

*Vânia Belintani Piatto*

*Análise Molecular do Gene da Conexina 26 em  
Pacientes com Deficiência Auditiva Sensorineural  
Não-sindrômica*

*São José do Rio Preto, SP*

*2003*

*Vânia Belintani Piatto*

*Análise Molecular do Gene da Conexina 26 em  
Pacientes com Deficiência Auditiva Sensorineural  
Não-sindrômica*

*Tese apresentada à Faculdade de Medicina de  
São José do Rio Preto para obtenção do Título  
de Doutor no Curso de Pós-graduação em  
Ciências da Saúde - Eixo Temático Medicina e  
Ciências Correlatas.*

*Orientador: Prof. Dr. José Victor Maniglia*

*São José do Rio Preto, SP*

*2003*

Piatto, Vânia Belintani

Análise Molecular do Gene da Conexina 26 em Pacientes com Deficiência Auditiva Sensorineural Não-sindrômica.

São José do Rio Preto, 2003.

117p; 30cm

Tese (Doutorado) - Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto (FAMERP)

Área de Concentração: Medicina e Ciências Correlatas

Orientador: Prof. Dr. José Victor Maniglia

1. Deficiência auditiva; 2. Análise molecular; 3. Conexina 26

# **DEDICATÓRIA**

---

**AO MEU SOBRINHO**

**BRUNO HENRIQUE**

**A SUA DEFICIÊNCIA AUDITIVA**

**MOTIVOU-ME A REALIZAR ESTA PESQUISA, PARA**

**PERMITIR QUE TODOS TENHAM UM DOS MAIS**

**BELOS DOS SENTIDOS -**

**A AUDIÇÃO!**

**A SUA DEFICIÊNCIA**

**NÃO O IMPEDIU DE SER A PESSOA INTELIGENTE E**

**MARAVILHOSA QUE VOCÊ É!**

**EU DEDICO ESTA TESE**

# **AGRADECIMENTO ESPECIAL**

---

**AO MEU ORIENTADOR**

**PROF. DR. JOSÉ VICTOR MANIGLIA**

**AGRADEÇO O CARINHO, O APOIO E,  
PRINCIPALMENTE, A CONFIANÇA EM MIM E EM MEU  
TRABALHO!**

*"Teu Pai, que vê em segredo,  
te recompensará..."*

*(Mateus 6:4)*

## AGRADECIMENTOS

---

A Deus, pela Sua presença em todos os momentos de minha vida.

Aos meus Pais, Constante e Neide, pelo apoio incondicional.

Aos meus irmãos, Adriana, Júnior, Cinthia, Celina e Guilherme, por fazerem parte de minha vida.

Aos meus sobrinhos Milena, Rafael e Mariana e aos cunhados João, Uwe, Cristina e Mari, pelo carinho.

Ao Prof. Dr. Hélcio José Lins Werneck, pela sua amizade, extrema sabedoria e pelo seu infindável apoio desde o primeiro momento em que iniciei esta pesquisa.

À Prof<sup>ª</sup>. Dr.<sup>a</sup> Ana Cláudia Polli Lopes, pelas horas de estudo e ensinamentos.

À Prof<sup>ª</sup>. Dr.<sup>a</sup> Edi Lúcia Sartorato e suas pós-graduandas (UNICAMP), Fabiana Alexandrino e Camila Andréa de Oliveira, pelo considerável auxílio na conclusão desta pesquisa.

Às Fonoaudiólogas Daniela Bortoloti Calil e Adriana Cruz (Audioclin), Ana Beatriz Vidal Paschoal, Cléria Solange Lopes de Barros e Magali Aparecida Orate Menezes da Silva (FAMERP), pela atenção aos pacientes.

À Enfermeira Rosimeire Aparecida Milhim Cordova e às Auxiliares de Enfermagem Maria Izabel Munhoz Lopes e Zilda Aparecida Lúlio do Carmo, do Ambulatório de Pediatria, pela colaboração no cadastro dos pacientes que participaram desta pesquisa.

Às secretárias da Diretoria da FAMERP, Elisabete Pires Buosi e Nilmara Barbosa de Oliveira, pela gentileza que sempre a mim dispensaram.

Ao Celso Pereira Reis Filho, pelo grande auxílio na elaboração do material de apresentação.

Aos funcionários da informática da FAMERP, Luís Henrique Oliveira Ferreira e Denílson Solim, por serem sempre prestativos.

Aos funcionários do Laboratório de Anatomia da FAMERP, Dorival Gonçalves de Abreu e Valdir Santos da Silva, pela amizade.

Aos secretários da Pós-graduação da FAMERP, Fabiana Cristina Godoy, Luís Antônio Silistino, Rosemeire Cleide S. Desidério e Guilherme Martins Dias, pela cordialidade.

Aos funcionários da Biblioteca da FAMERP, pela boa vontade no auxílio às pesquisas bibliográficas.

Aos meus amigos, pelas orações de Fé.

Aos meus pacientes e seus pais, que compreenderam minhas ausências no consultório.

Aos meus alunos, em especial à aluna Ellen Caroline Toledo do Nascimento, pelo apoio e presença constante.

## **HOMENAGEM**

---

**A todos os portadores de deficiência  
auditiva, em especial, àqueles que  
participaram desta pesquisa.**

**QUE DEUS OS ILUMINE SEMPRE!**

## **HOMENAGEM ESPECIAL**

---

**À**

**CARLA RENATA GRAÇA**

**Pelo seu ilimitado auxílio, extrema boa vontade e dedicação durante os procedimentos no Laboratório de Biologia Molecular.**

**O meu mais sincero reconhecimento e eterna gratidão!!**

*“O Senhor te guiará continuamente...  
e serás como um jardim regado...”*

*(Isaiás 58:11)*

## EPÍGRAFE

---

*“... Oh! Como é cruel ver-me rechaçado pela experiência triste de minha precária audição... É-me impossível dizer a todo momento às pessoas, ‘Falem mais alto, gritem, porque sou surdo’... Como poderia eu admitir uma enfermidade justamente naquele órgão que deveria ser em mim mais perfeito do que em outros... e que outrora possuí na mais alta perfeição?... Devo viver quase sozinho, como um indivíduo que foi banido do seio da sociedade... que humilhação para mim quando alguém que está ao meu lado ouviu uma flauta à distância e eu não... Tais incidentes impelem-me ao desespero... um pouco mais e eu teria posto fim à minha vida - somente a música me demove deste gesto... vou suportando esta existência miserável... Apresso-me com júbilo para o encontro com a morte...”*

*(Beethoven, 1802)*

1 - INTRODUÇÃO	1
1.1 Considerações Gerais	2
1.2 Classificação da Deficiência Auditiva Hereditária	4
1.3 Deficiências Auditivas Hereditárias Não-sindrômicas	5
1.3.1 Histofisiologia coclear e expressão gênica	5
1.3.2 Nomenclatura	12
1.3.3 Mapeamento gênico	12
1.4. Junções Comunicantes	17
1.4.1 Definição e localização	17
1.4.2 Função	18
1.4.3 Estrutura molecular e nomenclatura	19
1.4.4 Junção comunicante - proteína conexina 26	23
1.5. Gene GJB2 e Deficiência Auditiva Não-Sindrômica Autossômica Recessiva (DFNB1)	24
1.6. Objetivos	31
2 - CASUÍSTICA E MÉTODO	32
2.1 Investigação Geral	34
2.2 Investigação Molecular	36
2.2.1 Extração de DNA genômico a partir de sangue periférico	36
2.2.2 Amplificação do gene GJB2 pela Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)	38
2.2.3 Análise do Polimorfismo de Conformação de Fita Simples de DNA (SSCP)	40
2.2.4 Técnica PCR alelo-específico para 35delG (AS-PCR)	41
2.2.5 Técnica PCR para detecção da mutação $\Delta$ (GJB6 - D13S1830)	44
2.2.6 Seqüenciamento automático	46
2.3 Estudo Estatístico	49
3 - RESULTADOS	50

3.1 Amplificação do gene GJB2 pela Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)	52
3.2 Análise do Polimorfismo de Conformação de Fita Simples de DNA (SSCP)	54
3.3 Técnica PCR alelo-específico para mutação 35delG (AS-PCR)	56
3.4 Técnica PCR para detecção da mutação $\Delta$ (GJB6 - D13S1830)	59
3.5 Seqüenciamento Automático	62
3.6 Genótipos encontrados no estudo	66
3.7 Padrões Audiométricos relacionados aos Diagnósticos Moleculares	70
3.8 Heredogramas	71
4 - DISCUSSÃO	73
5 - CONCLUSÕES	86
6 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	88
7 - ANEXOS	112
8 - APÊNDICES	115

## **LISTA DE FIGURAS**

---

Figura 1. Esquema da célula sensorial auditiva. Os estereocílios associam-se por meio de ligações em suas extremidades ("tip links"). **A.** Os dois estereocílios não sofreram deslocamento (deflexão): o poro está fechado. **B.** Um deslocamento (deflexão) abre o poro: íons  $K^+$  e  $Ca^{++}$  podem entrar na célula. Esquema modificado de Maillet<sup>25</sup> \_\_\_\_\_ pág. 7

Figura 2. Estereocílios no pólo apical de uma célula sensorial auditiva: abertura do canal de transdução pela tensão do nó apical.<sup>24,31</sup> **A.** Esquema geral. **B.** Arquitetura molecular. Esquema modificado de Gillespie<sup>31</sup> \_\_\_\_\_ pág. 8

Figura 3. Arranjo dos estereocílios no pólo apical de uma célula sensorial auditiva.<sup>24,32</sup> Esquema modificado de Roberts *et al*<sup>32</sup> \_\_\_\_\_ pág. 9

Figura 4. Esquema de um canal iônico: abertura controlada pela tensão. Uma molécula transmembrana delimita um canal hidrófilo. O canal possui um diâmetro muito reduzido em um único ponto, "o filtro cônico" seletivo. Esquema modificado de Maillet<sup>25</sup> \_\_\_\_\_ pág. 10

Figura 5. Canal iônico de uma célula sensorial auditiva, em específico. Abertura controlada pela tensão do nó apical ("tip link") - "gating-spring model" (teoria do portão em mola).<sup>24,32</sup> Esquema modificado de Roberts *et al*<sup>32</sup> \_\_\_\_\_ pág. 10

Figura 6. Organização molecular da junção comunicante. As junções comunicantes são caracterizadas pelos conexons (hexâmero de uma molécula protéica, a conexina) que ocupam a espessura de cada membrana juncional. Esquema modificado de Alberts *et al*<sup>33</sup> \_\_\_\_\_ pág. 20

Figura 7. Alterações no pH e nas concentrações do  $Ca^{++}$  citoplasmático ocasionam o fechamento (A) ou a abertura (B) das junções comunicantes.<sup>25,104</sup>  
**A.** Fechamento:  $\uparrow [Ca^{++}]$ ;  $\downarrow$  pH. **B.** Abertura:  $\downarrow [Ca^{++}]$ ;  $\uparrow$  pH.  
Esquema modificado de Amon<sup>104</sup> \_\_\_\_\_ pág. 21

Figura 8. Esquemas (**A**<sup>107</sup> e **B**<sup>108</sup>) da conformação da molécula de conexina, com seus quatro domínios transmembranas (M1-M4) e suas terminações intracitoplasmáticas amina ( $NH_2$ ) - IC1 e carboxila ( $COOH$ ) - IC3. Esquema modificado de Laboratoire (A)<sup>107</sup> e (B)<sup>108</sup> \_\_\_\_\_ pág. 22

Figura 9. Esquema do cromossomo 13, humano, com a localização do gene GJB2 ("Gap Junction Beta-2 Protein") demarcada - 13q11-12. A proteína conexina 26, com produção regulada pelo gene GJB2, é o componente estrutural das junções comunicantes, na cóclea. Esquema modificado de OMIM<sup>17</sup> \_\_\_\_\_ pág. 24

Figura 10. Esquema da seqüência de nucleotídeos e proteínas do gene GJB2 de um indivíduo controle normal e um paciente homocigoto para mutação 35delG. No caso da mutação, há uma terminação prematura da proteína no códon 13 do aminoácido ("frameshift"). Esquema modificado de Cohn<sup>133</sup> \_\_\_\_\_ pág. 27

Figura 11. Esquema das regiões amplificadas pelos "primers" utilizados para detecção da mutação  $\Delta$ (GJB6 - D13S1830).\_\_\_\_\_pág. 45

Figura 12. Fotografia do produto da PCR, em gel de agarose 1,5%, do 1º fragmento amplificado do gene GJB2. M- marcador 100pb (Ladder®). Linhas 1, 2, 3 -> fragmentos de amplificação de 286 pb. pb- pares de bases.\_\_\_\_\_pág. 52

Figura 13. Fotografia do produto da PCR, em gel de agarose 1,5%, do 2º fragmento amplificado do gene GJB2. M- marcador 100pb (Ladder®). Linhas 1, 2, 3 -> fragmentos de amplificação de 415 pb. pb- pares de bases.\_\_\_\_\_pág. 53

Figura 14. Fotografia do produto da PCR, em gel de agarose 1,5%, do 3º fragmento amplificado do gene GJB2. M- marcador 100pb (Ladder®). Linhas 1, 2, 3 -> fragmentos de amplificação de 256 pb. pb- pares de bases.\_\_\_\_\_pág. 53

Figura 15. Fotografia do gel de poliacrilamida 10%, corado com nitrato de prata 0,3%, mostrando mobilidade eletroforética alterada (indicado pelas setas) das amostras GDA03 e GF19, do 1º fragmento do gene GJB2.\_\_\_\_\_pág. 55

Figura 16. Fotografia do gel de poliacrilamida 10%, corado com nitrato de prata 0,3%, mostrando mobilidade eletroforética alterada (indicado pelas setas) das amostras GF12, GDA2, GDA31, do 2º fragmento do gene GJB2.\_\_\_\_\_pág. 55

Figura 17. Fotografia do gel de poliacrilamida 10%, corado com nitrato de prata 0,3%, mostrando mobilidade eletroforética alterada (indicado pelas setas) das amostras GF24, GF25, GDA11, do 3º fragmento do gene GJB2.\_\_\_\_\_pág. 56

Figura 18. Fotografia do produto de AS-PCR, em gel de agarose 1,5%, do grupo GDA. As setas identificam os pacientes heterozigotos (GDA01, GDA23, GDA34, GDA35) e os pacientes homozigotos (GDA10, GDA15, GDA24, GDA25, GDA26). M- marcador 100pb (Ladder®). \_\_\_\_\_pág. 58

Figura 19. Fotografia do produto de AS-PCR, em gel de agarose 1,5%, dos pacientes do grupo GDA, com a mutação 35delG, e seus familiares (grupo GF). As setas indicam o paciente GDA01 e seus familiares heterozigotos (GF2, GF4, GF5, GF7, GF9, GF10) e aqueles sem a mutação 35delG (GF1, GF3, GF6, GF8). M- marcador 100pb (Ladder®). \_\_\_\_\_pág.59

Figura 20. Fotografia do produto de PCR para mutação  $\Delta$ (GJB6 - D13S1830), em gel de agarose 1,5%, dos pacientes do grupo GDA. As setas indicam os irmãos GDA34 e GDA35 heterozigotos para a mutação. M- marcador 100pb (Ladder®).\_\_\_\_\_pág.60

Figura 21. **A.** Fotografia do produto de PCR para mutação  $\Delta$ (GJB6 - D13S1830), em gel de agarose 1,5%, da mãe dos pacientes GDA34 e GDA35, indicada pela seta. M marcador 100pb (Ladder®). **B.** Fotografia do produto de PCR para mutação  $\Delta$ (GJB6 - D13S1830), em gel de agarose 1,5%, do pai dos pacientes GDA34 e GDA35, indicada pela seta. M- marcador 100pb (Ladder®).\_\_\_\_\_pág. 61

Figura 22. Eletroferograma da seqüência do gene GJB2 de um controle normal e do paciente GDA24 homozigoto para a mutação 35delG. \_\_\_\_\_ pág. 63

Figura 23. Eletroferograma da seqüência do gene GJB2 de um controle normal e do paciente GDA23 heterozigoto para a mutação 35delG. \_\_\_\_\_ pág. 63

Figura 24. Fotografia do gel no local onde se observa a mutação V37I no gene GJB2 do paciente GDA01 - heterozigoto composto 35delG/V37I. A seta indica a substituição da guanina pela adenina, na posição 109 dos nucleotídeos. \_\_\_\_\_ pág. 64

Figura 25. Fotografia do gel no local onde se observa a mutação V37I no gene GJB2 da mãe (GF01) - V37I/N do paciente GDA01. A seta indica a substituição da guanina pela adenina, na posição 109 dos nucleotídeos. \_\_\_\_\_ pág. 65

Figura 26. Esquema da molécula da proteína conexina 26 com a localização aproximada das mutações encontradas no caso-índice GDA01 (35delG/V37I) e no familiar GF01 (V37I/Normal): ● - mutação 35delG ● - mutação V37I. Esquema modificado de Roberts *et al.*<sup>32</sup> \_\_\_\_\_ pág. 65

Figura 27. Gráfico demonstrando a distribuição dos pacientes sem mutações, heterozigotos e homozigotos para a mutação 35delG e dos pacientes heterozigotos compostos (35delG/V37I e  $\Delta$ (GJB6-D13S1830) do Grupo GDA (n=41), em relação aos graus de perda da deficiência auditiva. \_\_\_\_\_ pág. 70

Figura 28. Heredograma dos casos-índice com mutações no gene GJB2 e com a mutação  $\Delta$ (GJB6D13S1830)<sup>165</sup>. \_\_\_\_\_ pág. 71

## **LISTA DE TABELAS E QUADROS**

---

- Tabela 1. Distribuição das amostras (n) dos Grupos GDA e GF que apresentaram mobilidade eletroforética alterada em relação aos géis de poliacrilamida 10% dos três fragmentos do gene GJB2. \_\_\_\_\_ pág. 54
- Tabela 2. Distribuição dos pacientes (n) do Grupo GDA em relação aos resultados encontrados pela técnica AS-PCR. \_\_\_\_\_ pág. 57
- Tabela 3. Distribuição dos familiares (n) do Grupo GF em relação aos resultados encontrados pela técnica AS-PCR. \_\_\_\_\_ pág. 57
- Tabela 4. Distribuição dos pacientes (n) do Grupo GDA em relação aos genótipos encontrados pela análise molecular do gene GJB2 e da mutação  $\Delta$ (GJB6-D13S1830). \_\_\_\_\_ pág. 66
- Quadro 1. Seqüência dos "primers" para PCR do gene GJB2.<sup>59,116</sup> \_\_\_\_\_ pág. 39
- Quadro 2. Seqüência dos "primers" para AS-PCR, para mutação 35delG, do gene GJB2.<sup>161</sup> \_\_\_\_\_ pág. 43
- Quadro 3. Seqüência dos "primers" controles internos para AS-PCR do gene GJB2.<sup>131,140,163</sup> \_\_\_\_\_ pág. 43
- Quadro 4. Seqüência dos "primers" para PCR para mutação  $\Delta$ (GJB6-D13S1830)<sup>75,143</sup> \_\_\_\_\_ pág. 45
- Quadro 5. Seqüência dos "primers" para PCR do gene GJB2 para o seqüenciamento.<sup>59,116</sup> \_\_\_\_\_ pág.47
- Quadro 6. Dados clínicos dos 33 casos-índice do estudo e os 8 familiares deficientes (Grupo GDA, n=41) que foram submetidos à análise molecular do gene GJB2 e da mutação  $\Delta$ (GJB6-D13S1830). \_\_\_\_\_ pág. 51
- Quadro 7. Fenótipo e genótipo dos casos-índice com mutações no gene GJB2 e com a mutação  $\Delta$ (GJB6-D13S1830) \_\_\_\_\_ pág. 67
- Quadro 8. Genótipo dos pacientes do Grupo GDA e seus familiares (GF) com audição normal \_\_\_\_\_ pág. 68

## **LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS**

---

.ARMS -> "Amplification-Refractory Mutation System" - Sistema de Amplificação Refratária de Mutação.

