Indivíduos com a mutação e que não fazem parte da mesma família; **Não descreveu se os indivíduos incluídos no respectivo estudo são relacionados.

A frequência alélica encontrada no presente trabalho pode indicar certa homogeneidade dos casos de DA genética no município de Monte Santo-BA, com destaque para elevada recorrência da DA nas famílias com a mutação c.35delG.

A diferença entre a frequência de homozigotos para mutação c.35delG do estudo realizado na Itália, onde a frequência de homozigotos com a mutação foi maior que a encontrada neste trabalho, e dos estudos realizados em outras localidades como São Paulo-Brasil, França, Milwaukee-WI/Estados Unidos, República de Altai (todos russos), Turquia, China e Reino da Arábia Saudita, onde a frequência foi menor que a encontrada neste estudo, poder ter ocorrido devido à composição genética da população. Essa diferença poderia ser explicada por efeito fundador. Van Laer et al. (2001) encontraram evidências de que a alta frequência do alelo c.35delG no gene GJB2 na população branca é resultado de efeito fundador. Gasparini et al. (2000) e sugerem origem única para mutação c.35delG na Europa ou no Médio Oriente.

Estudos da população de Portugal, da Itália e da Espanha, três populações que contribuíram significativamente para a miscigenação da Bahia, mostraram alto índice de alelos com a mutação c.35delG. Em Portugal, a frequência de portadores desta mutação em

amostra populacional foi de 1/45 (4/179), na Espanha foi de 1/40 (5/200) e na Itália de 1/32 (8/255) (GASPARINI et al., 2000). A elevada frequência do alelo c.35delG nos estudos da Itália e da Croácia poderia ser explicada por efeito fundador com o alelo introduzido e se mantendo nesses lugares há muitas gerações, enquanto, a baixa frequência desse alelo nas amostras dos estudos realizados em localidade como Milwaukee-WI/Estados Unidos, República de Altai (todos russos), Turquia, Irã (turcos do Azerbaijão), China e Reino da Arábia Saudita pode representar a introdução recente desse alelo na população ou a sub-estruturação da população dessas localidades através de casamentos preferenciais entre nativos.

Provavelmente a mutação c.35delG também foi introduzida recentemente em Monte Santo-BA, no entanto, a frequência dessa mutação pode ser maior que a encontrada nesses países pela homogeneidade da população de Monte Santo ocasionada por endocruzamento e endogamia. Na amostra do presente estudo observou-se relato de consanguinidade entre os pais de 52,1% dos pacientes. Além disso, relatos de casamentos consanguíneos em Monte Santo têm sido observados em outros trabalhos do grupo (AMORIM et al., 2007).

A predominância de pacientes classificados como brancos com genótipo homozigoto para a mutação c.35delG encontrada neste trabalho era esperada, pois segundo Green et al. (1999), esta mutação é mais freqüente em caucasianos. Desta forma, a mutação c.35delG pode ocorrer na região de Monte Santo devido a efeito fundador de colonizadores de origem européia ou de seus descendentes. No entanto, estudo de ancestralidade genômica é necessário para verificar a contribuição da ancestralidade européia nos pacientes com c.35delG desse município.

Heterogeneidade genética em pacientes com DA genética com padrão autossômico recessivo provenientes de família com casos de consanguinidade foi observado por Lezirovitz et al. (2008). No presente trabalho também se encontrou casos familiares (família N° 17 e N° 41) de DA com heterogeneidade. Nos casos do presente estudo encontrou-se a mutação c.35delG em alguns indivíduos, mas não se encontrou a mutação responsável pela DA nos outros integrantes dessas famílias. Como observado no presente estudo, onde 35,8% dos 81 afetados análise molecular completa possui DA genética causada por mutações no éxon 2 do gene GJB2, a DA no município de Monte Santo é heterogênea. Considerando o elevado número (92,8%) de relato de DA familiar, provavelmente os demais casos de DA nesse município podem ser genéticos e possuir mutações em outros genes. A heterogeneidade da DA nas famílias N° 17 e N° 41 pode ser explicada por endocruzamento da população e manutenção dos alelos com mutações associadas com DA - mutação c.35delG e outra(s) possível(eis) mutação(ões) não identificada(s) no presente estudo - por endogamia nessas famílias durante muitas gerações.