.AS-PCR -> "Allele-Specific PCR" - Reação em Cadeia da Polimerase Alelo Específico.

.Cx -> Conexina.

.Cx26 -> Conexina 26.

.Cx30 -> Conexina 30.

.Cx31 -> Conexina 31.

.Cx43 -> Conexina 43.

.Da -> Daltons.

.dB -> Decibéis.

.ddNTP -> Didesoxinucleotídeos trifosfato terminadores.

.DFN -> "Deafness" - Deficiência auditiva de transmissão ligada ao X.

.DFNA -> "Deafness" - Deficiência auditiva de transmissão autossômica dominante.

.DFNB -> "Deafness" - Deficiência auditiva de transmissão autossômica recessiva.

.dNTP -> Desoxinucleotídeos trifosfato.

.EC1 -> Anel Protéico Extracelular 1.

.EC2 -> Anel Protéico Extracelular 2.

.GDA -> Grupo Deficiente Auditivo.

.GF -> Grupo dos Familiares.

.GJB2 -> "Gap Junction Beta-2 Protein".

.GJB3 -> "Gap Junction Beta-3 Protein".

.GJB6 -> "Gap Junction Beta-6 Protein".

.Hz -> Hertz.

.IC1 -> Terminação Intracitoplasmática 1.

.IC2 -> Terminação Intracitoplasmática 2.

.IC3 -> Terminação Intracitoplasmática 3.

.Kb -> Quilobase.

.M1 -> Domínio Transmembrana 1.

.M2 -> Domínio Transmembrana 2.

.M3 -> Domínio Transmembrana 3.

.M4 -> Domínio Transmembrana 4.

.pb -> Pares de bases.

.PCR -> "Polimerase Chain Reaction" - Reação em Cadeia da Polimerase.

.pmoles - Picomoles.

.SSCP -> "Single-Stranded Conformational Polymorphisms" - Polimorfismo de Conformação de Fita Simples de DNA.

.35delG -> Deleção de uma Guanina na posição 35 dos nucleotídeos.

.Δ(GJB6-D13S1830) -> Δ = Deleção.



## **Análise molecular do gene da conexina 26 em pacientes com deficiência auditiva sensorineural não-sindrômica**

Mutações no gene que codifica a proteína conexina 26 têm contribuído para a maioria das deficiências auditivas pré-lingual, sensorineural não-sindrômicas recessivas. Uma mutação específica, a 35delG, é a mais freqüente das mutações detectadas no gene GJB2 nos vários grupos étnicos estudados. O objetivo foi determinar a prevalência de mutações no gene GJB2 em pacientes com deficiência auditiva sensorineural não-sindrômica, do Serviço de Otorrinolaringologia da FAMERP, em São José do Rio Preto, SP. Trinta e três casos-índice foram avaliados por exames físico e complementares para excluir formas sindrômicas e causas ambientais da deficiência auditiva e, pela reação em cadeia da polimerase alelo-específico (AS-PCR) para a detecção da mutação 35delG. Os pacientes heterozigotos para a mutação 35delG e aqueles que não tiveram a mutação detectada foram submetidos, posteriormente, ao PCR para detecção da mutação  $\Delta$ (GJB6-D13S1830) e ao seqüenciamento automático direto para análise da região codificante do gene GJB2. A mutação 35delG foi detectada em 27,3% dos casos-índice (9/33) ou em 21,2% dos alelos (14/66). A mutação  $\Delta$ (GJB6-D13S1830) foi encontrada em um (3,0%) caso-índice heterozigoto 35delG. O seqüenciamento direto nos casos-índice heterozigotos identificou um paciente (3,0%) com as mutações 35delG/V37I. As mutações no gene GJB2 são responsáveis por mais de um quarto das deficiências auditivas sensorineural não-sindrômica na população do estudo e, o teste PCR alelo-específico (AS-PCR) é um método fácil para rastreamento da mutação 35delG e os resultados positivos podem estabelecer o diagnóstico etiológico e aconselhamento genético nos pacientes afetados.

**Unitermos:** deficiência auditiva, análise molecular, conexina 26.

---

**ABSTRACT**

## **Molecular analysis of connexin 26 gene in patients with sensorineural non-syndromic hearing loss**

Mutations in the gene encoding the protein connexin 26 (GJB2) have been shown as a major contributor to prelingual, sensorineural, non-syndromic, recessive deafness. One specific mutation, 35delG, has accounted for the majority of the mutations detected in the connexin 26 (GJB2) gene in the most ethnic groups studied so far. The aim of the study was to determine the prevalence of connexin 26 mutations in patients with non-syndromic hearing loss, referred from Otorhinolaryngology Service of FAMERP, in São José do Rio Preto, SP. The 33 unrelated probands were examined by clinical and complementary exams to exclude syndromic forms and environmental causes of deafness and by allele-specific polymerase chain reaction (AS-PCR) for the detection of the 35delG mutation. Patients heterozygotes for the 35delG mutation and the patients who had no detectable 35delG mutation were further analysed by PCR testing for the  $\Delta$ (GJB6-D13S1830) mutation and by direct genomic sequencing of the coding region of the connexin 26 gene. The 35delG mutation was found in 27.3% of the probands (9/33) or in 21.2% of the alleles (14/66). The  $\Delta$ (GJB6-D13S1830) mutation was found in one proband (3.0%), heterozygote for the 35delG mutation. Direct genomic sequencing in heterozygotes patients revealed one patient (3.0%) with the 35delG/V37I mutations. Mutations in the connexin 26 gene are responsible for about one quarter of sensorineural, nonsyndromic deafness in the study population, and allele-specific PCR is an easy screening method for the common 35delG mutation and positive finding should establish an etiologic diagnosis and affect genetic counseling.

**Uniterms:** hearing loss; molecular analysis; connexin 26.

## **2 - CASUÍSTICA E MÉTODO**

---

---

De acordo com as Normas Regulamentadoras de Pesquisa em Seres Humanos, Resolução 196/96 do Ministério da Saúde, o projeto referente ao presente estudo foi encaminhado ao Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto, SP (CEP- FAMERP) e à Comissão Nacional de Ética em Pesquisa de Brasília, DF (CONEP), com aprovação de ambos (Anexos 1 e 2, respectivamente).

No período de Março a Junho de 2001, foram estudados 33 casos-índice, (23 do sexo masculino e 10 do sexo feminino), com idade entre 1 ano e 37 anos, todos da raça branca, do Ambulatório de Otorrinolaringologia da Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto (FAMERP) com deficiência auditiva sensorineural não-sindrômica. Somente foram incluídos no estudo após assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido e, quando menores de idade, sob permissão de seus pais ou responsável legal (Apêndice 1). Destes casos-índice, foram avaliados 8 parentes (4 do sexo masculino e 4 do sexo feminino), com idade entre 11 anos e 45 anos, que também apresentam deficiência auditiva sensorineural não-sindrômica. Portanto, foram avaliadas 33 famílias, com pelo menos um membro com deficiência auditiva, constituindo um total de 41 indivíduos deficientes.

Quando possível, os outros familiares dos casos-índice, com audição normal, também foram submetidos à investigação molecular, constituindo um total de 44 indivíduos.

Os casos-índice e os seus familiares, também deficientes, foram cadastrados como Grupo Deficiente Auditivo (GDA) e os familiares com audição normal como Grupo dos Familiares (GF), para melhor identificação durante os procedimentos.

## ***2.1 Investigação Geral***

A avaliação dos pacientes incluiu anamnese e exame físico, sistêmico e otorrinolaringológico, de acordo com o protocolo padronizado pela Disciplina de Otorrinolaringologia e Serviço de Cirurgia de Cabeça e Pescoço da FAMERP (Apêndice 2), realizados conjuntamente pelo otorrinolaringologista e pediatra, executores deste estudo.

Cada paciente foi submetido a completa anamnese para investigar idade de início da deficiência auditiva, presença de outros casos na família e excluir a possibilidade de causas ambientais: infecções materno-fetais, complicações perinatais, meningites, uso de drogas ototóxicas, trauma acústico. Os exames físicos, otorrinolaringológico e sistêmico, foram realizados para se excluir sinais sugestivos de formas sindrômicas de deficiência auditiva (especialmente dismorfismo crânio-facial, alterações tegumentares, anomalias de origem branquial, cardíaca, tireoidianas, distúrbios da visão, etc.). Além disso, os pacientes foram submetidos a anamnese e exame físico genético-clínico detalhados, realizados sempre pelo mesmo geneticista clínico do Serviço de Genética da FAMERP, também para se excluir causas sindrômicas ou ambientais.

Os exames complementares foram realizados, de acordo com a necessidade para se excluir causas sindrômicas, após indicação do otorrinolaringologista e pediatra responsáveis, consistindo das investigações descritas a seguir:

- Avaliação laboratorial: provas de função renal, análise de urina (hematúria, proteinúria), hormônios tireoidianos. Exames realizados no Laboratório Central do Hospital de Base da FAMERP.

- Avaliação cardíaca: eletrocardiograma realizado no Setor de Exames Cardiológicos do Hospital de Base, com o eletrocardiógrafo DIXTAL<sup>®</sup>.
- Avaliação oftalmológica: realizada nos pacientes com suspeita de alterações visuais, sempre por um mesmo oftalmologista do Ambulatório de Oftalmologia da FAMERP.
- Avaliação audiométrica: realizada, exclusivamente, sempre pela mesma fonoaudióloga do Serviço de Fonoaudiologia da FAMERP. Foram feitos os exames: .audiometria tonal convencional com o audiômetro de diagnóstico – Modelo MAICO MA 41<sup>®</sup> (Maico Hearing Instruments INC, Mineápolis, EUA), .audiometria eletrofisiológica que consiste na audiometria de tronco do encéfalo, realizada com o aparelho portátil Bio–Logic Evoked Potencial Systems Corp (EP)<sup>®</sup>, VIDEX e, na pesquisa de otoemissões acústicas por meio do aparelho CELESTA 503 Cochlear Emissions Analyser<sup>®</sup>, DANAVOX.
- Avaliação tomográfica por meio de tomografia computadorizada de crânio, com avaliação de mastóide e orelha, realizada no Hospital de Base pela equipe do Serviço de Radiologia da FAMERP, utilizando o tomógrafo PHILIPS SR4000<sup>®</sup>, Tomoscan, Série M7069, 150KV, 200MA.

## ***2.2 Investigação Molecular***

### ***2.2.1 Extração de DNA genômico a partir de sangue periférico***

A extração de DNA genômico foi realizada por dois métodos, descritos a seguir:

#### ***2.2.1<sub>a</sub> Protocolo adaptado no Laboratório de Biologia Molecular da FAMERP:<sup>160</sup>***

##### ***Fase I) Isolamento de leucócitos***

Uma amostra de 9mL de sangue periférico foi colhida em dois tubos Vacutainer<sup>®</sup> de 4,5mL já contendo anticoagulante (EDTA) e homogeneizada logo em seguida. Com auxílio de uma pipeta estéril, a amostra foi colocada em um tubo de centrífuga de 50mL já contendo a mesma medida de histopaque (à temperatura ambiente). O material foi então centrifugado por 30 minutos a 1.500 rpm (Centrífuga Eppendorf<sup>®</sup>, Modelo 5804R), para que houvesse a formação de 3 camadas distintas: hemáceas no fundo do tubo, histopaque na camada intermediária e plasma na superfície do tubo. Os linfócitos (aspecto de “nuvem”) ficaram concentrados entre o histopaque e o plasma. O plasma foi aspirado e descartado com uma pipeta Pasteur. Em seguida, foi aspirada a camada de linfócitos e transferida para um novo tubo. Aos linfócitos isolados, foi adicionada a solução tampão PBS 1X até atingir 15mL. O tubo contendo os linfócitos foi invertido cuidadosamente e centrifugado por 12 minutos a 1.200 rpm. Após centrifugado, o sobrenadante foi descartado e o "pellet" de linfócitos, concentrado ao fundo, foi suspenso em solução. Novamente o tubo recebeu PBS 1X e foi centrifugado, como anteriormente. Ao final do processo, o "pellet" foi suspenso em 0,5mL de PBS 1X.

## ***Fase II) Extração de DNA genômico***

Aos linfócitos anteriormente isolados, foram adicionados: 3mL de Tampão de Lise (TrisHCl 10mM, NaCl 400mM, Na<sub>2</sub>EDTA 2mM), 0,2mL de SDS 10%, 0,5μL de proteinase K (20mg/mL) e 40μL de RNase A (20mg/mL). Em seguida, o tubo foi incubado durante a noite a 37°C, para que fosse realizada a digestão protéica. Após incubação, foi acrescentado 1mL de NaCl 6M (em solução saturada) e o tubo foi agitado no vórtex até a solução espumar. O material foi deixado em gelo por 15 minutos e novamente agitado no vórtex. Foi então, centrifugado por 15 minutos a 2.000 rpm. Após centrifugação, o tubo recebeu 10mL de etanol 100% gelado e foi invertido cuidadosamente até ter sido observada a precipitação do DNA. O DNA precipitado foi retirado, lavado com etanol 70% e mantido em temperatura ambiente para secar. Posteriormente, foi suspenso em tampão Tris-EDTA. O DNA foi, então, guardado em tubo de microcentrífuga a -20°C para posterior amplificação por PCR.

### ***2.2.1, Kit de extração de DNA***

Os procedimentos foram realizados conforme instruções do fabricante do Kit (GFX™ Genomic Blood DNA Purification Kit, Amersham Pharmacia Biotech Inc. Limited 2000): amostra de 4,0mL de sangue periférico foi colhida em um tubo Vacutainer® de 4,5mL já contendo anticoagulante (EDTA), homogeneizada logo em seguida e estocada a 4°C por cerca de 3 dias. Para a extração, a solução "RBC lise" foi colocada em tubos de 1,5mL, na quantidade de 3 vezes (900μL) o volume da amostra (300μL) e, após o volume da amostra de sangue ter sido adicionado, o tubo foi invertido

cuidadosamente, várias vezes, para misturar o material. A mistura foi incubada por 5 minutos, em temperatura ambiente, e centrifugada a 14.000 rpm por 1 minuto. Após, o sobrenadante foi removido por aspiração, sendo deixado algum fluido no fundo para que o “pellet” fosse suspenso no mesmo, após agitação vigorosa no vórtex. Imediatamente após, foi adicionado ao tubo, 500µL da “solução de extração” e incubado por 5 minutos, em temperatura ambiente. Nesse ínterim, estava sendo aquecido o tampão TE à 70°C. A mistura incubada foi transferida para a coluna e centrifugada a 7000 rpm por 1 minuto. Após, o material armazenado no tubo coletor foi descartado, sendo o tubo colocado novamente embaixo da coluna. Foi adicionado, pela segunda vez, 500µL da “solução de extração” na coluna e centrifugado a 7000 rpm por 1 minuto. Novamente, foi descartado o material armazenado no tubo coletor, recolocado a coluna no mesmo, adicionado 500µL da “solução wash” na coluna e centrifugado a 14000 rpm por 5 minutos. O tubo coletor foi descartado e a coluna transferida para um eppendorf novo de 1,5mL (com tampa), devidamente identificado. Foi adicionado, na coluna, 200µL de tampão TE 1X aquecido a 70°C, incubado por 1 minuto, em temperatura ambiente, e centrifugado a 7000 rpm por 1 minuto. A coluna foi descartada e o eppendorf, contendo a amostra de DNA, foi armazenado a 4°C, por 24 horas, antes de ser congelado a -20°C.

### ***2.2.2 Amplificação do gene GJB2 pela Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)***

O gene GJB2, que possui apenas um exon codificante (Gene Bank - M86849), foi amplificado pela técnica de PCR<sup>154</sup> com algumas modificações, adaptadas no Laboratório de Biologia Molecular da FAMERP. Para esta reação, foram utilizados

três pares de iniciadores ou "primers", que são oligonucleotídeos sintéticos.<sup>59,116</sup> A partir destes, os desoxinucleotídeos trifosfato (dNTPs) são incorporados, iniciando a amplificação do DNA, respeitando-se a complementaridade de bases (A-T/C-G) sendo obtida, por fim, a amplificação do gene GJB2, em três fragmentos, em três reações diferentes.

As seqüências dos oligonucleotídeos sintetizados, a posição de anelamento e o tamanho (em pares de bases - pb) dos fragmentos amplificados, por cada par de "primers", são descritos no Quadro 1.

**Quadro 1.** Seqüência dos "primers" para PCR do gene GJB2.<sup>59,116</sup>

<b>Par</b>	<b>Posição</b>	<b>Seqüência 5'-&gt; 3'</b>	<b>Tamanho (pb)</b>
"Azul" (A)	-32	CxAF - TCTTTTCCAGAGCAAACCGC	} 286
	254	CxAR - GACACGAAGATCAGCTGCAG	
"Verde" (V)	143	CxVF - AGGCCGACTTTGTCTGCAACA	} 415
	557	CxVR - GTGGGCCGGGACACAAAG	
"Rosa" (R)	438	CxRF - CGAAGCCGCCTTCATGTACG	} 256
	693	CxRR - CTGGGCAATGCGTTAAACTGG	

CxF ("Forward" - direto); CxR ("Reverse" - inverso); pb (pares de bases)

A reação de PCR, para obtenção de cada um dos três fragmentos, foi processada em ciclador de temperatura (Eppendorf<sup>®</sup>, Modelo Mastercycler Personal), em reações de 50µL de volume final, contendo DNA genômico (200-300ng), tampão de PCR 1X [Tris-HCl - 20mM (pH 8.4), cloreto de potássio (KCl) - 50mM], cloreto de

magnésio ( $MgCl_2$ ) - 1,5mM, dNTPs - 0,2mM de cada desoxinucleotídeo trifosfato (dATP, dTTP, dCTP, dGTP), iniciadores ou "primers" - 0,5pmoles de cada [direto (F) e inverso (R)], glicerol 5% e Taq polimerase - 1,0U. Inicialmente, as amostras foram desnaturadas a 94°C por 4 minutos sendo, posteriormente, submetidas a 34 ciclos repetidos de 60 segundos a 94°C para desnaturação, 60 segundos a 60°C para anelamento e 60 segundos a 72°C para extensão e, após os ciclos, 10 minutos a 72°C para extensão final das cadeias.