As mutações del (GJB6-D13S1830) e del (GJB6-D13S1854) no gene GJB6 e a mutação mitocondrial A1555G, no gene 12S rRNA não foram encontradas no presente trabalho diferentemente de outros estudos brasileiros. No Brasil Piatto et al. (2004) encontraram quatro heterozigotos para a mutação c.35delG sendo a mutação del (GJB6-D13S1830) detectada em um destes heterozigotos, representando 25% dos heterozigotos para a mutação c.35delG, Batisso et al. (2009) encontraram a del (GJB6-D13S1830) em heterozigose com a mutação c.35delG em 3 das 300 amostras analisadas e Oliveira et al. (2007) ao analisar 645 indivíduos com DA encontram cada uma das mutações del (GJB6-D13S1830) e del (GJB6-D13S1854) em cinco amostras. Essas duas deleções são encontradas no locus DFNB1 e, como citado anteriormente, a DA causada por mutações nesse locus, é geralmente pré-lingual (OLIVEIRA et al., 2007). Nas amostras do presente estudo 90,9% dos casos foram relatados como pré-linguais e, portanto, essas mutações poderiam estar contribuindo com os casos de DA em Monte Santo-BA.

Em relação à mutação A1555G, no gene 12S rRNA, apesar dessa mutação não ter sido encontrada nas amostras do presente estudo, foi encontrada em outras amostras brasileiras. Abreu-Silva et al. (2006) ao analisar amostras de pacientes de São Paulo-Brasil observou a presença da mutação A1555G, no gene 12Sr RNA, em um caso cujo padrão de herança era sugestivo de herança autossômica recessiva. Oliveira et al. (2007) ao analisar 645 amostras de indivíduos com DA de origem brasileira encontraram essa mutação em amostras de três indivíduos com DA profunda e relato de tratamento com aminoglicosídeos. Apesar dos indivíduos avaliados por Oliveira et al. (2007) possuírem essa mutação associada com relato de tratamento com aminoglicosídeos, alguns estudos relatam DA causada por essa mutação em casos sem essa exposição, ressaltando que nesses pacientes essa mutação conduz a um fenótipo que varia de DA severa a moderada ou até mesmo a audição aparentemente normal (PREZANT et al., 1993; ESTIVILL et al., 1998).

A mutação p.R75Q encontrada na família N° 10 é responsável pela DA cujo padrão de herança é autossômico dominante. No presente estudo, o padrão autossômico foi corroborado pelo fato da família não relatar consanguinidade. Essa mutação também tem sido descrita em casos de DA associados com queratodermia palmoplantar (UYGUNER et al., 2002; FELDMANN et al., 2005), sendo relatada em uma família da Turquia (UYGUNER et al., 2002), duas famílias francesas (FELDMANN et al., 2005), uma família de origem russa (POSUKH et al., 2005) e em um paciente dos 207 analisados por Oliveira et al. (2007) no Brasil. Os pacientes incluídos no presente estudo precisarão ser melhor avaliados clinicamente para confirmar se a DA neste caso é isolada ou sindrômica.

Informações sobre algumas das mutações encontradas na análise do éxon 2 do gene GJB2 estão disponíveis no banco de SNP do NCBI (Quadro 3). Entre as informações encontradas nesse banco estão descrições das frequências genotípica e alélica para as mutações c.-22-12C>T, c.-15C>T, p.V27I e p.M34T (Tabela 9) em diferentes populações, estas informações demonstram que estas mutações são relativamente frequentes em diferentes populações. As mutações p.V27I, p.M34T, c.-15C>T e c.*2C>T (682C>T) no gene GJB2, descritas como não patogênicas e como polimorfismos, também foram encontradas em outros trabalhos realizados com pacientes com DA do Brasil, dos Estados Unidos, da França, em afro-americanos e hispano-caribenhos, iranianos, chineses (CHALESHTORI et al., 2004; ERBE et al., 2004; ROUX et al., 2004; OLIVEIRA et al., 2007; SAMANICH et al., 2007; BATISSOCO et al., 2009; BONYADI et al., 2009; DAI et al., 2009).

A mutação c.-22-12C>T (IVS1-12C>T) foi descrita por Roux et al. (2004) como mutação nova com efeito patogênico desconhecido, no entanto, relataram que segundo programas de predição de splicing esta mutação deveria ser silenciosa. Eles destacam também que esta mutação foi encontrada em homozigose em um paciente de Guadalupe que possuía também a mutação -34T>C no gene GJB2 em um dos cromossomos. Esta mutação está descrita no “The Connexin-Deafness Homepage” (BALLANA et al., 2010) como mutação cujo efeito patogênico é desconhecido. No presente trabalho a mutação c.-22-12C>T foi encontrada em 5 pacientes com fenótipos diferentes. Um paciente foi avaliado por otorrinolaringologista e apresentou perfuração da membrana timpânica (indício de DA ambiental), estabelece comunicação através da linguagem oral e é heterozigoto composto para a mutação p.V27I. Outros 3 pacientes conseguem escutar sons de voz, quando alta ou próximo a orelha, e 2 relataram dor na orelha.

A mutação p.K168R foi descrita recentemente e seu efeito em relação à patogenicidade ainda não está definido (OLIVEIRA et al., 2007; BATISSOCO et al., 2009). Batissoco et al. (2009) ao analisarem 300 indivíduos com DA aparentemente não-sindrômica encontrou 2 indivíduos heterozigotos para esta mutação. Analisou ainda 50 amostras de brasileiros descendentes de europeus e 50 amostras de afro-brasileiros, não havendo presença

da mutação. A análise em software específico para determinar o possível efeito desta mutação no fenótipo mostrou que pode se tratar de uma variante não patogênica.

Neste trabalho encontrou-se elevado número (79,5%) de pacientes com relatos de doenças infecciosas associadas com DA, no entanto, não foram coletados dados de indivíduos sem DA e não foi possível verificar o quanto o relato dessas doenças estão associadas ou não com a DA em Monte Santo-BA. Portanto, não se pode descartar que essas doenças estejam associadas com alguns dos casos de DA em Monte Santo. Apesar do relato de fatores ambientais não se pode desconsiderar que a DA na amostra do presente trabalho seja predominantemente de origem genética uma vez que 92,8% dos casos foram relatados como casos familiares, diferente do que foi encontrado por Silva et al. (2006). No entanto, pelo observado apenas 35,8% dos casos de DA da amostra do presente estudo são causados por mutações no éxon 2 do gene *GJB2*. Desta forma, possivelmente, mutações em outros genes estão contribuindo na determinação da DA em Monte Santo-BA.

O presente estudo reforça também a importância destacada por estudos brasileiros da investigação de mutações no gene *GJB2* para confirmação da etiologia da DA (OLIVEIRA *et al.*, 2002; PIATTO *et al.*, 2004; OLIVEIRA *et al.*, 2007; BATISSOCO *et al.*, 2009; CORDEIRO-SILVA *et al.*, 2010).

CONCLUSÃO

A DA encontrada na amostra do presente estudo foi predominantemente familiar e com padrão de herança autossômico recessivo. No entanto, uma família exibiu padrão autossômico dominante, reforçando a heterogeneidade genética da surdez. Duas mutações, c.35delG e p.R75Q, no éxon 2 do gene *GJB2* contribuíram com a maioria dos casos de DA na amostra estudada. Outras seis mutações no éxon 2 do gene *GJB2* foram encontradas na amostra, sendo quatro conhecidas como não patogênicas e duas cuja patogenicidade é desconhecida. As mutações del (*GJB6*-13S1830) e del (*GJB6*-D13S1854) no gene *GJB6*, A1555G no gene 12S rRNA não foram detectadas nos pacientes estudados nesta amostra. No grupo com mutação c.35delG observou-se maior número de pacientes que se autodenomiram e/ou foram classificados fenotipicamente como brancos do que o observado no grupo sem essa mutação. A etiologia genética contribuiu de forma importante, o que ficou evidenciado pelo número de afetados com mutações patogênicas no gene *GJB2* e número de relato de deficiência auditiva familiar.

AGRADECIMENTOS

Nós agradecemos a colaboração dos pacientes e seus familiares. A Dr^a Edi Lúcia Sartorato e sua equipe pelos controles para análise das deleções no gene *GJB6* e por disponibilizar primers e protocolo para sequenciamento do éxon 2 do gene *GJB2*. Agradecemos ao grupo INAGEMP, ao Dr. Luciano Kalabric Silva (CPqGM-Fiocruz/BA) e Dr^a Regina Célia Mingroni Netto (USP) pelas sugestões. Agradecemos também a equipe da Clínica Escola de Fonoaudiologia da UNIME pela avaliação clínica dos pacientes.

Este trabalho foi apoiado pelo CPqGM/Fiocruz-BA, pela FAPESB e pelo CNPq.

Endereço para correspondência: Angelina Xavier Acosta, Laboratório Avançado de Saúde Pública (LASP)/CPqGM/Fiocruz-BA, Rua Waldemar Falcão, 121, Candeal – Salvador-BA, Brasil, CEP: 40296-710. E-mail: axacosta@hotmail.com.

APÊNDICE C

Descrição dos casos de DA por famílias incluídas no estudo.