Os produtos da reação, adicionados ao azul de bromofenol 0,025%, foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1,5%, em tampão TE 1X. Após término da eletroforese, o gel foi corado com brometo de etídio (na concentração final de 0,5µg/mL), submetido à iluminação ultravioleta, para confirmar o sucesso da reação, e fotodocumentado.

### ***2.2.3 Análise do Polimorfismo de Conformação de Fita Simples de DNA (SSCP)***

As amostras de DNA, amplificadas pela técnica de PCR, descrita no item 2.2.2, foram submetidas à técnica de SSCP, que consiste na desnaturação do DNA e aplicação do mesmo em gel de poliacrilamida não-desnaturante. A análise dos produtos permite a detecção de mutações por meio da migração diferencial da cadeia mutante no gel, a qual apresenta conformação diferente da normal.<sup>155-156</sup>

Alíquotas de 5µL de cada produto de PCR, dos três fragmentos do gene, foram adicionadas em 5µL de uma solução desnaturante ("stop solution") contendo formamida 98%, EDTA - 0,5M, azul de bromofenol 0,025% e xilenocianol 0,025% e desnaturadas a 95°C por 10 minutos sendo, à seguir, incubadas em gelo até o momento

da aplicação no gel. Esta mistura foi submetida a eletroforese em gel de poliacrilamida 10% (instagel 50%, TEB 10X, glicerol 5%, persulfato de amônio - APS 10%, TEMED e H<sub>2</sub>O E-Pure para um volume final de 30 mL) em cuba de eletroforese vertical (Gibco<sup>®</sup> BRL, Modelo V16-2) com placas de 160mm x 190mm, sob voltagem constante de 180V, a 21°C por 5 horas, em presença de tampão (Tri-borato 90mM, pH8.3, EDTA 4mM).

Após este período, os géis foram corados com nitrato de prata, em duas etapas.<sup>156</sup> Na primeira etapa, os géis foram fixados em solução fixadora contendo etanol 10% e ácido acético glacial 0,75% por 10 minutos, sob agitação leve, porém constante. Em seguida, foi realizada a coloração do gel com solução de nitrato de prata 0,3% por 10 minutos, também sob agitação constante. Para retirada do excesso de prata do gel, foram realizadas lavagens sucessivas com água desionizada autoclavada, que não ultrapassaram um minuto de duração. Por fim, foi adicionada ao gel, ainda sob agitação constante, a solução reveladora contendo hidróxido de sódio 3% e formaldeído 0,3%, por tempo suficiente, cerca de 10 minutos, para que as bandas fossem visualizadas. A seguir, a revelação foi bloqueada com a solução fixadora inicial. Os géis foram secos e conservados em papel celofane e, após todas essas etapas, foram fotografados. Os géis, já conservados em celofane, foram submetidos à análise visual do padrão de migração de bandas, em cada fragmento amplificado. As amostras, com mobilidade eletroforética alterada, foram submetidas a seqüenciamento automático.

#### ***2.2.4 Técnica PCR alelo-específico para 35delG (AS-PCR)<sup>161</sup>***

Para a detecção da mutação 35delG foi utilizada a técnica da reação em cadeia da polimerase alelo-específico - AS-PCR ("Allele-Specific PCR"), no

termociclador Applied Biosystems - GeneAmp PCR System 9700<sup>®</sup>, sendo realizada no Centro de Biologia Molecular e Engenharia Genética da UNICAMP (CBMEG). Para esta reação foram sintetizados três ARMS "primers" ("Amplification-Refractory Mutation System" - Sistema de Amplificação Refratária de Mutação para detecção de mutações de ponto: "primer" normal (NOR) - usado para amplificar o alelo sem a mutação 35delG, "primer" mutante (MUT) - para amplificar o alelo com a mutação 35delG e o "primer" comum (COM) - usado como "primer" inverso (R), juntamente com os "primers" NOR ou MUT usados como "primers" diretos (F).<sup>161-162</sup>

Estas duas reações (NOR/COM e MUT/COM) permitem identificar cada amostra como homocigoto normal (sem a mutação 35delG em ambos os alelos), heterocigoto ou homocigoto mutante para esta mutação (com a mutação 35delG em um ou ambos os alelos, respectivamente). As seqüências dos oligonucleotídeos sintetizados, a posição de anelamento e o tamanho (em pares de bases) dos fragmentos amplificados, por cada par de "primers" (NOR/COM, MUT/ COM), são descritos no Quadro 2.

Também foram sintetizados "primers" denominados controles A (direto) e B (inverso), descritos no Quadro 3, para co-amplificação do gene GJB2 com um segmento do gene amelogenina homólogo ao cromossomo X-Y sendo utilizados, portanto, como controles internos de amplificação.<sup>131,140,163</sup>

**Quadro 2.** Seqüência dos "primers" para AS-PCR, para mutação 35delG, do gene GJB2.<sup>161</sup>

"Primer"	Posição	Seqüência 5'-> 3'	Tamanho (pb)
NOR (F)	6	TTGGGGCACGCTGCAGACGATCCTGGGGAG	} 202
COM (R)	207	GAAGTAGTGATCGTAGCACACGTTCTTGCA	
MUT (F)	6	TTGGGGCACGCTGCAGACGATCCTGGGGAT	} 202

NOR (Normal); COM (Comum), MUT (Mutante); F ("Forward" - direto); R ("Reverse" - inverso), pb (pares de bases)

**Quadro 3.** Seqüência dos "primers" controles internos para AS-PCR do gene GJB2.<sup>131,140,163</sup>

"Primer"	Seqüência 5'-> 3'	Tamanho (pb)
A (F)	CCCACCTTCCCCTCTCTCCAGGCAAATGGG	} 360
B (R)	GGGCCTCAGTCCCAACATGGCTAAGAGGTG	

F ("Forward" - direto); R ("Reverse" - inverso), pb (pares de bases)

A reação de AS-PCR foi realizada da seguinte maneira: 200-500ng de DNA genômico em volume final de 30µL de reação de PCR, tampão de PCR 10X (Tris-HCl 10mM pH 8,8), cloreto de magnésio (MgCl<sub>2</sub>) - 1,17mM, dNTPs - 170µM de cada desoxinucleotídeo trifosfato (dATP, dTTP, dCTP, dGTP), 10pmol ou 0,05µg do "primer" normal (NOR) ou do mutante (MUT), 10pmol ou 0,05µg do "primer" comum (COM), 10pmol ou 0,03µg dos "primers" controles A e B, BSA 1% (Albumina de Soro Bovino) e Taq polimerase - 1,0U. Inicialmente, as amostras foram desnaturadas a 95°C por 5 minutos sendo, posteriormente, submetidas a 29 ciclos repetidos de 40 segundos a

95°C para desnaturação, 30 segundos a 62°C para anelamento e 60 segundos a 72°C para extensão e, após os ciclos, 5 minutos a 72°C para extensão final das cadeias.

Os produtos de AS-PCR foram analisados por eletroforese em gel de agarose 1,5% em tampão Tris-Borato-EDTA ou TBE 1X, contendo brometo de etídio, na concentração de 0,5µg/mL, submetidos à iluminação ultravioleta, para confirmar o sucesso da reação e o gel, fotodocumentado.

As amostras heterozigotas e as que não apresentaram a mutação 35delG do grupo GDA foram submetidas a seqüenciamento automático.

#### ***2.2.5 Técnica PCR para detecção da mutação $\Delta(GJB6 - D13S1830)$ <sup>75,143</sup>***

Após a descoberta da mutação  $\Delta(GJB6 - D13S1830)$ , como uma das mais freqüentes em espanhóis, depois da mutação 35delG<sup>143</sup>, padronizou-se um método para determinação dessa mutação pela técnica de PCR sendo realizada no Centro de Biologia Molecular e Engenharia Genética da UNICAMP (CBMEG). Para esta reação foram sintetizados três "primers" para detecção da mutação:

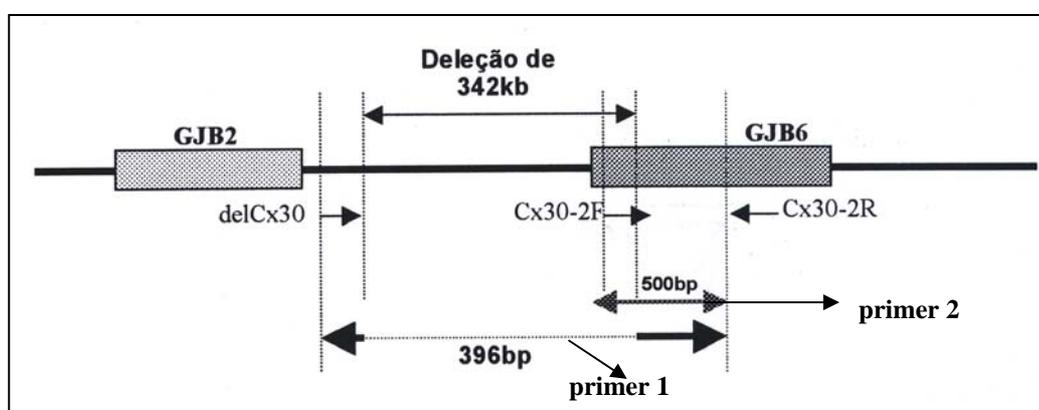
."primer" delCx30<sup>143</sup> - como direto, localizado próximo ao ponto de quebra,

."primer" Cx30-2F - como direto (F) e o "primer" Cx30-2R - como reverso (R), ambos localizados dentro do gene da conexina 30 (GJB6).<sup>75</sup> O "primer" Cx30-2F está localizado no segmento do gene GJB6 deletado, permitindo a detecção dos indivíduos normais para essa mutação.

A utilização destes três "primers" juntos permite a obtenção de dois produtos diferentes de amplificação na PCR: Cx30-2F/Cx30-2R (500 pb) e delCx30/Cx30-2R (396 pb), discriminando entre os indivíduos normais (produto de 500 pb), homozigotos para a mutação (produto de 396 pb) e heterozigotos (produtos de 500

pb e 396 pb) em um único teste. A Figura 11 representa, esquematicamente, as regiões amplificadas para detecção da mutação.

As seqüências dos oligonucleotídeos sintetizados e o tamanho (em pares de bases) dos fragmentos amplificados, por cada par de "primers" (Cx30-2F/Cx30-2R, delCx30/Cx30-2R), são descritos no Quadro 4.



**Figura 11.** Esquema das regiões amplificadas pelos "primers" utilizados para detecção da mutação  $\Delta$ (GJB6 - D13S1830).

**Quadro 4.** Seqüência dos "primers" para PCR do gene GJB6.<sup>75,143</sup>

Par	Seqüência 5'-> 3'	Tamanho (pb)
1	delCx30 -> CCT TCC GTG TCT ATG AAT TTG	396
	Cx30-2R -> TGA CGC AGC TAC ATT TTA CCT T	
2	Cx30-2F -> TTC AGG CGA GGA GAG AAG AG	500
	Cx30-2R -> TGA CGC AGC TAC ATT TTA CCT T	

F ("Forward" - direto); R ("Reverse" - inverso), pb (pares de bases)

A reação de amplificação foi processada no termociclador Applied Biosystems - GeneAmp PCR System 9700<sup>®</sup>, em reações de 40µL de volume final, contendo 1µL de DNA genômico, 5µL de solução contendo desoxinucleotídeos trifosfato (dATP, dTTP, dCTP, dGTP), 1µL do "primer" delCx30 e 2µL dos "primers" Cx30-2F e Cx30-2R, 0,5µL de Taq DNA polimerase, tampão de PCR 10X (Tris-HCl 10mM pH 8,8) e 1,5µL de MgCl<sub>2</sub>. Inicialmente, as amostras foram desnaturadas a 95°C por 5 minutos sendo, posteriormente, submetidas a 35 ciclos repetidos de 30 segundos a 94°C para desnaturação, 30 segundos a 58°C para anelamento e 45 segundos a 72°C para extensão e, após os ciclos, 5 minutos a 72°C para extensão final das cadeias sendo, então, mantidas a 15°C.

Os produtos de PCR foram analisados por eletroforese em gel de agarose 1,5% em tampão Tris-Borato-EDTA ou TBE 1X, contendo brometo de etídio, na concentração de 0,5µg/mL, submetidos à iluminação ultravioleta, para confirmar o sucesso da reação, e o gel fotodocumentado.

### ***2.2.6 Seqüenciamento automático***

Para o seqüenciamento automático foi utilizado o método de terminação de cadeias que se baseia no seqüenciamento por incorporação de nucleotídeos terminadores da reação em cadeia da polimerase.<sup>164</sup> Esses didesoxinucleotídeos terminadores (ddNTPs ou ddATP, ddTTP, ddCTP, ddGTP), uma vez incorporados no final da fita em síntese, interrompem o processo de incorporação de outros nucleotídeos.

As etapas para as reações de seqüenciamento, realizadas pela equipe do Centro de Biologia Molecular e Engenharia Genética da UNICAMP (CBMEG), são descritas a seguir:

**a) Amplificação do gene GJB2 pela Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)**

Para esta reação, foram sintetizados dois pares de iniciadores ou "primers",<sup>59,116</sup> para se obter a amplificação do gene GJB2 em dois fragmentos. As seqüências dos oligonucleotídeos sintetizados, a posição de anelamento e o tamanho (em pares de bases) dos fragmentos amplificados, por cada par de "primers" (CxF - direto e CxR - inverso), são descritos no Quadro 5.

**Quadro 5.** Seqüência dos "primers" para PCR do gene GJB2 para o seqüenciamento.<sup>59,116</sup>

Par	Posição	Seqüência 5'-> 3'	Tamanho (pb)
1	-32	Cx26-1F -> TCTTTTCCAGAGCAAACCGC	286
	254	Cx26-1R -> GACACGAAGATCAGCTGCAG	
2	172	Cx26-2F -> CCAGGCTGCAAGAACGTGTG	520
	691	Cx26-2R -> GGGCAATGCGTTAAACTGGC	

F ("Forward" - direto); R ("Reverse" - inverso), pb (pares de bases)

A reação de PCR, para cada fragmento, foi processada no ciclador de temperatura Applied Biosystems - GeneAmp PCR System 9700<sup>®</sup>, em reações de 50µL de volume final, contendo DNA genômico (200-500ng), tampão de PCR 10X [Tris-HCl - 10mM (pH 8.8), cloreto de potássio (KCl) - 50mM], cloreto de magnésio (MgCl<sub>2</sub>) - 1,5mM, dNTPs - 200µM de cada desoxinucleotídeo trifosfato (dATP, dTTP, dCTP, dGTP), iniciadores ou "primers" - 20pmoles de cada [direto (F) e inverso (R)] e Taq polimerase - 2,5U. Inicialmente, as amostras foram desnaturadas a 94°C por 5 minutos sendo, posteriormente, submetidas a 30 ciclos repetidos de 60 segundos a 94°C para

desnaturação, 60 segundos a 60°C para anelamento e 60 segundos a 72°C para extensão e, após os ciclos, 5 minutos a 72°C para extensão final das cadeias.

Os produtos de PCR foram analisados por eletroforese em gel de agarose 1,5% em tampão Tris-Borato-EDTA ou TBE 1X, contendo brometo de etídio, na concentração de 0,5µg/mL, submetidos à iluminação ultravioleta, para confirmar o sucesso da reação e o gel, fotodocumentado.

### ***b) Purificação dos produtos de PCR***

Os fragmentos amplificados pela reação de PCR, acima descrita, foram purificados utilizando-se o Kit Wizard SV Gel and PCR Clean-UP System® (PROMEGA). A purificação é necessária pois, por meio desta reação, são eliminados DNA em fita simples, "primers", resíduos de reagentes, fragmentos inespecíficos e nucleotídeos não incorporados durante a reação de PCR. Após a purificação, as amostras foram quantificadas (40-80ng de DNA) usando-se o marcador de peso molecular Low Mass DNA Ladder® (GIBCO).

### ***c) Reação de seqüenciamento automático para os produtos de PCR do gene GJB2***

As reações de seqüenciamento foram corridas no seqüenciador automático ABI PRISM™ 377 (Perkin Elmer) sendo utilizado o BigDye™ Terminator Cycle Sequencing Kit V2.0 Ready Reaction (ABI PRISM/PE Biosystems) e compostas por: 40-80ng de DNA (1-2µL dos produtos purificados de PCR para cada uma das reações, direta e inversa), 2µL do mix BigDye™, 1µL (5mM/µl) dos "primers" direto ou inverso (dos fragmentos Cx1 e/ou Cx2), H<sub>2</sub>O deionizada para completar 10µL. Esta

mistura foi então, submetida à técnica de PCR nos seguintes ciclos específicos para o seqüenciamento: desnaturação inicial a 96°C por 60 segundos sendo, posteriormente, realizados 30 ciclos repetidos de 10 segundos a 96°C para desnaturação, 5 segundos a 57°C para anelamento e 4 minutos a 60°C para extensão e, após os ciclos, manutenção a 4°C. As amostras foram precipitadas com isopropanol 75%, formando o "pellet", sendo mantidas a -20°C até o seqüenciamento.

Imediatamente antes do seqüenciamento, o "pellet" de cada amostra, sempre protegido da luz, foi eluído em 3µl de tampão formamida/BlueDextran (5:1), desnaturado a 96°C por 2 min e colocado em gelo até o momento de ser aplicado no gel. O gel de seqüenciamento utilizado foi gel de poliacrilamida 4,5% composto por 360g de uréia, 10g de resina [Dowex MR-3<sup>®</sup> (I-9005)], 100mL de solução de acrilamida (19:1), 100mL TBE 10X, H<sub>2</sub>O destilada para completar 1 litro.

As seqüências obtidas, ao término do seqüenciamento automático, foram analisadas e comparadas com a seqüência normal com o auxílio do programa Gene Runner<sup>®</sup> V3.05, para alinhamento das seqüências dos nucleotídeos, e do programa Chromas<sup>®</sup> V1.45, para a edição dos eletroferogramas.