Família	Nº pacientes incluídos neste estudo	Nº pacientes referidos Não incluídos neste estudo	Total de indivíduos com DA
01	07	06	13
02	01	10	11
03	02	03	05
04	04	03	07
05	05	03	08
06	07	06	13
09	05	00	05
10	10	08	18
12	01	02	03
13	01	02	03
14	02	02	04
15	01	01	02
16	01	01	02
17	06	04	10
18	02	03	05
19	01	01	02
20	01	00	01
21	03	00	03
22	01	02	03
23	02	01	03
24	02	00	02
25	01	00	01
26	01	00	01
27	01	01	02
28	02	00	02

Continuação: APÊNDICE C - Descrição dos casos de DA por famílias incluídas no estudo

Família	Nº pacientes incluídos neste estudo	Nº pacientes referidos Não incluídos neste estudo	Total de indivíduos com DA
29	01	00	01
30	01	01	02
32	01	01	02
33	01	02	03
34	01	00	01
39	01	01	02
41	04	00	04
42	01	04	05
44	01	02	03
45	01	02	03
46	01	07	08
47	01	00	01
48	01	03	04
Total	86	82	168

APÊNDICE D

Descrição dos indivíduos com e sem DA integrantes das famílias incluídas neste estudo que residem em outras cidades da Bahia ou de outros estados.

Famílias	Nº indivíduos com DA em outras cidades	Nº familiares em outras cidades baianas	Nº familiares em outros estados brasileiros
01	04 ^a	01 ^c	38 ^a
03	00	01 ^d	00
04	03 ^a	10 ^e	29 ^a
05	01 ^a	15 ^f	40 ^o
06	00	3 ^g	22 ^p
09	00	00	03 ^a
10	00	04 ^h	08 ^q
12	02 ^a	00	13 ^a
14	00	01 ^d	06 ^a
15	01 ^b	01 ^b	00
17	01 ^a	11 ⁱ	07 ^r
19	00	04 ^j	03 ^a
20	00	01 ^k	02 ^a
21	00	12 ^l	00
23	00	00	05 ^a
25	00	00	01 ^a
27	00	00	05 ^s
29	00	00	02 ^a
41	00	01 ^m	02 ^a
42	00	01 ⁿ	14 ^a
44	00	00	02 ^a

^aSão Paulo; ^bTucano; ^cEuclides da Cunha; ^dCansanção; ^e01 de Senhor do Bonfim e 9 de Cansanção; ^f01 de Barreiras, 01 de Cansanção, 01 de Castro Alves, 10 de Canudos, 01 de Uauá e 01 de Valente; ^g02 de Uauá e 01 de Salvador; ^h02 de Cansanção, 01 de Euclides da Cunha e 01 de Angico; ⁱ09 de Euclides da Cunha, 01 de Cansanção, 01 de Senhor do Bonfim; ^j01 de Senhor do Bonfim; 01 de Canudos, 01 de Luiz Eduardo Magalhães e 01 de Serrinha; ^k01 de Salvador; ^l12 de Jitirama; ^m01 de Feira de Santana; ⁿ02 de Paraná, 01 de Rio de Janeiro; 36 de São Paulo e 01 de Mato Grosso; ^o04 de Pernambuco e 18 de São Paulo; ^p02 de Paraíba e 06 de São Paulo; ^q01 de Rio de Janeiro e 06 de São Paulo.

APÊNDICE E

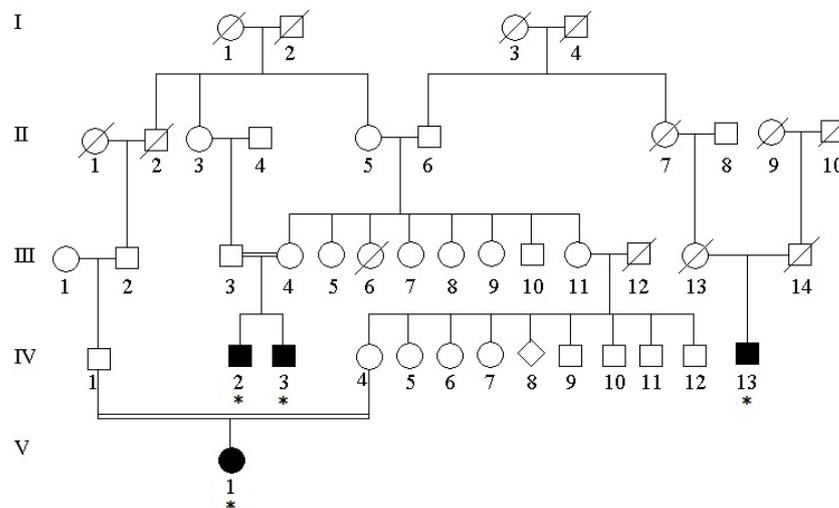


FIGURA 10: Heredograma da família N° 41 com os indivíduos incluídos no estudo indicados por asterisco.