### ***2.3 Estudo Estatístico***

Foram calculadas porcentagens com os desvios padrões das mesmas, sendo os resultados expressos em %(DP%).

## **3 - RESULTADOS**

---

---

Os dados clínicos obtidos dos casos-índice, tais como sexo, idade, época de início e grau de perda da deficiência auditiva e recorrência familiar, são descritos no Quadro 6.

**Quadro 6.** Dados clínicos dos 33 casos-índice do estudo e os 8 familiares deficientes (Grupo GDA, n=41) que foram submetidos à análise molecular do gene GJB2 e da mutação  $\Delta$ (GJB6-D13S1830).

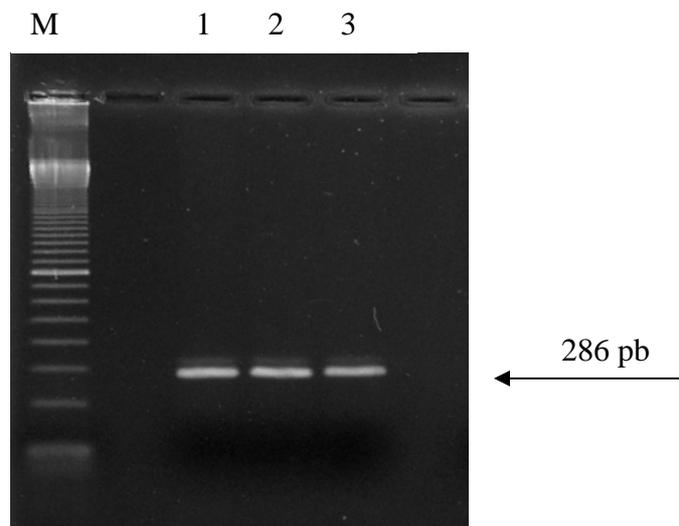
Casos-índice (GDA)	Sexo	Idade (Anos)	Início da DA	Grau da DA	Recorrência Familiar	Idade (Anos)	Grau da DA
1	M	15	Pré-lingual	Grave			
2	F	12	Pré-lingual	Profundo	irmão GDA31	11	Moderado
3	M	9	Pré-lingual	Grave			
4	F	28	Pós-lingual	Profundo			
5	F	3	Pré-lingual	Profundo			
6	M	8	Pré-lingual	Grave			
7	M	4	Pré-lingual	Profundo			
8	F	10	Pós-lingual	Grave			
9	M	7	Pré-lingual	Profundo			
10	M	1	Pré-lingual	Grave			
11	M	3	Pré-lingual	Grave			
12	M	9	Pré-lingual	Grave			
13	F	1	Pré-lingual	Profundo			
14	M	9	Pré-lingual	Profundo			
15	M	6	Pré-lingual	Grave			
16	M	5	Pré-lingual	Profundo			
17	F	33	Pré-lingual	Grave	irmã GDA18 irmão GDA19 irmão GDA20	28 37 19	Moderado Profundo Profundo
21	M	37	Pós-lingual	Profundo			
22	M	8	Pré-lingual	Grave			
23	M	15	Pré-lingual	Grave			
24	F	1	Pré-lingual	Grave			
25	M	4	Pré-lingual	Profundo			
26	F	9	Pré-lingual	Moderado			
27	F	5	Pré-lingual	Profundo			
28	M	10	Pré-lingual	Moderado	mãe GDA29	38	Moderado
30	M	14	Pós-lingual	Grave			
32	M	17	Pré-lingual	Profundo	irmã GDA33	26	Profundo
34	F	14	Pré-lingual	Grave	irmão GDA35	35	Grave
36	M	32	Pré-lingual	Profundo			
37	M	7	Pré-lingual	Profundo	mãe GDA38	45	Moderado
39	M	15	Pré-lingual	Moderado			
40	M	6	Pré-lingual	Grave			
41	M	16	Pré-lingual	Moderado			

(GDA)- Grupo Deficiente Auditivo; (M)- masculino; (F)- feminino; (DA)- Deficiência Auditiva

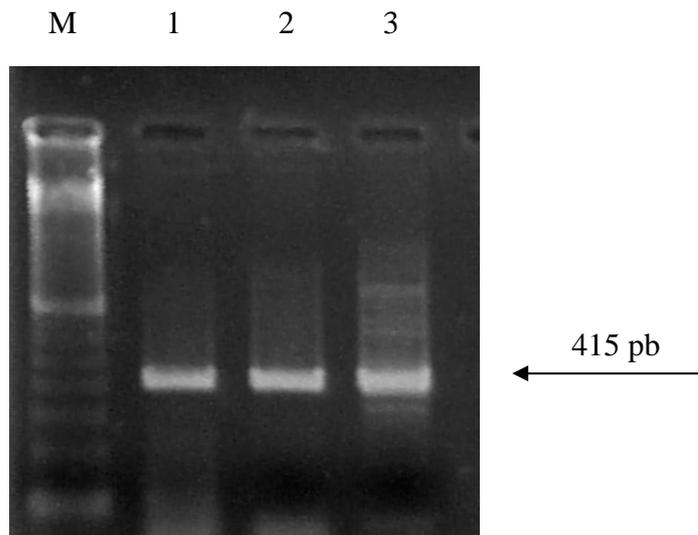
Os resultados, a seguir, são apresentados conforme os dados obtidos pelos testes moleculares: PCR, SSCP, PCR alelo-específico para 35delG, PCR para mutação  $\Delta$ (GJB6-D13S1830) e o seqüenciamento automático e, resultados audiométricos comparados com as mutações encontradas.

### ***3.1 Amplificação do gene GJB2 pela Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)***

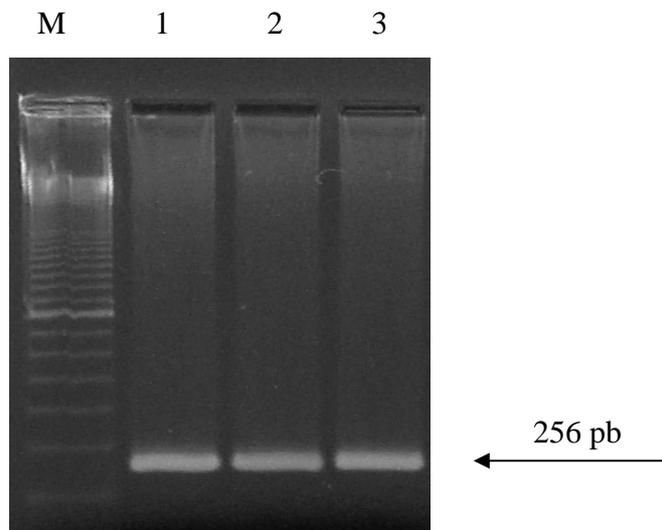
Um total de 85 amostras de DNA genômico foi submetido à técnica da PCR, sendo que 41 amostras eram dos pacientes do grupo deficiente auditivo - GDA (33 casos-índice e 8 familiares afetados) e 44 amostras do grupo dos familiares - GF. Cada amostra, então, foi submetida à três reações de PCR, usando-se pares de "primers" diferentes para cada reação (CxAF/CxAR - 1ª reação; CxVF/CxVR - 2ª reação; CxRF/CxRR - 3ª reação - Quadro 2), obtendo-se a amplificação do gene GJB2, em três fragmentos, com tamanhos de 286 pb, 415 pb e 256 pb, respectivamente (Figuras 12 a 14).



**Figura 12.** Fotografia do produto de PCR, em gel de agarose 1,5%, do 1º fragmento amplificado do gene GJB2. M- marcador 100pb (Ladder®). Linhas 1, 2, 3 -> fragmentos de amplificação de 286 pb. pb- pares de bases.



**Figura 13.** Fotografia do produto de PCR, em gel de agarose 1,5%, do 2º fragmento amplificado do gene GJB2. M- marcador 100pb (Ladder®). Linhas 1, 2, 3 -> fragmentos de amplificação de 415 pb. pb- pares de bases.



**Figura 14.** Fotografia do produto de PCR, em gel de agarose 1,5%, do 3º fragmento amplificado do gene GJB2. M- marcador 100pb (Ladder®). Linhas 1, 2, 3 -> fragmentos de amplificação de 256 pb. pb- pares de bases.

### 3.2 Análise do Polimorfismo de Conformação de Fita Simples de DNA (SSCP)

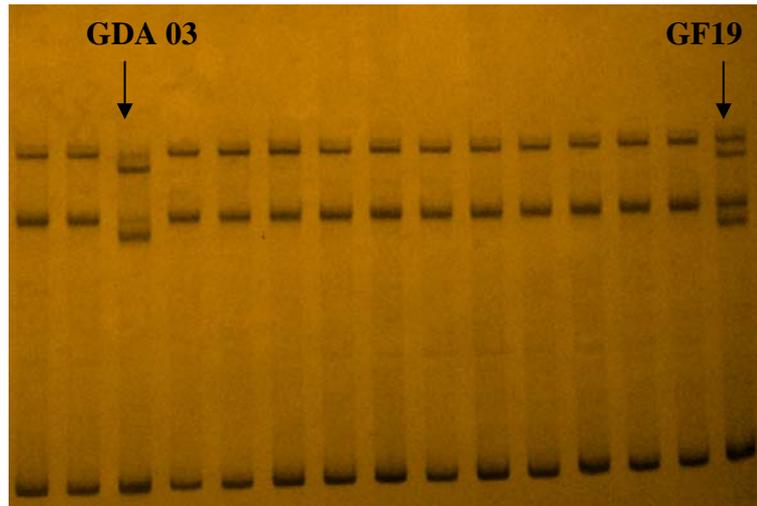
As amostras de ambos os grupos GDA (n=41) e GF (n=44), contendo o gene GJB2 já amplificado em três fragmentos, foram submetidas à técnica de SSCP, para cada fragmento. Foi realizada, posteriormente, a análise visual do padrão de migração de bandas, no gel de poliacrilamida 10%, para cada fragmento amplificado, cujos resultados são apresentados na Tabela 1 e as fotografias dos géis nas Figuras 15 a 17.

**Tabela 1.** Distribuição das amostras (n) dos Grupos GDA e GF que apresentaram mobilidade eletroforética alterada em relação aos géis de poliacrilamida 10% dos três fragmentos do gene GJB2.

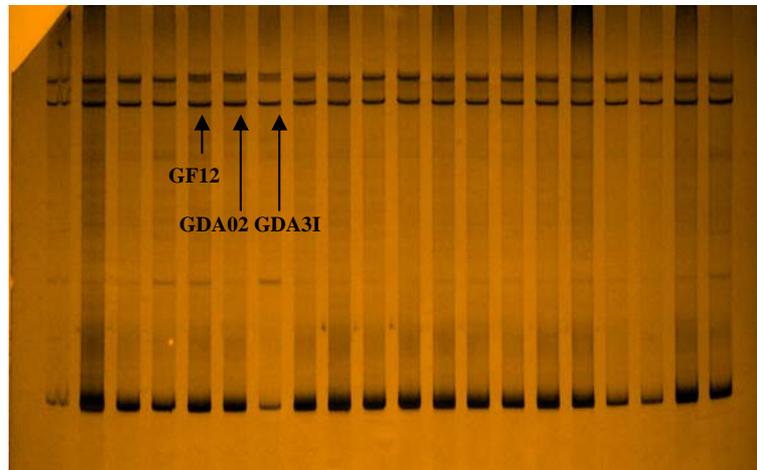
Fragmento	Grupo GDA (n=41)		Grupo GF (n=44)	
	n	%	n	%
1°	6	14,63	5	11,63
2°	12	29,27	8	18,18
3°	3	7,31	3	6,82
<b>Total</b>	<b>21</b>	<b>51,21</b>	<b>16</b>	<b>36,36</b>

GDA- Grupo Deficiente Auditivo; GF- Grupo Familiares

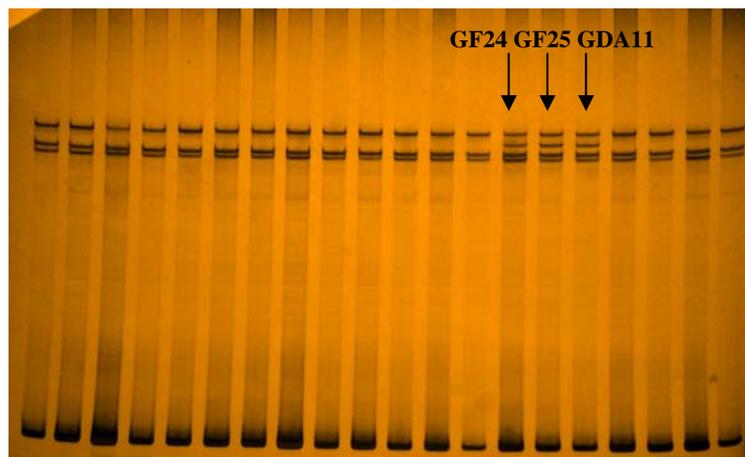
Portanto, 21 (51,21%, DP<sub>%</sub>=7,80) amostras do grupo GDA e 16 (36,36%, DP<sub>%</sub>=7,25) amostras do grupo GF apresentaram mobilidade eletroforética alterada sendo submetidas ao seqüenciamento automático.



**Figura 15.** Fotografia do gel de poliacrilamida 10%, corado com nitrato de prata 0,3%, mostrando mobilidade eletroforética alterada (indicado pelas setas) das amostras GDA03 e GF19 do 1º fragmento do gene GJB2.



**Figura 16.** Fotografia do gel de poliacrilamida 10%, corado com nitrato de prata 0,3%, mostrando mobilidade eletroforética alterada (indicado pelas setas) das amostras GF12, GDA02, GDA31, do 2º fragmento do gene GJB2.



**Figura 17.** Fotografia do gel de poliacrilamida 10%, corado com nitrato de prata 0,3%, mostrando mobilidade eletroforética alterada (indicado pelas setas) das amostras GF24, GF25, GDA11, do 3º fragmento do gene GJB2.

### ***3.3 Técnica PCR alelo-específico para mutação 35delG (AS-PCR)***

Inicialmente, foi realizada a técnica AS-PCR nos pacientes do grupo GDA (casos-índice n=33 e familiares afetados n=8)) a fim de que, fossem identificados aqueles que apresentassem a mutação 35delG. As amostras dos familiares (Grupo GF), com audição normal, que foram submetidas à esta técnica foram a dos pais, quando possível, de cada paciente no qual se identificou mutação. Apenas do paciente GDA 01 foram avaliados, além dos pais, sua irmã, tios e primos em primeiro grau; do paciente GDA10, sua mãe e avó materna e do paciente GDA41, seu irmão gêmeo. Devido a isto, o número de familiares (GF) avaliados foi de 19 indivíduos, no total. Os resultados relacionados ao Grupo GDA são apresentados na Tabela 2 e ao Grupo GF na Tabela 3. A fotografia do gel do Grupo GDA está representada na Figura 18 e a dos familiares que realizaram o teste, na Figura 19.

**Tabela 2.** Distribuição dos pacientes (n) do Grupo GDA em relação aos resultados encontrados pela técnica AS-PCR.

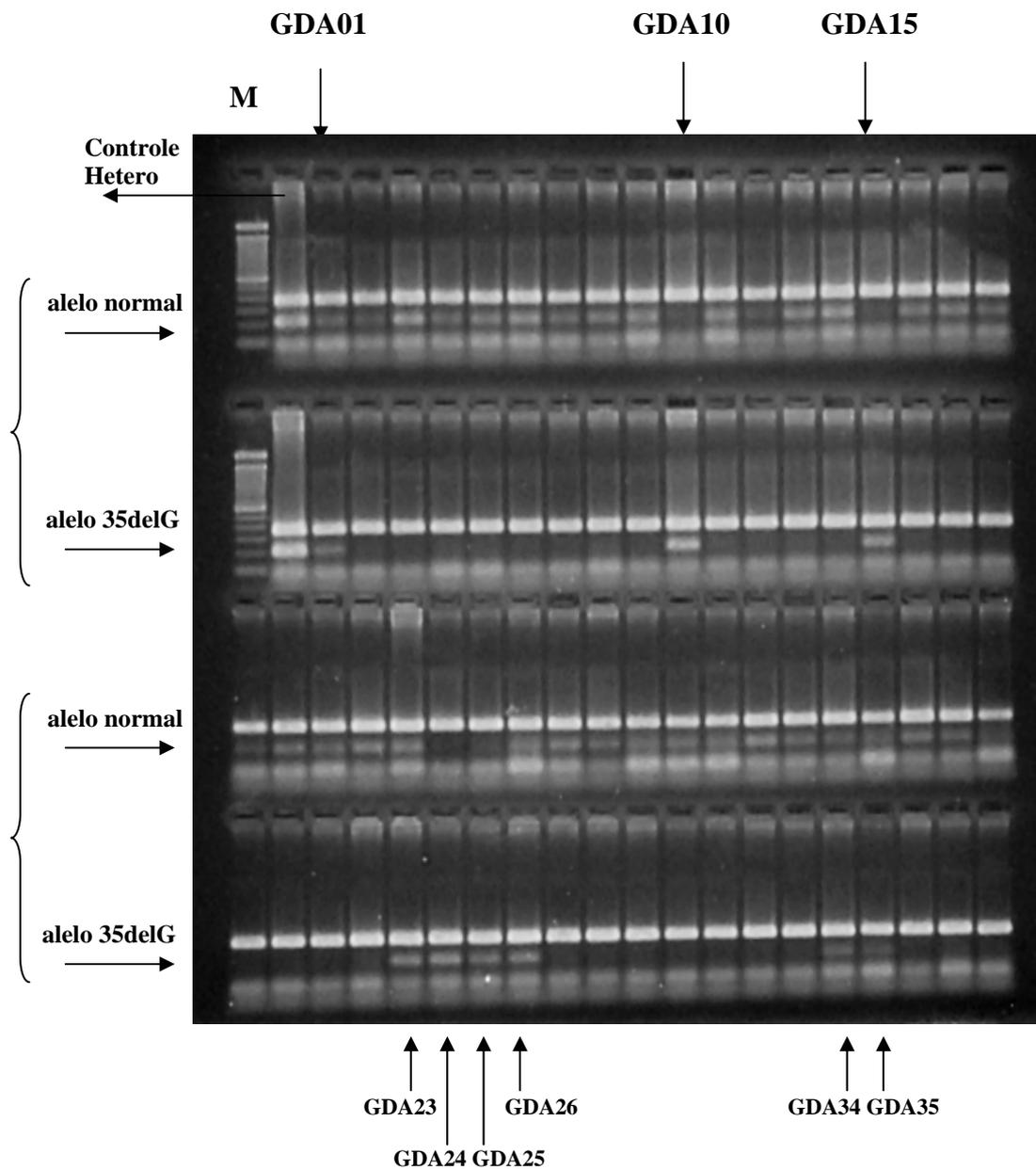
Resultados AS-PCR	Casos-índice				Familiares afetados			
	n (33)	%	alelos (66)	%	n (8)	%	alelos (16)	%
Heterozigoto 35delG	4	12,1	4	6,0	1	12,5	1	6,25
Homozigoto 35delG	5	15,2	10	15,2	0	0	0	0
<b>Total</b>	9	27,3	14	21,2	1	12,5	1	6,25
Sem mutação 35delG	24	72,7	48	72,7	7	87,5	14	87,5
<b>Total</b>	33	100	62	93,9	8	100	15	93,75

As amostras heterozigotas e as que não apresentaram a mutação 35delG do grupo GDA foram submetidas ao seqüenciamento automático.