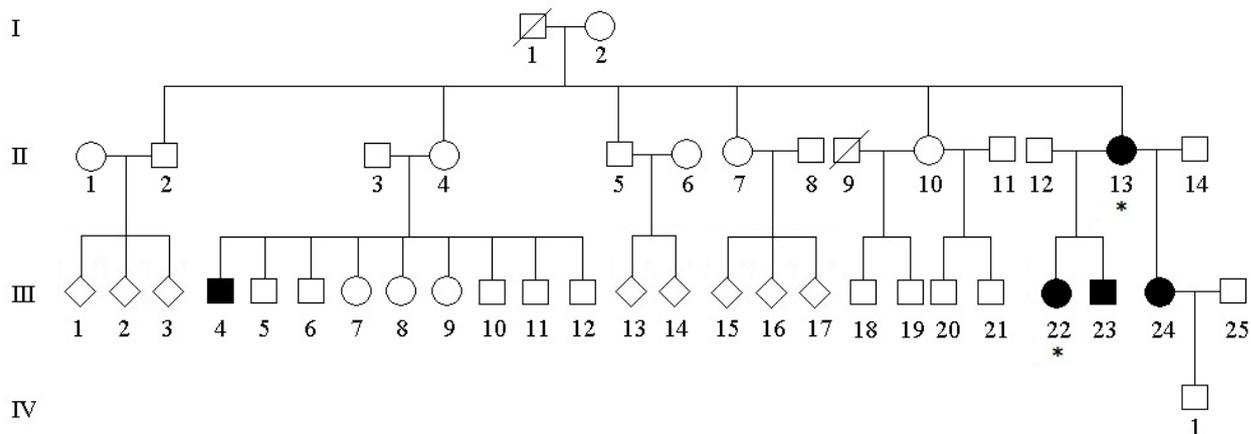


FIGURA 11: Heredograma da família N° 18 com os indivíduos incluídos no estudo indicados por asterisco.

APÊNDICE F

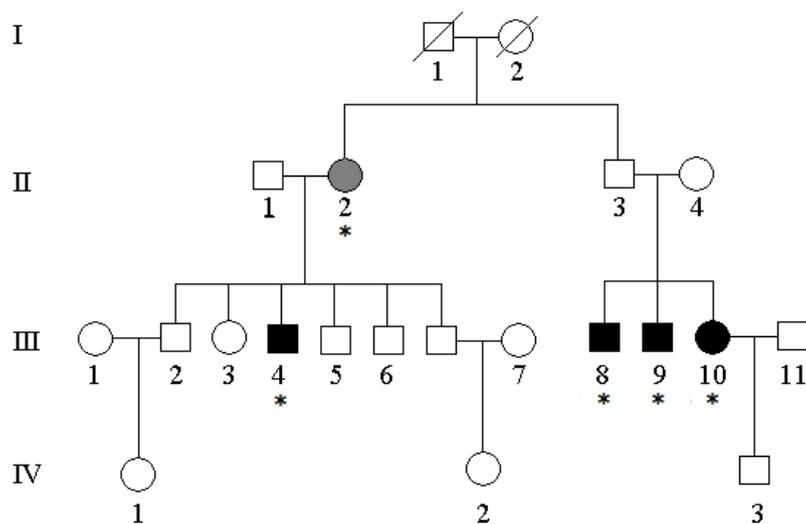


FIGURA 12: Heredograma da família N° 09 com indivíduos incluídos no estudo indicados por asterisco e indivíduo com presbiacusia na cor cinza.

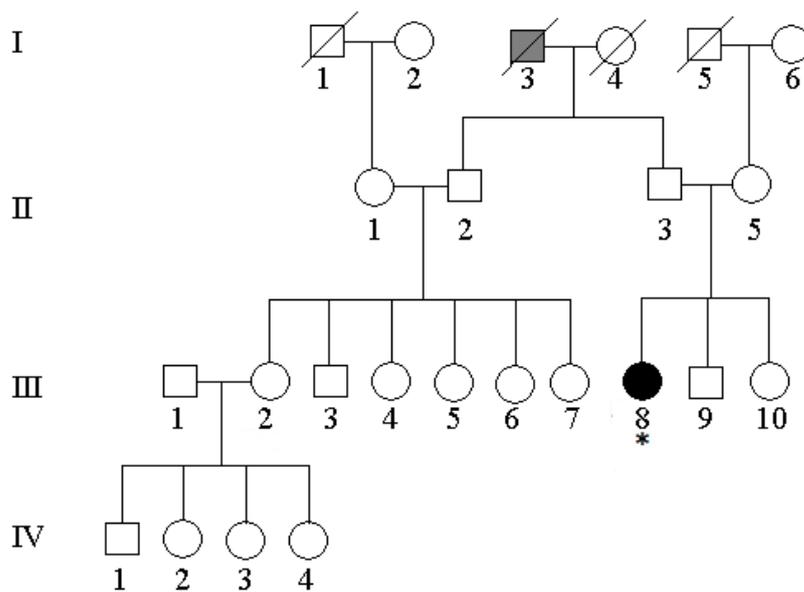


FIGURA 13: Heredograma da família N° 23 com indivíduos incluídos no estudo indicados por asterisco e indivíduo com presbiacusia na cor cinza.