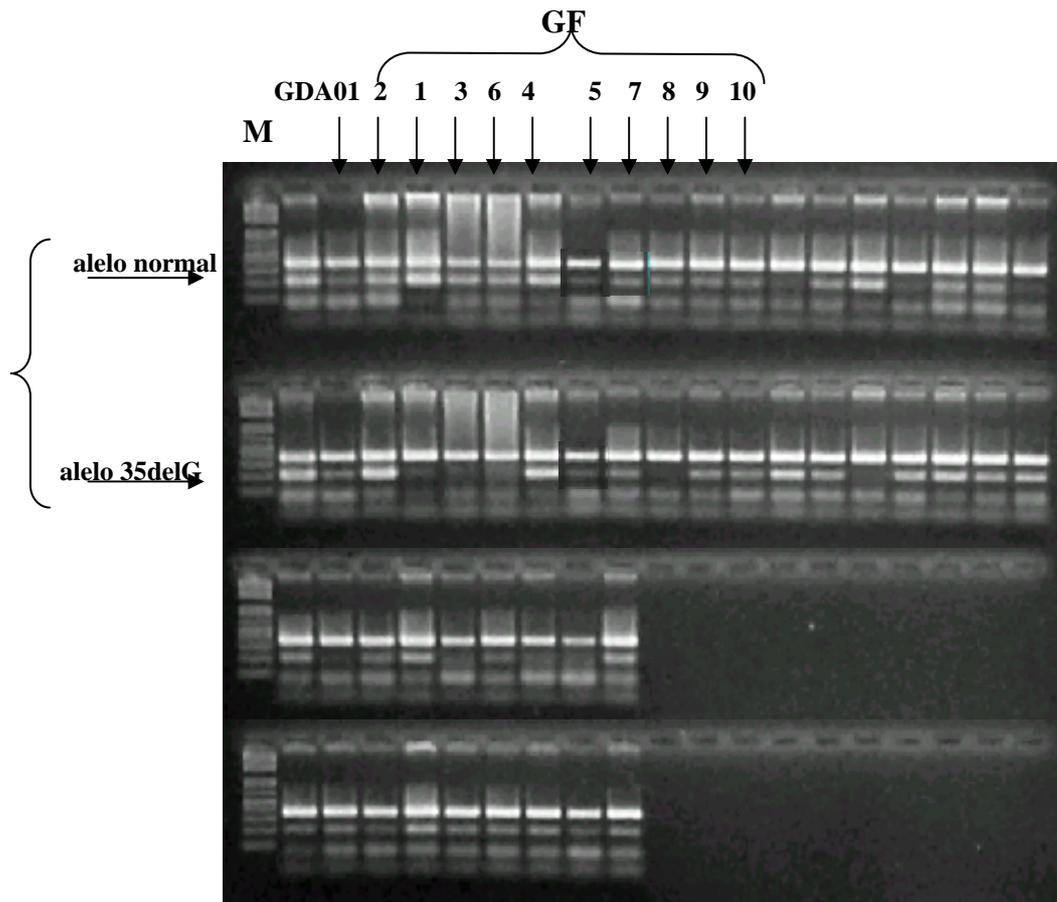
**Tabela 3.** Distribuição dos familiares (n) do Grupo GF em relação aos resultados encontrados pela técnica AS-PCR.

Resultados AS-PCR	Grupo Familiares			
	n (19)	%	alelos (38)	%
Heterozigoto 35delG	13	68,42	13	34,21
Homozigoto 35delG	0	0	0	0
<b>Total</b>	13	68,42	13	34,21
Sem mutação 35delG	6	31,58	12	31,57
<b>Total</b>	19	100	25	65,78

Do Grupo GF, com audição normal, 13 (68,42%, DP<sub>%</sub>=10,6) indivíduos apresentaram a mutação 35delG em heterozigose, isto é, portadores da mutação.



**Figura 18.** Fotografia do produto de AS-PCR, em gel de agarose 1,5%, do grupo GDA. As setas identificam os pacientes heterozigotos (GDA01, GDA23, GDA34, GDA35) e os pacientes homozigotos (GDA10, GDA15, GDA24, GDA25, GDA26). M- marcador 100pb (Ladder<sup>®</sup>).



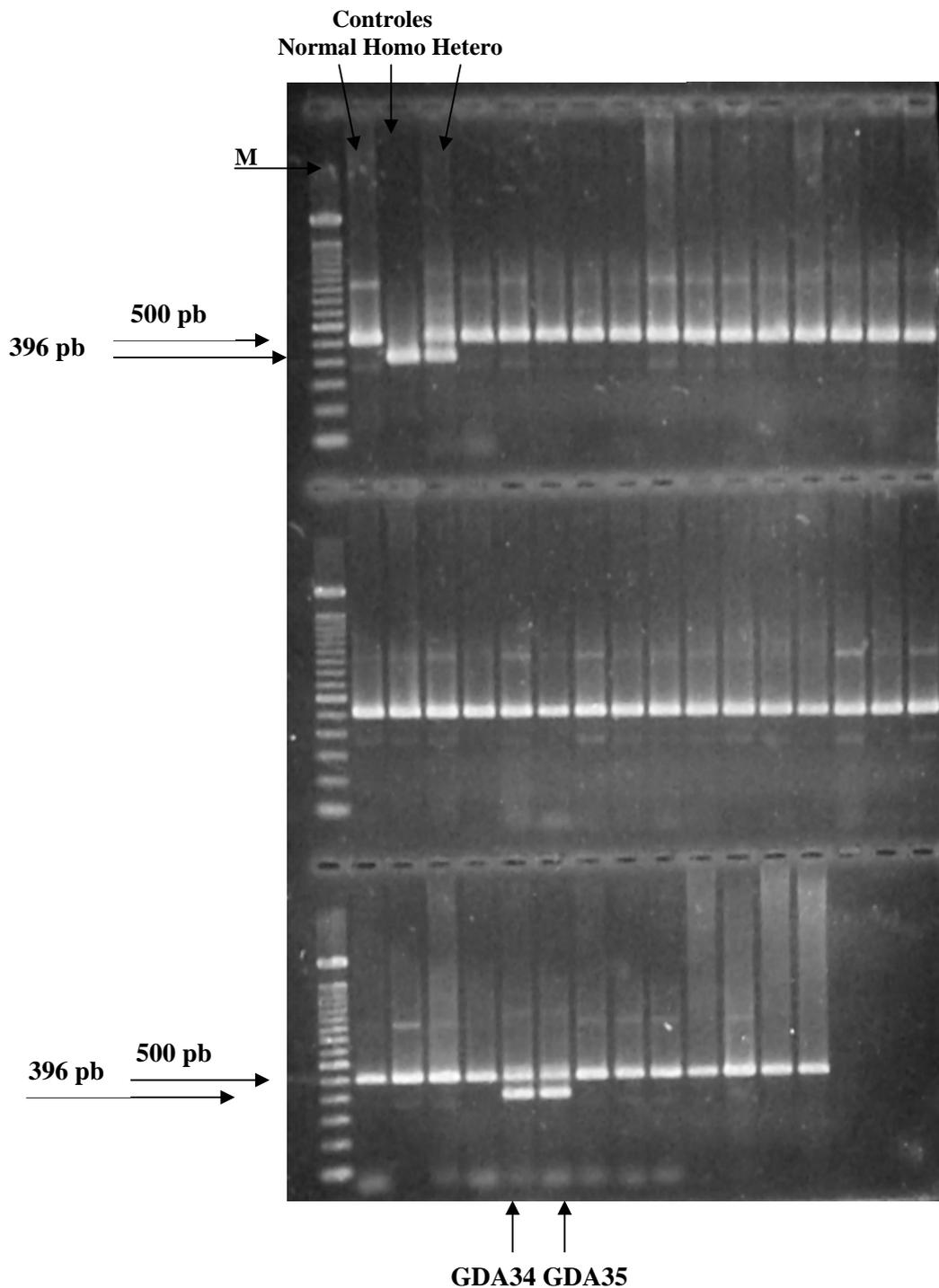
**Figura 19.** Fotografia do produto de AS-PCR, em gel de agarose 1,5%, dos pacientes do grupo GDA, com a mutação 35delG, e seus familiares. As setas indicam o paciente GDA01 e seus familiares heterozigotos (GF2, GF4, GF5, GF7, GF9, GF10) e aqueles sem a mutação 35delG (GF1, GF3, GF6, GF8). M- marcador 100pb (Ladder<sup>®</sup>).

### 3.4 Técnica PCR para detecção da mutação $\Delta(GJB6 - D13S1830)$

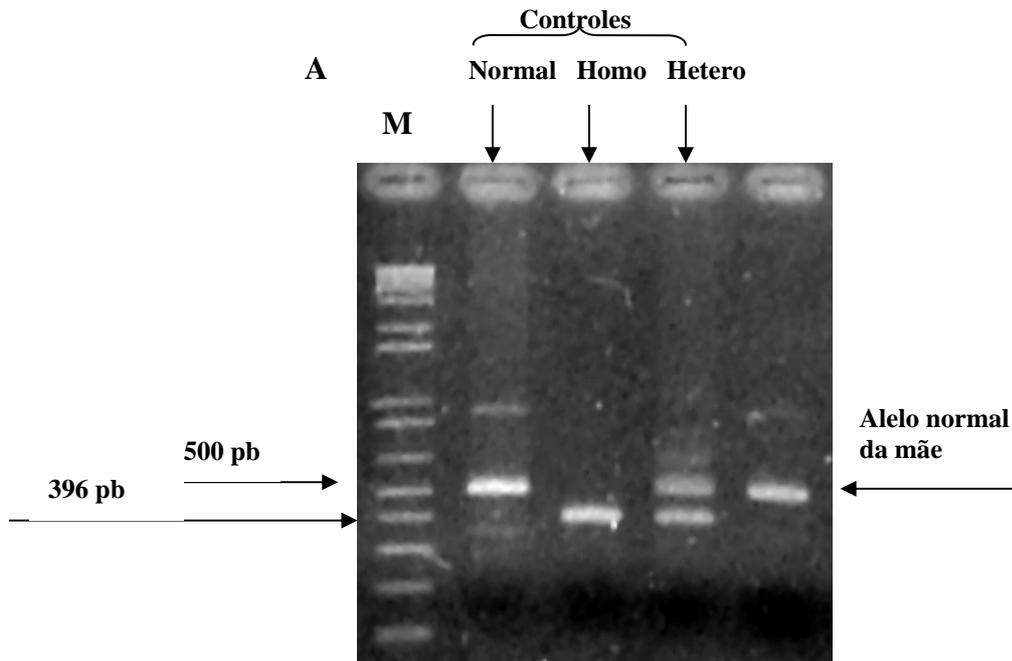
Todas as amostras dos pacientes do grupo GDA (33 casos-índice e 8 familiares afetados) foram submetidas à técnica de PCR para detecção da mutação

$\Delta$ (GJB6 - D13S1830) (Figura 20). Foi encontrada a mutação no caso-índice GDA34 (3%, DP<sub>%</sub>=2,96), o qual apresenta também a mutação 35delG (identificada pela AS-PCR), sendo um paciente heterozigoto composto e, no seu irmão afetado GDA35,

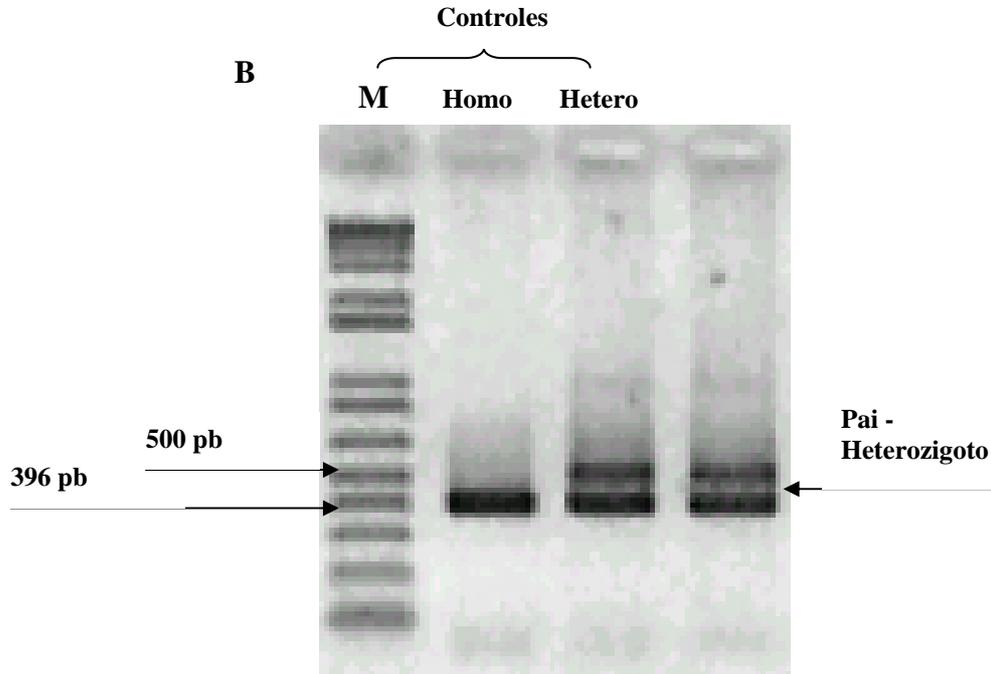
heterozigoto para 35delG, também foi encontrada a deleção pesquisada. Não foi encontrada a mutação na mãe, mas foi encontrada no pai dos pacientes (Figura 21).



**Figura 20.** Fotografia do produto de PCR para mutação  $\Delta$ (GJB6 - D13S1830), em gel de agarose 1,5%, dos pacientes do grupo GDA. As setas indicam os irmãos GDA34 e GDA35 heterozigotos para a mutação. M- marcador 100pb (Ladder<sup>®</sup>).



**Figura 21.** A. Fotografia do produto de PCR para mutação  $\Delta$ (GJB6 - D13S1830), em gel de agarose 1,5%, da mãe dos pacientes GDA34 e GDA35, indicada pela seta. M- marcador 100pb (Ladder<sup>®</sup>).



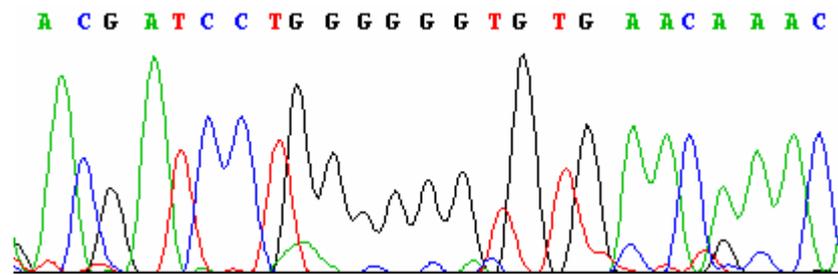
**Figura 21.** B. Fotografia do produto de PCR para mutação  $\Delta$ (GJB6 - D13S1830), em gel de agarose 1,5%, do pai dos pacientes GDA34 e GDA35, indicada pela seta. M- marcador 100pb (Ladder<sup>®</sup>).

### ***3.5 Seqüenciamento Automático***

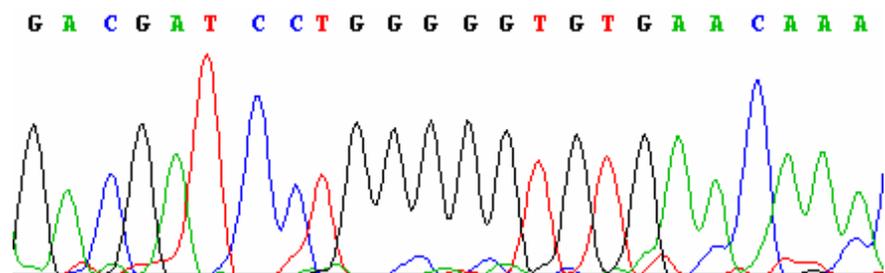
Dos pacientes homozigotos para a mutação 35delG do grupo GDA (n=5), diagnosticados pela AS-PCR, uma amostra foi submetida ao seqüenciamento automático direto para se obter o eletroferograma padrão de homozigoze para 35delG (Figura 22).

Ambos os fragmentos amplificados do gene GJB2 (Cx1F/Cx1R e Cx2F/Cx2R) dos casos-índice heterozigotos para 35delG (n=3) e dos que não apresentaram a mutação 35delG (casos-índice n=24, familiares afetados n=7) do grupo GDA, foram submetidos ao seqüenciamento para identificação da presença ou não de outras mutações no gene e, também, para se obter o eletroferograma padrão de heterozigoze para 35delG (Figura 23).

Controle Normal

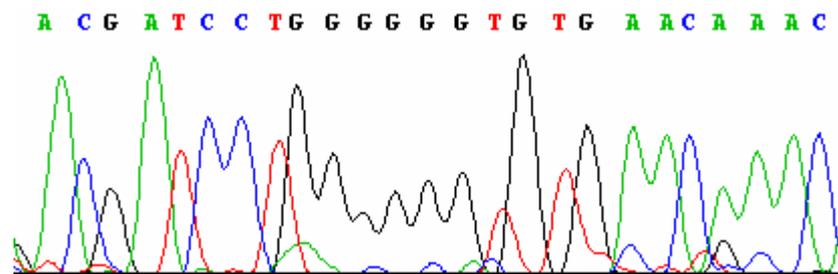


Homozigoto 35delG

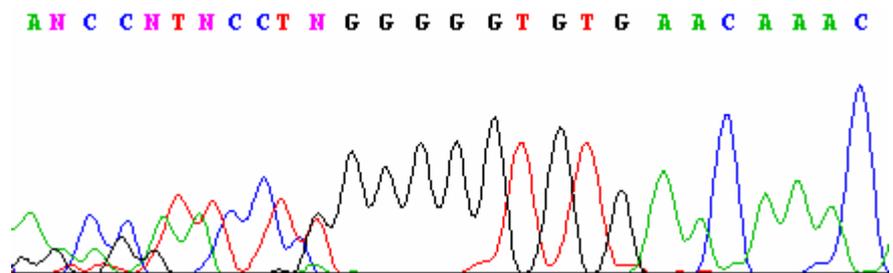


**Figura 22.** Eletroferograma da seqüência do gene GJB2 de um controle normal e do caso-índice GDA24, homozigoto para a mutação 35delG.

Controle Normal



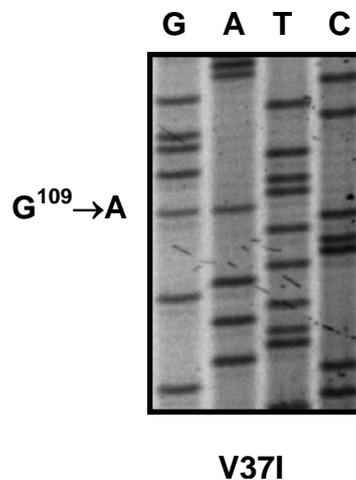
Heterozigoto 35delG



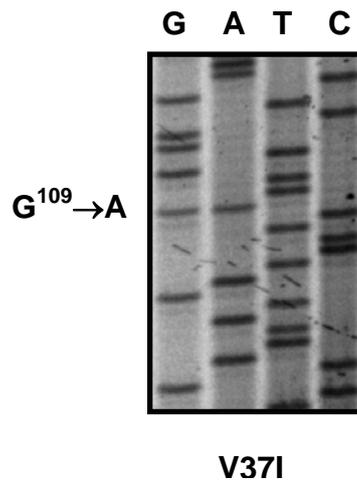
**Figura 23.** Eletroferograma da seqüência do gene GJB2 de um controle normal e do caso-índice GDA23, heterozigoto para a mutação 35delG.

Destas amostras que foram submetidas ao seqüenciamento automático, em 2 casos-índice heterozigotos para 35delG (6,0%, DP<sub>%</sub>=4,13) não foram identificadas mutações no outro alelo assim como, nos 24 (72,7% %, DP<sub>%</sub>=7,7) casos-índice sem a mutação 35delG e nos 7 (87,5%, DP<sub>%</sub>=4,4) familiares afetados, do Grupo GDA, não foram identificadas mutações em ambos os alelos do gene Cx26.

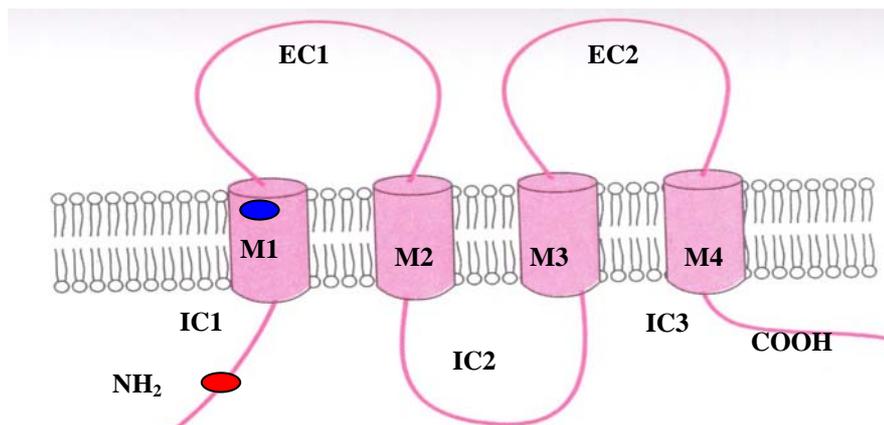
Pelo seqüenciamento automático pode-se determinar que, dentre os casos-índice heterozigotos para 35delG (n=3), que foram submetidos à técnica, 1 paciente (3,0%, DP<sub>%</sub>=2,96) apresentou a mutação V37I no outro alelo, sendo portanto, heterozigoto composto 35delG/V37I. As amostras de seus pais foram seqüenciadas: mãe (GF01) - heterozigota para mutação V37I (V37I/Normal) e pai (GF02) - heterozigoto para 35delG (35delG/Normal - identificada pela AS-PCR) (Figuras 24 a 26).



**Figura 24.** Fotografia do gel no local onde se observa a mutação V37I no gene GJB2 do paciente GDA01 - heterozigoto composto 35delG/V37I. A seta indica a substituição da guanina pela adenina, na posição 109 dos nucleotídeos.



**Figura 25.** Fotografia do gel no local onde se observa a mutação V37I no gene GJB2 da mãe (GF01) - V37I/N do paciente GDA01. A seta indica a substituição da guanina pela adenina, na posição 109 dos nucleotídeos.



**Figura 26.** Esquema da molécula da proteína conexina 26 com a localização aproximada das mutações encontradas no caso-índice GDA01 (35delG/V37I) e no familiar GF01 (V37I/Normal):

- - mutação 35delG
- - mutação V37I

Esquema modificado de Roberts *et al.*<sup>32</sup>

Em relação as amostras que apresentaram mobilidade eletroforética alterada, pela técnica SSCP, de ambos os grupos GDA (n=21) e GF (n=16), não foram identificadas mutações pela AS-PCR para 35delG, pela PCR para mutação  $\Delta$ (GJB6 - D13S1830) e pelo seqüenciamento automático.

### 3.6 Genótipos encontrados no estudo

A Tabela 4 apresenta os resultados gerais dos genótipos obtidos após análise molecular realizada nos 33 casos-índice e nos 8 familiares afetados do Grupo GDA e a correlação fenótipo/genótipo dos casos-índice, com mutação diagnosticada, está representada no Quadro 7. O Quadro 8 demonstra os genótipos encontrados nos pacientes GDA e em seus familiares com audição normal (GF).

**Tabela 4.** Distribuição dos pacientes (n) do Grupo GDA em relação aos genótipos encontrados pela análise molecular do gene GJB2 e da mutação  $\Delta$ (GJB6 - D13S1830).

Genótipo	Casos-índice		Familiares afetados	
	n (33)	%	n (8)	%
Heterozigoto 35delG	2	6,1	0	0
Homozigoto 35delG	5	15,2	0	0
Heterozigoto composto 35delG/V37I	1	3,0	0	0
Heterozigoto composto 35delG/ $\Delta$ (GJB6-D13S1830)	1	3,0	1	12,5
<b>Total</b>	9	27,3	1	12,5
Sem Mutação	24	72,7	7	87,5
<b>Total</b>	33	100	8	100

Foram encontradas, portanto, prevalências de 27,3% (DP<sub>%</sub>=7,7) da mutação 35delG nos casos-índice analisados (9/33), 21,2% (DP<sub>%</sub>=5,03) de alelos (14/66) com a mutação 35delG e de 12,5% (DP<sub>%</sub>=11,69) nos familiares afetados. Foi encontrada, também, prevalência de 3% (DP<sub>%</sub>=2,96) para cada uma das mutações, V37I e Δ(GJB6-D13S1830).

**Quadro 7.** Fenótipo e genótipo dos casos-índice com mutações no gene GJB2 e com a mutação Δ(GJB6-D13S1830).

<b>Casos-índice (GDA)</b>	<b>Início DA</b>	<b>Grau</b>	<b>Mutação Alelo1/Alelo2</b>	<b>Recorrência Familiar com Mutação</b>
1*	Pré-lingual	Grave	35delG/V37I	-----
10*	Pré-lingual	Grave	35delG/35delG	-----
15*	Pré-lingual	Grave	35delG/35delG	-----
23*	Pré-lingual	Grave	35delG/Normal	-----
24*	Pré-lingual	Grave	35delG/35delG	-----
25*	Pré-lingual	Profundo	35delG/35delG	-----
26*	Pré-lingual	Moderado	35delG/35delG	-----
34*	Pré-lingual	Grave	35delG/Δ(GJB6-D13S1830)	irmão GDA35 35delG/Δ(GJB6-D13S1830)
39*	Pré-lingual	Moderado	35delG/Normal	-----

GDA- Grupo Deficiente Auditivo, DA-Deficiência Auditiva

\*- Heredogramas

**Quadro 8.** Genótipo dos pacientes do Grupo GDA e seus familiares (GF) com audição normal.

Casos-índice (GDA)	Mutação Alelo1/Alelo2	Pais		Familiares afetados (GDA)	Mutação Alelo1/Alelo2	Familiares com audição normal (GF)	Mutação Alelo1/Alelo2
		Pai	Mãe				
1	35delG/V37I	35delG/N	V37I/N	-----	-----	irmã tio paterno tia paterna tia paterna tia paterna tio paterno primo paterno prima paterna	N/N 35delG/N 35delG/N N/N NA 35delG/N N/N 35delG/N 35delG/N
2	N/N	NA	NA	irmão (GDA31)	N/N	-----	-----
3	N/N	x	NA	-----	-----	irmão	NA
4	N/N	x	x	-----	-----	-----	-----
5	N/N	NA	NA	-----	-----	-----	-----
6	N/N	x	NA	-----	-----	-----	-----
7	N/N	NA	NA	-----	-----	-----	-----
8	N/N	x	NA	-----	-----	-----	-----
9	N/N	x	NA	-----	-----	-----	-----
10	35delG/35delG	x	35delG/N	-----	-----	avó materna	N/N
11	N/N	NA	NA	-----	-----	irmão	NA
12	N/N	NA	NA	-----	-----	-----	-----
13	N/N	NA	NA	-----	-----	-----	-----
14	N/N	x	x	-----	-----	-----	-----
15	35delG/35delG	x	35delG/N	-----	-----	-----	-----
16	N/N	x	x	-----	-----	-----	-----
17	N/N	x	x	irmã (GDA18) irmão (GDA19) irmão (GDA20)	N/N N/N N/N	-----	-----
21	N/N	x	x	-----	-----	-----	-----

**Continuação Quadro 8.** Genótipo dos pacientes do Grupo GDA e seus familiares (GF) com audição normal.

Casos-índice (GDA)	Mutação Alelo1/Alelo2	Pais		Familiares afetados (GDA)	Mutação Alelo1/Alelo2	Familiares com audição normal (GF)	Mutação Alelo1/Alelo2
		Pai	Mãe				
22	N/N	NA	NA	-----	-----	duas irmãs	NA/NA
23	35delG/Normal	x	x	-----	-----	-----	-----
24	35delG/35delG	x	35delG/N	-----	-----	-----	-----
25	35delG/35delG	35delG/N	35delG/N	-----	-----	-----	-----
26	35delG/35delG	35delG/N	NA	-----	-----	-----	-----
27	N/N	x	x	-----	-----	-----	-----
28	N/N	NA	N/N	mãe (GDA29)	N/N	-----	-----
30	N/N	x	x	-----	-----	-----	-----
32	N/N	NA	x	irmã (GDA33)	-----	-----	-----
34	35delG/ $\Delta$ (GJB6-D13S1830)	$\Delta$ (GJB6)/ Normal	35delG/N	irmão (GDA35)	35delG/ $\Delta$ (GJB6D13S1830)	-----	-----
36	N/N	x	x	-----	-----	-----	-----
37	N/N	NA	N/N	mãe (GDA38)	N/N	-----	-----
39	35delG/Normal	NA	NA	-----	-----	-----	-----
40	N/N	NA	NA	-----	-----	-----	-----
41	N/N	NA	NA	-----	-----	irmão gêmeo	N/N

GDA- Grupo Deficiente Auditivo. GF- Grupo dos Familiares com audição normal

N- Nenhuma alteração no gene GJBA e/ou sem a mutação  $\Delta$ (GJB6-D13S1830). NA- Não analisado

x- amostra não coletada

### 3.7 Padrões Audiométricos relacionados aos Diagnósticos Moleculares

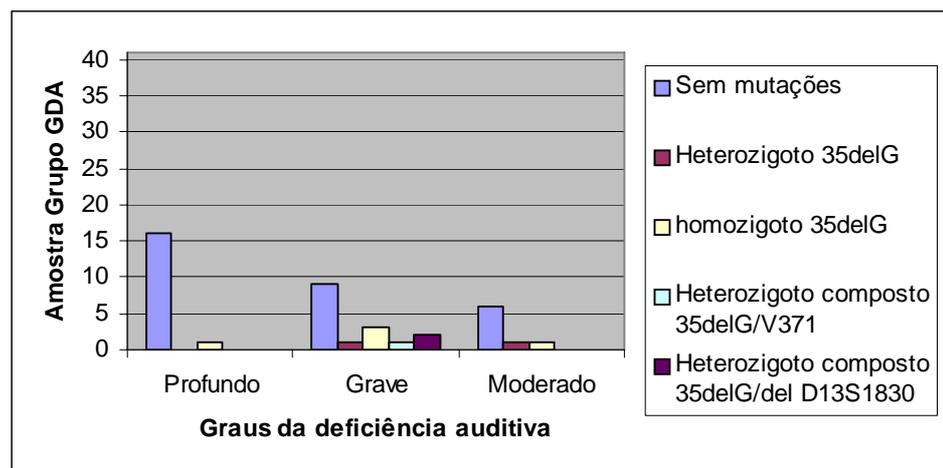
Pelas audiometrias realizadas nos pacientes do grupo GDA (n=41), encontrou-se os seguintes resultados em relação aos graus de perda:

.grau profundo - 17 pacientes (41,5%, DP<sub>%</sub>=7,69).

.grau grave - 16 pacientes (39,0%, DP<sub>%</sub>=7,61)

.grau moderado - 8 pacientes (19,5%, DP<sub>%</sub>=6,18)

Dos 5 pacientes homozigotos para 35delG, um apresentou grau profundo (2,43%, DP<sub>%</sub>=2,40), três apresentaram grau grave (7,31%, DP<sub>%</sub>=4,06) e um paciente apresentou grau moderado (2,43%, DP<sub>%</sub>=2,40). Dos dois pacientes heterozigotos para 35delG, um (2,43%, DP<sub>%</sub>=2,40) apresentou grau grave e o outro (2,43%, DP<sub>%</sub>=2,40) apresentou grau moderado. O paciente heterozigoto composto 35delG/V37I (2,43%, DP<sub>%</sub>=2,40) e os dois (4,87%, DP<sub>%</sub>=3,36) heterozigotos compostos 35delG/ $\Delta$ (GJB6-D13S1830) apresentaram grau grave (Figura 27). O predomínio das freqüências audiométricas foi de 4000 a 8000 Hertz (Hz).

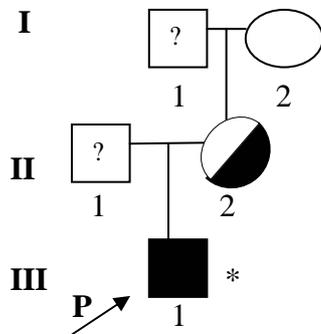


**Figura 27.** Gráfico demonstrando a distribuição dos pacientes sem mutações, heterozigotos e homozigotos para a mutação 35delG e dos pacientes heterozigotos compostos (35delG/V37I e  $\Delta$ (GJB6-D13S1830) do Grupo GDA (n=41), em relação aos graus de perda da deficiência auditiva.

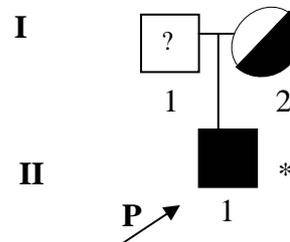
### 3.8 Heredogramas

A seguir, são apresentados os heredogramas<sup>165</sup> dos casos-índice do grupo GDA homozigotos (n=5) e heterozigotos (n=2) para 35delG, do paciente heterozigoto composto (35delG/V37I) e do outro paciente heterozigoto composto (35delG/ $\Delta$ (GJB6-D13S1830)).

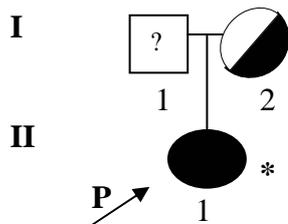
**GDA10\***



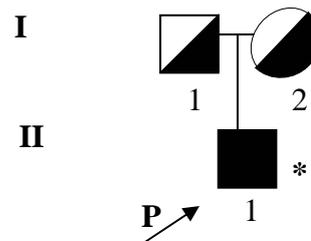
**GDA15\***



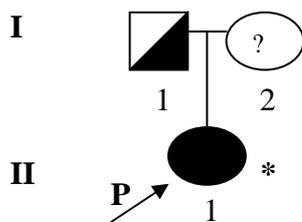
**GDA 24\***



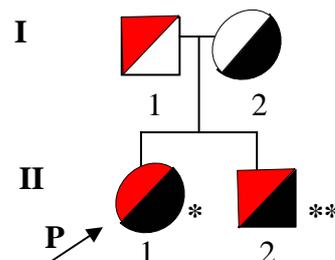
**GDA25\***



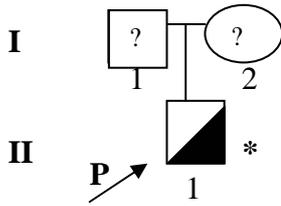
**GDA 26\***



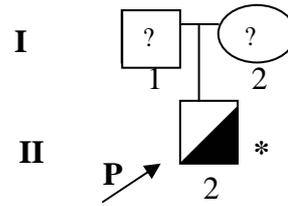
**GDA34\* e GDA35\*\***



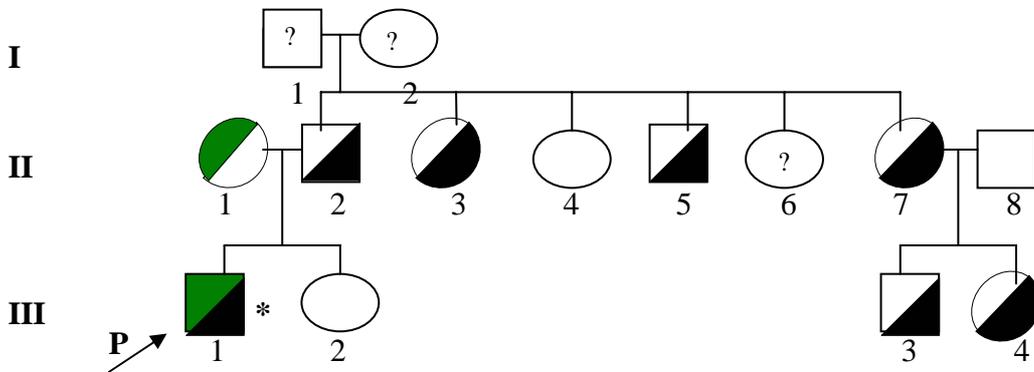
**GDA23\***



**GDA39\***



**GDA01\***



**Legenda**

- |  |   |
|--|---|
|  masculino normal   |  feminino normal   |
|  masculino não analisado  |  feminino não analisado  |
|  masculino homozigoto 35delG                                      |  feminino homozigoto 35delG                                      |
|  masculino heterozigoto 35delG                                    |  feminino heterozigoto 35delG                                    |
|  masculino heterozigoto composto 35delG/ $\Delta$ (GJB6-D13S1830) |  feminino heterozigoto composto 35delG/ $\Delta$ (GJB6-D13S1830) |
|  masculino heterozigoto composto 35delG/V37I                      |  feminino heterozigoto V37I/N                                    |
|  masculino heterozigoto $\Delta$ (GJB6-D13S1830)/N                |  caso-índice ("Proband")   |

**Figura 28.** Heredograma dos casos-índice com mutações no gene GJB2 e com a mutação  $\Delta$ (GJB6-D13S1830)<sup>165</sup>.