APÊNDICE G

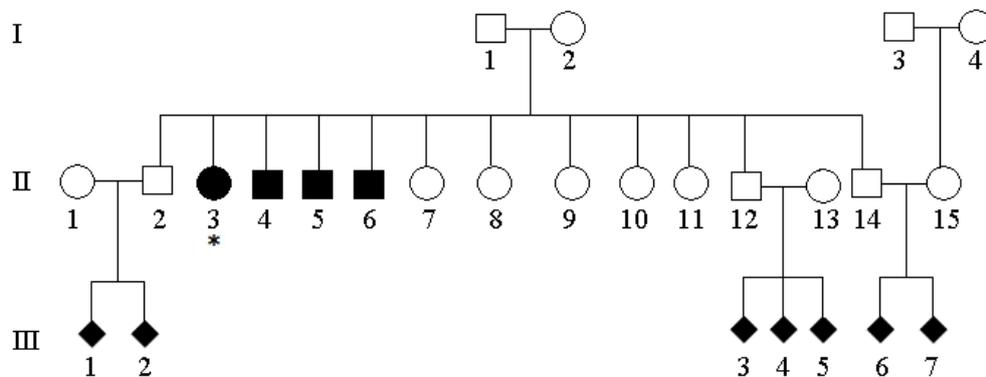


FIGURA 14: Heredograma da família N° 02 com indivíduos incluídos no estudo indicados por asterisco.

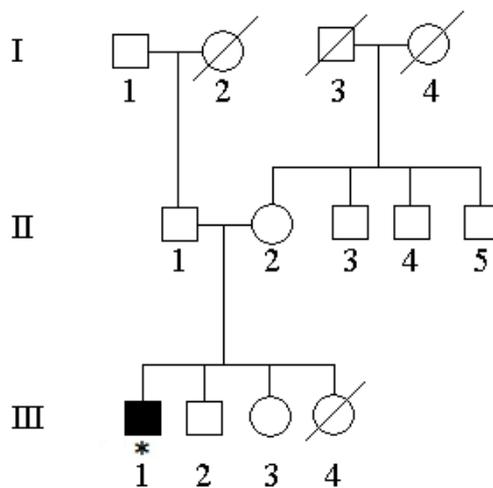


FIGURA 15: Heredograma da família N° 29 com indivíduos incluídos no estudo indicados por asterisco.

ANEXO A



Ministério da Saúde
FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz
 Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz



Comitê de Ética em Pesquisa – CPqGM/FIOCRUZ

PARECER Nº 182/2008

Protocolo: 274

Projeto de Pesquisa: "Genética no Sertão: Ancestralidade e Bases Moleculares de Doenças Genéticas na Região de Monte Santo-BA".

Pesquisadora Responsável: Drª Angelina Xavier Acosta

Instituição ou Departamento: LASP/CPqGM-FIOCRUZ

Considerações:

Após análise ética do projeto e realização dos esclarecimentos solicitados ao responsável, o CEP considera que o projeto atende aos princípios éticos de autonomia, beneficência, não maleficência, equidade e justiça.

Diante do exposto, o Comitê de Ética em Pesquisas do Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz da Fundação Oswaldo Cruz (CEP-CPqGM/FIOCRUZ), conforme atribuições conferidas pela CONEP/CNS/MS (Carta Doc.32-04/97), com base na Resolução 196/96 e suas complementares, julga **aprovado** o projeto supracitado.

O CEP/CPqGM-FIOCRUZ especifica, abaixo, o período de vigência, bem como, determina as datas para o envio dos relatórios semestral e final, referentes ao desenvolvimento do protocolo de pesquisa aprovado.

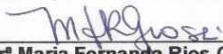
Vigência: 18/12/2008 a 18/06/2013.

Envio dos Relatórios Semestrais em: 18/06/2009 – 18/12/2009 – 18/06/2010 – 18/12/2010 – 18/06/2011 – 18/12/2011 – 18/06/2012 – 18/12/2012.

Relatório Final: 18/07/2013.

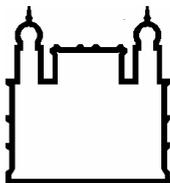
The present study, entitled "Genética no Sertão: Ancestralidade e Bases Moleculares de Doenças Genéticas na Região de Monte Santo-BA" (protocol number 274) has been approved by the Comitê de Ética em Pesquisa do Centro de Pesquisa Gonçalo Moniz - FIOCRUZ (IORG00002090 / IRB000026120) in December 18th 2008 meeting. The protocol and procedures presented in the project are in accordance with the ethical standards of the responsible committee on human subject (institutional) and with the Helsinki Declaration of 1975, as revised in 2000. In the present version, this project is licensed and valid until June 18th 2013.

Salvador, 18 de dezembro de 2008.


Drª Maria Fernanda Rios Grassi
 Coordenadora do Comitê de Ética em Pesquisa
 CPqGM/FIOCRUZ
 IORG-0002090 / IRB-00002612

Rua Waldemar Falcão, nº 121, Candeal, Salvador, Bahia, CEP 40.296-710, Brasil. Tel: (55)-(71) 3176-2285
 Fax: (55)-(71) 3176-2327, e-mail: cep@bahia.fiocruz.br

ANEXO B



Centro de Pesquisa Gonçalo Moniz-CPqGM
Fundação Oswaldo Cruz-FIOCRUZ/BA
Laboratório Avançado de Saúde Pública-LASP

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Nome do projeto: “Genética no Sertão: Ancestralidade e Bases Moleculares de Doenças Genéticas”

Nome do Sub-projeto de Pesquisa: “Bases Moleculares da Surdez Hereditária Não-Sindrômica em Monte Santo”

Pesquisador Responsável e Instituições Envolvidas:

Angelina Xavier Acosta

Professor Adjunto do Departamento de Pediatria da Faculdade de Medicina/UFBA e
Pesquisadora Colaboradora do CPqGM

Em caso de dúvida entrar em Contato: e-mail: axacosta@hotmail.com Telefones: (71)
3176-2246/ 3176-2213

Propósito e Revisão Geral

Você está sendo convidado a participar como voluntário de um projeto de pesquisa que irá estudar a base molecular, ou seja, irá estudar - analisar, pesquisar - um componente específico (DNA) que está presente nas células (menor parte do corpo humano, que forma os diversos órgãos, como exemplo de órgão podem ser citados: o coração, a pele, o olho e o sangue) e que é responsável pelas características de um indivíduo (pessoa), que são transmitidas de pai para filho, desta forma possibilitando que os filhos se assemelhem (sejam parecidos) em algumas característica aos pais. Neste estudo pretende-se analisar este componente das células (DNA) quanto à presença de características semelhantes entre a pessoa com deficiência auditiva (paciente com dificuldade de ouvir, surdo) e seus pais. Pretende-se também verificar a ancestralidade (a origem da família), ou seja, verificar qual a contribuição de índio, africano (negro) e europeu (branco) neste pacientes (mistura racial).

Para a análise serão estudadas características genéticas (mutações, alterações, mudanças no DNA). Com estes resultados e os dados da história da família (árvore genealógica) será verificada a associação da ancestralidade com a presença da deficiência auditiva de origem genética (deficiência auditiva cuja causa está relacionada com alteração no DNA).

Para sabermos o grau de mistura racial em portadores de deficiência auditiva de Monte Santo-BA e/ou seus familiares estudaremos diferenças no material genético (DNA) consideradas como normais, ou seja, não relacionadas com doenças.

Serão convidadas a participar do projeto pessoas com deficiência auditiva (surdez) neurossensorial não-sindrômica (surdez sem associações com má formações - anormalidades, características diferentes das normais) com etiologia não esclarecida (que não foi possível identificar a causa) de Monte Santo-BA.

A participação nesta pesquisa não traz complicações legais. Os procedimentos adotados nesta pesquisa obedecem aos Critérios da Ética em Pesquisa com Seres Humanos conforme Resolução no. 196/96 do Conselho Nacional de Saúde.

Caso você concorde em participar desta pesquisa irá responder um questionário para coleta de dados pessoais e informações sobre o histórico familiar, será realizada avaliação médica, bem como avaliação do ouvido para verificar se a pessoa ouve normalmente, além disto, será realizada a coleta de sangue em quantidade correspondente a uma colher de sopa cheia, utilizando material apropriado (tubos e agulhas estéreis e descartáveis). Essa coleta poderá provocar desconforto temporário causado pela picada de agulha, queimor, e, muito raramente, hematoma (roxidão) e infecção. A participação no estudo também autoriza que as amostras coletadas sejam armazenadas e possam ser utilizadas em análises futuras, desde que os estudos adicionais sejam analisados pelo CEP - telefone para contato: (71) 3176-2285.