## **4 - DISCUSSÃO**

---

---

Este estudo, visando realizar a análise molecular do gene GJB2 em pacientes com deficiência auditiva sensorineural não-sindrômica, em São José do Rio Preto, SP, tem caráter inédito. Foram utilizados, como testes moleculares, a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR, PCR alelo-específico para 35delG e PCR para a mutação  $\Delta$ (GJB6-D13S1830), a Análise do Polimorfismo Conformacional de DNA de Cadeia Simples (SSCP) e o Sequenciamento Automático.

No presente estudo, foram encontradas prevalências da mutação 35delG de 27,3% nos casos-índice analisados, de 21,2% de alelos com a mutação e de 12,5% nos familiares afetados. Foi determinada também, prevalência de 3% para cada uma das mutações, V37I e  $\Delta$ (GJB6-D13S1830), encontradas no estudo. Estes resultados são concordantes com estudos já realizados e descritos na literatura, em várias populações.<sup>114,115,120,142,143,166,167</sup> A relativa contribuição da mutação 35delG para a deficiência auditiva não-sindrômica, nessas populações, variou de 0% (Oman, Koréia, Japão) a 70% (Itália, Espanha, Grécia), demonstrando a heterogeneidade genética existente entre os diversos países, apesar de alguns desses estudos terem sido baseados em pequeno número de pacientes, além dos critérios de investigação da deficiência e os métodos de rastreamento da mutação terem sido diferentes entre os mesmos.<sup>121,166-174</sup>

Mutações no gene GJB2 são responsáveis por cerca de 60% das deficiências auditivas não-sindrômicas recessivas. Dentre todas as mutações descritas, a mutação 35delG (deleção de uma guanina em uma sequência de seis guaninas na posição 30 a 35 dos nucleotídeos) é a mais comum em cerca de 60%-85% dos casos, e tem sido encontrada, praticamente, em todas as populações estudadas. Essas incluem as da Itália, Espanha,<sup>114</sup> Reino Unido<sup>116</sup>, Bélgica,<sup>117</sup> Estados Unidos,<sup>119</sup> Israel,<sup>120</sup> França,

Tunísia,<sup>126</sup> e, mais recentemente, as da Grécia,<sup>167</sup> Líbano,<sup>168</sup> Áustria,<sup>169</sup> China,<sup>175</sup> Brasil,<sup>139</sup> além das populações do Ira<sup>137</sup> e da Palestina.<sup>176</sup>

No Brasil, foi determinada a prevalência de 0,97% de portadores da mutação 35delG, aproximadamente 1:103 heterozigotos, em um rastreamento realizado em 620 neonatos, na região de Campinas, SP.<sup>138</sup> Em outro estudo realizado, em 62 pacientes com deficiência auditiva, mutações no gene GJB2 foram encontradas em 33,5% dos casos sendo que, somente a mutação 35delG foi identificada em 84,2% dos alelos mutantes.<sup>139</sup> A metodologia utilizada neste estudo, AS-PCR e seqüenciamento automático, foi semelhante às duas referências acima citadas, mas foi encontrada uma variação na freqüência dos alelos com a mutação 35delG. Este fato pode ser explicado pela diferença na amostra ou talvez pela composição étnica da população brasileira ser altamente heterogênea, ocorrendo a miscigenação entre vários grupos étnicos, principalmente, caucasóides e africanos, podendo ocorrer diferenças na prevalência, em diferentes regiões do País<sup>148</sup>. Há a necessidade de um estudo multicêntrico no Brasil para se determinar a real prevalência de mutações no gene GJB2, incluindo a mutação 35delG.

Após a realização da PCR alelo-específico para 35delG nos pacientes do estudo, em cinco deles a mutação 35delG foi identificada em somente um alelo, e em 31 pacientes a mutação não foi determinada. Quando nenhuma mutação é encontrada no gene GJB2 ou em pacientes com deficiência auditiva heterozigotos para 35delG, mutações no gene GJB6, pela sua estreita relação (cerca de 76% de aminoácidos idênticos) e local cromossômico próximo ao do gene GJB2, podem ser consideradas como responsáveis por ocasionar deficiência auditiva nesses pacientes<sup>143</sup>, devendo ser pesquisada, conforme realizado neste estudo.

Esse fato é explicado pois, além da proximidade do local cromossômico, as proteínas Cx26 e Cx30 podem formar canais heterotípicos tendo, na cóclea, a mesma distribuição celular. Sendo assim, as hipóteses fisiopatológicas, em relação às deficiências auditivas associadas as Cx26 e Cx30, são semelhantes<sup>46,143</sup>, sugerindo a existência de outra mutação numa região não explorada do gene GJB2 ou a possível coexistência do gene GJB6, isto é, uma origem digênica da deficiência auditiva, que poderia ser relacionada a uma suposta formação de conexons heteroméricos ou canais heterotípicos.<sup>46</sup> Essa suposição foi recentemente confirmada por estudos de transferência celular, com marcadores permeáveis às junções comunicantes, que demonstraram uma interrupção do fluxo pela conexão intercelular. O retorno do fluxo foi obtido pela oligomerização das conexinas Cx26 e Cx30, especialmente, sugerindo que ambas as conexinas formam conexons heteroméricos na orelha interna, com particulares propriedades essenciais para a audição. A perda da estrutura molecular desses canais heterotípicos, por certas mutações, pode ser a base para a natureza da deficiência auditiva não-sindrômica, em pacientes heterozigotos.<sup>177</sup>

Estudos recentes encontraram uma grande deleção de 342 mil pares de bases (342 Kb), próxima ao gene GJB6 [ $\Delta$ (GJB6 - D13S1830)], sugerindo que essa mutação pode causar deficiência auditiva não-sindrômica recessiva ou por uma deleção homozigota ou por uma penetrância digênica da deleção no gene GJB6 associada a uma mutação no gene GJB2 em *trans*, nos casos heterozigotos.<sup>143,178</sup> A maioria dos casos de deficiência auditiva genética resulta de mutações em um único gene mas, cada vez mais, um maior número de casos estão sendo identificados como tendo dois genes envolvidos.<sup>179</sup>

Um estudo multicêntrico, realizado em nove países, demonstrou que a mutação  $\Delta$ (GJB6-D13S1830) é mais frequente na França, Espanha, Israel, Reino Unido incluindo o Brasil, variando de 5,9% a 9,7% de todos os alelos estudados de pacientes com DFNB1, estando presente em cerca de 50% dos pacientes heterozigotos, na Espanha<sup>144</sup>. No presente estudo, foi encontrada a prevalência de 3,0% da deleção no gene GJB6 em heterozigose com a mutação 35delG, sendo estes dados concordantes com os da literatura.<sup>143,144</sup>

O sequenciamento automático permitiu a identificação da mutação V37I no outro alelo de um paciente heterozigoto para a mutação 35delG. Esta segunda mutação encontrada no paciente envolve a conversão do códon 37 do aminoácido valina para isoleucina (V37I), que ocorre no primeiro domínio transmembrânico (M1) da proteína conexina 26, pela substituição de uma guanina por uma adenina na posição 109 dos nucleotídeos.<sup>125</sup> Embora esta mutação tenha sido originalmente descrita como sendo um polimorfismo, sem efeito patogênico, por ter sido encontrada em heterozigose em um indivíduo que não apresentava deficiência auditiva<sup>116</sup>, estudos recentes comprovaram que a referida mutação está desprovida de uma atividade funcional.<sup>169,180</sup> Esses dados sugerem que a mutação V37I causa deficiência auditiva e confirmam a mais recente análise mutacional que identificou dois indivíduos com deficiência sensorineural, sendo um deles homozigoto para a mutação, enquanto o outro foi identificado como heterozigoto composto, isto é, um alelo com a mutação V37I e o outro alelo com a mutação patológica mais comum, a 35delG,<sup>142</sup> conforme encontrado neste estudo.

De acordo com a literatura, as análises do gene GJB2 em pacientes com deficiência auditiva frequentemente demonstram heterozigose, em aproximadamente

10% a 42% dos casos, à despeito de que a maioria das mutações é recessiva.<sup>142,181,182</sup> No presente estudo, encontrou-se frequência de 12,1% de casos-índice heterozigotos. A diferença, em relação à literatura, pode ser explicada pelo número pequeno da amostra ou que ainda não há um estudo multicêntrico que demonstre qual é a prevalência real de heterozigotos em nosso País.

As mutações mais comuns, no gene GJB2, podem ser determinadas pelos testes baseados na PCR. Entretanto, as mutações menos frequentes são mais facilmente detectadas pelo sequenciamento direto. Esse fato ressalta a importância de se investigar outras mutações no gene GJB2, além da 35delG, e a mutação  $\Delta$ (GJB6-D13S1830), por estas técnicas, conforme realizado neste estudo. Pela realização da técnica SSCP, não foi possível estabelecer uma relação entre o padrão de migração alterado encontrado em 51,21% das amostras do grupo GDA e em 36,36% das amostras do grupo GF e os resultados obtidos por ambas as técnicas da PCR e pelo sequenciamento direto.

A detecção de mutações no gene GJB2 pela técnica SSCP, de acordo com a literatura, não é de fácil execução e interpretação, é demorada e difícil de se reproduzir novamente.<sup>183</sup> Diferentes condições de SSCP foram testadas neste estudo (géis de poliacrilamida não-comerciais 7,5% e 10%, com instagel 30% e 50%, temperatura ambiente de, aproximadamente, 21°C, com diferentes tempos e voltagens) mas as amostras, em cada condição testada, se apresentaram com padrões de migração diferentes. O gel que apresentou melhor padrão para se identificar as bandas migrantes foi gel de poliacrilamida 10%, instagel 50% e voltagem fixa de 180V. Mas, todas as amostras que apresentaram migração alterada no gel de poliacrilamida, sob as condições anteriormente referidas, não apresentaram mutações pela PCR alelo-específico ou pelo sequenciamento direto.

A análise por SSCP foi empregada como metodologia para triagem inicial de mutações. Como verificado no presente estudo, todos os padrões anômalos no SSCP não corresponderam a alterações moleculares na seqüência nucleotídica. Isto é, os padrões de migração não corresponderam às migrações dos controles normais, apesar de não haver qualquer mutação. Estes padrões anômalos podem ser explicados devido determinadas seqüências nucleotídicas poderem originar mais de uma configuração estrutural, apesar de serem ainda desconhecidas as razões que levam à estas possíveis conformações. Também podem originar resultados duvidosos os parâmetros das condições da corrida como voltagem, amperagem, potência, temperatura, já que a temperatura da corrida e a densidade do gel podem, efetivamente, determinar a conformação e o padrão de migração das fitas simples. Um padrão anômalo é considerado confiável e relevante quando ele se repete independente das condições da corrida,<sup>184</sup> o que não ocorreu no presente estudo. A eficácia da técnica SSCP é garantida para fragmentos com até 200 pares de bases (>90%).<sup>184</sup> Vários métodos de SSCP foram comparados para fragmentos de até 350 pares de bases, determinando-se que 95% das mutações foram detectadas pelo PhastSystem<sup>®</sup> e apenas 68% pelo gel de poliacrilamida 5%, com glicerol 10%,<sup>185</sup> métodos esses, não utilizados no presente estudo.

Pode-se considerar, portanto, que a triagem inicial de mutações no gene GJB2 pela técnica SSCP, realizada no estudo, mostrou-se não sensível. O tamanho relativamente pequeno do gene GJB2 e por conter apenas um exon codificante, sugere a triagem de mutações por PCR alelo-específico seguido pelo seqüenciamento direto, quando necessário, eliminando-se a análise prévia por SSCP.

De acordo com os resultados audiométricos, no presente estudo foram encontrados no grupo GDA, 41,5% dos pacientes com deficiência auditiva de grau profundo, 39,0% dos pacientes de grau grave e 19,5% com deficiência de grau moderado, com predomínio nas altas frequências (4000 - 8000 Hz), e os pacientes homozigotos e heterozigotos para 35delG, predominando nos graus moderado-grave, sendo esta variabilidade no padrão concordante com os dados da literatura.<sup>186</sup> A variabilidade nos graus da deficiência auditiva em pacientes homozigotos para 35delG é grande. A maioria das deficiências autossômicas recessivas tem bastante consistência fenotípica, mesmo entre irmãos, o que não é observado para o gene GJB2-35delG. Isso sugere a possibilidade de outros fatores modularem a expressão do gene mutante.

Uma intrigante possibilidade é que pode haver um segundo gene conexina que compartilha funcionalmente com o gene GJB2. É concebível que uma segunda proteína conexina possa atuar como um substituto sob certas condições. Talvez existam genes modificadores em outros locais ou influências ambientais que ativam ou inativam as regiões promotoras do gene. Como a proteína Cx26 está envolvida na homeostase iônica da orelha interna, alguns destes pacientes podem ser capazes de ouvir, por apresentarem uma moderada perda auditiva, sugerindo mecanismos homeostáticos alternativos ou compensatórios. A perda da proteína Cx26 pode afetar, adversamente, o desenvolvimento do sistema auditivo, resultando em variações no grau de perda ou assimetria.<sup>186</sup> Influências ambientais, tais como ruídos, drogas ototóxicas, podem ser aditivos ou sinergistas com os defeitos causados por mutações no gene GJB2, aumentando assim, a perda auditiva.<sup>15,186</sup>

As avaliações clínicas dos pacientes deste estudo não sugerem que causas ambientais sejam os maiores fatores, uma vez que se identificou um padrão de

transmissão autossômico recessivo nos casos com a mutação 35delG. Além disso, os achados audiológicos destes pacientes, por terem apresentado audiometria semelhante àquela encontrada nos pacientes referidos na literatura com diagnóstico de deficiência auditiva causada por mutação no gene GJB2, confirmam que o mesmo está envolvido na etiologia da deficiência auditiva dos mesmos.<sup>118,133,142,149-151</sup>

Em, aproximadamente, um terço dos casos de deficiência auditiva, por mutações no gene GJB2, encontra-se padrão audiométrico de caráter progressivo de perda auditiva, contrariando os dois terços dos casos com o típico padrão não-progressivo. Isso significa que, uma criança com perda moderada pode evoluir para profunda e as terapias são muito diferentes entre esses dois tipos de graus de perda. As famílias que têm uma criança com perda moderada-grave ou profunda se beneficiarão pelas análises do gene GJB2.<sup>186</sup>

A alta frequência da mutação 35delG facilita o diagnóstico molecular e o aconselhamento genético para os casos recessivos e esporádicos. Conforme realizado neste estudo, a detecção de portadores nos parentes dos casos-índice e pais portadores pode ser viável, levando à prevenção da doença e reabilitação precoce das pessoas deficientes. A identificação da mutação 35delG logo após o nascimento, permitirá às famílias a modificar o processo educacional da criança deficiente auditiva.<sup>115</sup> As pesquisas para mutações no gene GJB2 são importantes para o aconselhamento genético. A mutação 35delG é fácil para se detectar e o teste é viável. Entretanto, uma vez que, grande parte dos pacientes com a mutação 35delG são homozigotos, análises mais abrangentes do gene GJB2 serão necessárias, em uma grande proporção dos casos, para distinguir os portadores heterozigotos comuns (portadores sãos) daqueles pacientes heterozigotos que apresentam a DFNB1. Essas análises e pesquisas mais abrangentes

[incluindo as análises de toda a região codificante, a região promotora, a região não-codificante do gene e análises da mutação  $\Delta$ (GJB6-D13S1830)] devem ser direcionadas pelas características clínicas da DFNB1.<sup>118</sup>

A facilidade e os benefícios do rastreamento para mutações no gene GJB2 deverão torná-lo uma importante questão de saúde pública, para que as determinações do diagnóstico precoce da deficiência auditiva sejam bem estabelecidas. Os testes moleculares para o gene GJB2 não podem auxiliar todas as crianças com deficiência e não deve ser razoável esperar que tais testes substituam os já existentes programas de triagem. Se os programas de triagem, com as otoemissões acústicas e audiometria de tronco encefálico, devem incluir os testes moleculares para GJB2 é uma outra questão. O uso dos testes moleculares associados em conjunto com os testes audiológicos que não permitiram um diagnóstico, auxiliarão a definir um grupo no qual, aproximadamente, 40% não responderão ao uso de amplificadores e necessitarão de intensivo e precoce tratamento fonoaudiológico, sendo que, muitas dessas crianças serão candidatas ao implante de cóclea.<sup>142,186</sup>

O aconselhamento genético de famílias com pais com audição normal e uma única criança deficiente auditiva tem sido, até então, muito difícil devido a inexistência de testes genéticos para identificar mutações específicas, principalmente nos países em desenvolvimento. Na maioria dos casos, dado o importante papel das causas ambientais da deficiência auditiva pré-lingual, é difícil reconhecer se a deficiência auditiva é de origem genética.<sup>15</sup> Há necessidade de se informar sobre os avanços genéticos para a população geral e para a população deficiente auditiva e de se treinar profissionais para o aconselhamento genético com uma compreensão da lingüística e diferenças culturais dos deficientes auditivos.<sup>187</sup>

Os testes genéticos para a deficiência auditiva têm se tornado uma realidade, pois têm mudado o padrão de avaliação dos pacientes com deficiência e poderão ser utilizados pelos médicos para propósitos diagnósticos e como base para a reabilitação.<sup>118,188</sup> Nos próximos anos, certamente, haverá uma expansão do papel dos testes genéticos e o aconselhamento não se limitará aos resultados reprodutivos. O tratamento, a reabilitação e o controle das decisões serão baseados em diagnósticos genéticos precisos e específicos. Embora os testes possam ser confusos para os profissionais médicos que não estão habituados com os mesmos, em sua prática diária, os mesmos são uma importante parte dos cuidados médicos. Novas descobertas e tecnologias expandirão e aumentarão a complexidade destes testes e se tornará uma responsabilidade dos otolaringologistas e pediatras se familiarizarem com as recentes descobertas e incluírem, em seus protocolos de investigação, os testes genéticos.<sup>188</sup>