O material coletado será processado, analisado e estocado no Laboratório Avançado de Saúde Pública da FIOCRUZ-BA.

Em relação aos exames a serem utilizados para verificar se ouve normalmente você não vai sentir nenhuma dor ou qualquer outro incômodo. Você será avaliado por um médico (otorrinolaringologista) que irá olhar seu ouvido, nariz e garganta com auxílio de uma fonte de luz. Posteriormente, será avaliado pela fonoaudióloga que primeiro irá examinar o seu ouvido com um aparelho que tem uma luz na ponta (meatoscopia), para o segundo exame será colocado um fone em um ouvido e no outro ouvido uma sonda que parece uma pequena borracha furada no meio que vai fazer um som alto (imitancimetria), no terceiro exame você ficará em sala fechada com um fone de ouvido respondendo com a mão se ouviu ou não o som ou então repetindo o que foi solicitado (audiometria), e no quarto exame ficará deitado numa maca, vamos colocar uns fios no seu rosto (eletrodos) e fones de ouvido no qual vai ouvir um som (Bera). Como já dito, nenhum destes exames causa qualquer tipo de dor.

Todas as informações coletadas neste estudo são estritamente confidenciais. Somente o(a) pesquisador(a) e o(a) orientador(a) terão conhecimento dos dados.

Você será beneficiado diretamente participando desta pesquisa, pois receberá informações de como está a sua audição e caso esteja com problemas e houver indicação vai poder participar do programa de adaptação de aparelho ou será encaminhado para outros tratamentos.

Além disto, esperamos que este estudo traga informações importantes sobre a causa da deficiência auditiva em Monte Santo-BA, de forma que o conhecimento que será obtido a partir desta pesquisa possibilite identificar pessoas em risco para deficiência auditiva de causa genética e, com isso, informar sobre possibilidades de ocorrência de novos casos, estabelecendo medidas de saúde para acompanhamento médico e aconselhamento genético (análise feita por profissional especializado para verificar como uma determinada característica que é passada dos pais para o(s) filho(s) aparece e permanece na família e que possibilita estimar a probabilidade - qual a chance, a possibilidade - do(s) filho(s) apresentarem esta característica). Os pesquisadores se comprometem a divulgar os resultados obtidos.

Os exames serão realizados em Salvador em única visita e caso necessite participação no programa de adaptação de aparelho auditivo serão necessárias pelo menos mais duas viagens.

Você não terá nenhum tipo de despesa para participar desta pesquisa, bem como nada será pago por sua participação.

Gostaríamos ainda de esclarecer que a não concordância em participar deste estudo não implicará em nenhum prejuízo referente ao acompanhamento médico que você já faz.

Após estes esclarecimentos, solicitamos o seu consentimento de forma livre para participar desta pesquisa. Portanto preencha, por favor, os itens que se seguem:

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

Eu recebi uma cópia deste documento, e tenho o direito de negar ou desistir de participar deste estudo em qualquer momento sem qualquer prejuízo para os cuidados a mim dispensados. A PARTICIPAÇÃO NA PESQUISA É VOLUNTÁRIA.

Eu _____, R.G. _____ reafirmando que tenho ciência do acima exposto, concordo em participar desse estudo, e estou ciente que tenho:

1. A garantia de receber a resposta a qualquer pergunta ou esclarecimento a qualquer dúvida acerca dos procedimentos, riscos, benefícios e outros relacionados com a pesquisa a que serei submetido;
2. A liberdade de retirar meu consentimento a qualquer momento e deixar de participar no estudo sem que isso traga prejuízo à continuação dos meus cuidados;
3. A segurança de que não serei identificado e que será mantido o caráter confidencial da informação relacionada com minha privacidade;
4. O compromisso de me proporcionar informação atualizada durante o estudo, ainda que esta possa afetar minha vontade de continuar participando;
5. A disponibilidade de tratamento médico e a indenização que legalmente teria direito, por parte da Instituição à Saúde, em caso de danos que a justifiquem, diretamente causados pela pesquisa e;
6. O conhecimento de que se existirem gastos adicionais estes serão absorvidos pelo orçamento da pesquisa.

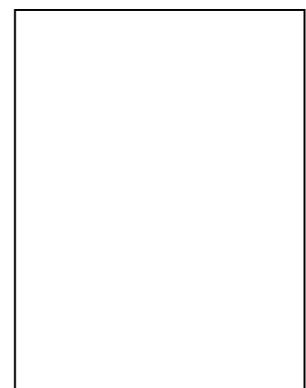
_____, _____ de _____ de 20__

Participante ou Responsável Legal

Pesquisador Responsável

Testemunha 1: _____

Testemunha 2: _____



Polegar direito