Esses dados suportam o uso futuro dos testes genéticos, tal como o PCR alelo-específico (AS-PCR), designado para identificar a mutação 35delG, pois possibilita a detecção do portador e o diagnóstico pré-natal, em grande proporção de casos, e pode ser um valioso complemento aos rastreamentos audiométricos para identificar neonatos com deficiência auditiva hereditária, em diferentes populações, por ser simples, rápido e de baixo custo.<sup>119,188-190</sup> O uso desse teste pode facilitar o diagnóstico e a habilitação precoces em uma substancial porcentagem de crianças deficientes e, também, pode proporcionar aos pais valiosas informações em relação à terapêutica e ao prognóstico.<sup>190</sup>

Embora o genótipo, obtido após os testes genéticos, não prediz o grau de perda auditiva em uma específica criança, um significativo número de crianças (30%-57%) terá deficiência de grau profundo e outras (26%-30%) são esperadas terem grau

grave,<sup>133</sup> conforme encontrado neste estudo. O conhecimento do genótipo permitirá aos médicos, fonoaudiólogos, educadores e médicos-geneticistas aconselharem os pais mais apropriadamente. O aconselhamento genético de pais de pacientes com deficiência auditiva esporádica permitirá avaliar o risco de uma futura criança poder ter deficiência auditiva semelhante.<sup>133,166,191</sup> As crianças diagnosticadas antes dos seis meses de idade e um bem-sucedido tratamento com amplificação, se possível, terão chances muito maiores de desenvolver, normalmente, a fala e a linguagem.<sup>192</sup>

É importante fornecer informações precisas e definitivas sobre a atual prevalência das mutações no gene GJB2; embora exista um consenso geral sobre a prevalência dos casos autossômicos recessivos documentados, a natureza dos casos esporádicos é ainda controversa, o que torna difícil, portanto, o diagnóstico e o aconselhamento genético da deficiência auditiva, nesses casos.<sup>111</sup> Devido a facilidade do diagnóstico molecular da DFNB1 alguns profissionais, provavelmente, se confrontarão com as questões do diagnóstico pré-natal. A discussão ética deve levar em consideração a existência da ampla variação dos graus de perda da deficiência auditiva por mutações no gene GJB2, mesmo entre famílias, e a boa qualidade de vida que as crianças com deficiência pré-lingual podem ter com um adequado programa de educação e auxílio à audição (incluindo o implante coclear).<sup>118</sup> Da mesma forma, a conscientização da população sobre as causas da deficiência auditiva está em relação direta com padrões de experiência e com a formação educacional, circunstâncias essas que, por sua vez, estão relacionadas com a disponibilidade econômica, localização geográfica e existência de serviços médicos.<sup>3,174</sup>

A demora entre a suspeita e o diagnóstico diminui irremediavelmente as possibilidades de tratamento e reabilitação dessas crianças, pois se a intervenção não

ocorrer precocemente haverá prejuízo na área da comunicação com significativa morbidade, influenciando de maneira negativa a capacidade auditiva e o aprendizado, em todas as suas formas tendo, portanto, conseqüência nas atividades sociais e perdas de oportunidades profissionais.<sup>2,4</sup> Por outro lado, é surpreendente como alguns pais e até mesmo alguns profissionais mostram relutância em aceitar a deficiência auditiva, considerando-a de menor valor, traduzindo o amplo desconhecimento sobre a importância que tem a audição para o desenvolvimento dos processos conceituais que sustentam o pensamento do homem e, conseqüentemente, a fala.<sup>3</sup>

É imprescindível que haja considerável interesse em estabelecer a prevalência e os tipos de mutações que causam a deficiência auditiva não-sindrômica no Brasil, por parte de todos os profissionais que lidam com estes pacientes. Esta informação poderá fornecer o projeto de um simples, mas específico e econômico teste, como o teste AS-PCR, para a detecção destas mutações, principalmente a 35delG, pela sua maior prevalência, conforme realizado neste estudo. A identificação das causas genéticas da deficiência auditiva é fundamental para permitir o aconselhamento genético das famílias afetadas e potencialmente importante para a implantação de um programa de triagem neonatal genético em todo o País, o qual pode levar à significativas reduções em gastos médico-hospitalares e melhorias na saúde pública, proporcionando uma vida digna a todos os pacientes.

## **5 - CONCLUSÕES**

---

---

1) Mutações no gene GJB2 são responsáveis por, aproximadamente, um quarto da deficiência auditiva sensorineural não-sindrômica, na população do estudo.

2) A deficiência auditiva nos pacientes com mutações no gene GJB2 é pré-lingual, de grau moderado-grave a profundo, com predomínio nas frequências agudas.

3) A técnica SSCP não foi sensível para detecção de mutações no gene GJB2.

4) A reação PCR alelo-específico (AS-PCR) é um método de fácil execução para rastreamento da mutação mais comum do gene conexina 26, a mutação 35delG.

5) A investigação da mutação  $\Delta$ (GJB6 - D13S1830) deve ser feita no pacientes heterozigotos para o gene GJB2.

6) A ausência de mutações, em ambos os alelos, no gene Cx26, não descarta a possibilidade de mutações em outros genes nos pacientes com deficiência auditiva, o que sugere a necessidade de acompanhamento para estudos posteriores.

7) Há necessidade da implantação de programas de prevenção e triagem neonatal para diagnóstico precoce de deficiência auditiva e sua etiologia genética, a fim de reabilitação adequada e aconselhamento genético.

## **6 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

---

---

1. Parving A & Christensen B. Children younger than 4 years of age, referred to an audiological department. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol* 1992; 23:161-70.
2. Ruben RJ. Communication disorders in children: a challenge for health care. *Prev Med* 1993; 22:585-8.
3. Peñaloza-López Y, López-Reyna V, Luna-Poblano A. Detección temprana de sordera prelingüística. *Bol Md Hosp Infant Mex* 1988; 45:155-60.
4. Davidson J, Hyde M, Alberti PW. Epidemiologic patterns in childhood hearing loss: a review. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol* 1989; 17:239-66.
5. Montalt J, Barona R, Armengot M, Basterra J. Otitis media secretoria en niños con hipoacusia neurosensorial grave. *An Otorhinolaringol Ibero Am* 1997; 24:27-37.
6. American College of Medical Genetics. Genetics Evaluation Guidelines for the Etiologic Diagnosis of Congenital Hearing Loss. *Genet Med* 2002; 4:162-71.
7. National Institutes of Health Consensus Statement. Early identification of hearing impairment in infants and young children. *NIH Consensus Statement* 1993; 11:1-24.
8. Joint Committee on Infant Hearing Year 2000 Position Statement. Principles and guidelines for early hearing detection and intervention programs. 2003; <http://www.audiology.org/professional/positions/jcih-early.php>.
9. World Health Organization. Report of the informal working group on prevention of deafness and hearing impairment programme planning. Geneva: WHO, 1991.

10. Paparella MM, Fox RY, Schachern PA. Diagnosis and treatment of sensorineural hearing loss in children. *Otolaryngol Clin North Am* 1989; 22:51-74.
11. Morton NE. Genetic epidemiology of hearing impairment. *Ann N Y Acad Sci* 1991; 630:16-31.
12. Marazita ML, Ploughman LM, Rawlings B, Remington E, Arnos KS, Nance WE. Genetic epidemiological studies of early-onset deafness in the US school-age population. *Am J Med Genet* 1993; 46:486-91.
13. Davis AC. The prevalence of hearing impairment and reported hearing disability among adults in Great Britain. *Int J Epidemiol* 1989; 18:911-7.
14. Mustafa T, Arnos KS, Pandya A. Advances in hereditary deafness. *Lancet* 2001; 358:1082-90.
15. Simões AM, Maciel-Guerra AT. A surdez evitável: predominância de fatores ambientais na etiologia da surdez neurossensorial profunda. *J Ped* 1992; 68:254-7.
16. Lalwani AK, Castelein CM. Cracking the auditory genetic code: nonsyndromic hereditary hearing impairment. *Am J Otol* 1999; 20:115-32.
17. Online Mendelian Inheritance In Man, OMIM-National Library of Medicine, Bethesda, MD. 2003; <http://www.ncbi.nlm.gov/omim>.
18. McGill JJ. The genetics of sensorineural deafness. *Med J Aust* 1991; 154:572-4.
19. Petit C. Genes responsible for human hereditary deafness: symphony of a thousand. *Nature Genet* 1996; 14:385-91.
20. Van Camp G, Willems PJ, Smith RJH. Nonsyndromic hearing impairment: unparalleled heterogeneity. *Am J Hum Genet* 1997; 60:758-64.

21. Skvorak Giersch AB, Morton CC. Genetic causes of nonsyndromic hearing loss. *Curr Opin Pediatr* 1999; 11:551-7.
22. Oliveira JAA. Fisiologia Clínica da Audição – Cóclea Ativa. In: Lopes Filho O & Campos CAH. *Tratado de ORL*. São Paulo:Rocca; 1994. p.510-30.
23. Poirier J, Dumas J-LR, Catala M, André J-M, Gherardi RK, Bernaudin J-F. *Histologia Molecular - Texto e Atlas*. São Paulo:Santos; 2003. p.56-66.
24. Poirier J, Dumas J-LR, Catala M, André J-M, Gherardi RK, Bernaudin J-F. *Histologia Molecular - Texto e Atlas*. São Paulo:Santos; 2003. p.257-74.
25. Maillet M. *Biologia Celular*. São Paulo:Santos; 2003. p.11-80.
26. Lim JD, Kalinec F. Cell and molecular basis of hearing. *Kidney International* 1998; 53:104-13.
27. Weil D, Lévy G, Sahly I, Levi-Acobas F, Blanchar S, et al. Human myosin VIIA responsible for the Usher1B syndrome: a predicted membrane-associated motor protein expressed in developing sensory epithelia. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; 93:3232-7.
28. Wang A, Liang Y, Fridell RA, Probst FJ, Wilcox ER, Touchman JW, et al. Association of unconventional myosin MYO15 mutations with human nonsyndromic deafness DFNB3. *Science* 1998; 280:1447-51.
29. Melchionda S, Ahituv N, Bisceglia L, Sobe T, Glaser F, et al. MYO6, the human homologue of the gene responsible for deafness in *Snell's waltzer* mice, is mutated in autosomal dominant nonsyndromic hearing loss. *Am J Hum Genet* 2001; 69:635-40.

30. Lynch ED, Lee MK, Morrow JE, Welsh PL, Léon PE, King MC. Non-syndromic deafness DFNA1 associated with mutation of a human homolog of the *Drosophila* gene *diaphanous*. *Science* 1997; 278:1315-8.
31. Gillespie PG, Molecular machinery of auditory and vestibular transduction. *Curr Opin Neurobiol* 1995; 5:449-55.
32. Roberts WM, Howard J, Hudspeth AJ. Hair cells: transduction, tuning and transmission in the inner ear. *Ann Rev Cell Biol* 1988; 4:63-92.
33. Alberts B, Bray D, Johnson A, et al. *Essential Cell Biology: an introduction to the molecular biology of the cell*. New York:Garland Publish; 1998. p.370-406.
34. Steel KP, Bussoli TJ. Deafness gene: expressions of surprise. *Trends Genet* 1999; 15:207-11.
35. Steel KP. Science, medicine, and the future: new interventions in hearing impairment. *BMJ* 2000; 320:622-5.
36. Chaib H, Place C, Salem N, Chardenoux S, Vincent C, et al. A gene responsible for a sensorineural nonsyndromic recessive deafness maps to chromosome 2p22-23. *Hum Mol Genet* 1996; 5:155-8.
37. Yasunaga S, Grati M, Cohen-Salmon M, et al. A mutation in OTOF, encoding otoferlin, a FER-1-like protein, causes DFNB9, a nonsyndromic form of deafness. *Nat Genet* 1999; 21:363-9.
38. Kikuchi T, Adams JC, Miyabe Y, So E, Kobayashi T. Potassium ion recycling pathway via gap junction systems in the mammalian cochlea and its interruption in hereditary nonsyndromic deafness. *Med Electron Microsc* 2000; 33:51-6.
39. Jentsch TJ. Neuronal KCNQ potassium channels: physiology and role in disease. *Nat Rev Neurosci* 2000; 1:21-30.

40. Beisel KW, Nelson NC, Delimont DC, Fritzsich B. Longitudinal gradients of KCNQ4 expression in spiral ganglion and cochlear hair cells correlate with progressive hearing loss in DFNA2. *Brain Res Mol Brain Res* 2000; 82:137-49.
41. Kelsell DP, Dunlop J, Hodgins MB. Human diseases: clues to cracking the connexin code? *Trends Cell Biol* 2001; 11:2-6.
42. Shibata Y, Kumai M, Nishi K, Nakamura K. Diversity and molecular anatomy of gap junctions. *Med Electron Microsc* 2001; 34:153-9.
43. Neyroud N, Tesson F, Denjoy I, Leibovici M, Donger C, et al. A novel mutation in the potassium channel gene KVLQT1 causes the Jervell and Lange-Nielsen cardioauditory syndrome. *Nat genet* 1997; 15:186-9.
44. Tyson J, Tranebjaerg L, Bellman S, Wren C, Taylor JF, Bathen J, et al. Isk and KvLQT1: mutation in either of the two subunits of the slow component of the delayed rectifier potassium channel can cause Jervell and Lange-Nielsen syndrome. *Hum Mol Genet* 1997; 6:2179-85.
45. Melman YF, Domènech A, de La Luna S, McDonald TV. Structural determinants of KVLQT1 control by the KCNE family of proteins. *J Biol Chem* 2001; 276:6439-44.
46. Petit C, Levilliers J, Hardelin J-P. Molecular genetics of hearing loss. *Annu Rev Genet* 2001; 35:589-646.
47. Van Camp G, Smith RJH. Hereditary Hearing Loss Homepage. 2003; <http://www.uia.ac.be/dnalab/hhh>.
48. Bussoli TJ, Steel KP. The molecular genetics of inherited deafness - current and future applications. *J Laringol Otol* 1998; 112:523-30.

49. Denoyelle F, Marlin S, Petit C, Garabédian E-N. Surdités neurosensorielles d'origine génétique. *Rev Prat* 2000; 50:146-9.
50. Corwin JT. Identifying the genes of hearing, deafness, and dysequilibrium. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; 95:12080-2.
51. Barker DF, Hostikka SL, Zhou J, Chow LT, Oliphant AR, Gerken SC, et al. Identification of mutations in the COL4A5 collagen gene in Alport syndrome. *Science* 1990; 248:1224-7.
52. Tassabehji M, Read AP, Newton VE, Harris R, Balling R, Gruss P & Strachan T. Waardenburg's syndrome patients have mutations in the human homologue of the Pax-3 paired box gene. *Nature* 1992; 355:635-6.
53. Prezant TR, Agapian JV, Bohlman MC, Bu X, Öztas S, et al. Mitochondrial ribosomal RNA mutation associated with both antibiotic-induced and non-syndromic deafness. *Nat Genet* 1993; 4:289-94.
54. Avraham KB, Hasson T, Steel KP, Kingsley DM, Russel LB, et al. The mouse *Snell's waltzer* deafness gene encodes an unconventional myosin required for structural integrity of inner ear hair cells. *Nat Genet* 1995; 11:369-75.
55. Gibson F, Walsh J, Mburu P, Varela A, Brown KA, et al. A type VII myosin encoded by the mouse deafness gene *Shaker-1*. *Nature* 1995; 374:62-4.
56. de Kok YJM, van der Maarel SM, Bitner-Glindzicz M, Huber I, Monaco AP, et al. Association between X-linked mixed deafness and mutations in the POU domain gene POU3F4. *Science* 1995; 267:685-8.
57. Nance WE, Setleff R, McLeod A, Sweeney A, Cooper C, et al. X-linked mixed deafness with congenital fixation of the stapedial footplate and perilymphatic gusher. *Birth Defects* 1971; 7:64-9.

58. Brunner HG, van Bennekom CA, Lambermon EMM, Oei TL, Cremers CWRJ, et al. The gene for X-linked progressive mixed deafness with perilymphatic gusher during stapes surgery (DFN3) is linked to PGK. *Hum Genet* 1988; 80:337-40.
59. Kelsell DP, Dunlop J, Stevens HP, Lench NJ, Liang, JN, Parry G, Mueller RF, Leigh IM. Connexin 26 mutations in hereditary non-syndromic sensorineural deafness. *Nature* 1997; 387:80-3.
60. Leon PE, Raventos H, Lynch E, Morro J, King M-C. The gene for an inherited form of deafness maps to chromosome 5q31. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992; 89:5181-4.
61. Lalwani AK, Jackler RK, Sweetow RW, Lynch ED, Raventos H, et al. Further characterization of the DFNA1 audiovestibular phenotype. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 1998; 124:669-702.
62. Berg JS, Powel BC, Cheney RE. A millennial myosin census. *Mol Biol Cell* 2001; 12:780-94.
63. Mermall V, Post PL, Mooseker MS. Unconventional myosins in cell movement, membrane traffic, and signal transduction. *Science* 1998; 279:527-33.
64. Oliver TN, Berg JS, Cheney RE. Tails of unconventional myosins. *Cell Mol Life Sci* 1999; 56:243-57.
65. Titu MA, Gilbert SP. The diversity of molecular motors: an overview. *Cell Mol Life Sci* 1999; 56:181-3.

66. Liu XZ, Walsh J, Mburu P, Kendrick-Jones J, Cope MJTV, et al. Mutations in the myosin VIIA gene cause non-syndromic recessive deafness. *Nat Genet* 1997; 16:188-90.
67. Weil D, Kussel P, Blanchar S, Levy G, Levi-Acobas F, Drira M, et al. The autosomal recessive isolated deafness, DFNB2, and the Usher 1B syndrome are allelic defects of the myosin-VIIA gene. *Nature Genet* 1997; 16:191-3.
68. Weil D, Blanchard S, Kaplan J, Guilford P, Gibson F, et al. Defective myosin VIIA gene responsible for Usher syndrome type 1B. *Nature* 1995; 374:60-1.
69. Guilford P, Ben Arab S, Blanchard S, Levilliers J, Weissenbach J, et al. A non-syndromic form of neurosensory, recessive deafness maps to the pericentromeric region of chromosome 13q. *Nat Genet* 1994, 6:24-8.
70. Chaib H, Lina-Granade G, Guilford P, Plauchu H, Levilliers J, et al. A gene responsible for a dominant form of neurosensory non-syndromic deafness maps to the NSRD1 recessive deafness gene interval. *Hum Mol Genet* 1994; 3:2219-22.
71. Denoyelle F, Lina-Granade G, Plauchu H, Bruzzone R, Chaib H, Levi-Acobas F, et al. Connexin 26 gene linked to a dominant deafness. *Nature* 1998; 393:319-20.
72. Xia JH, Liu CY, Tang BS, Pan Q, Huang L, Dai HP, et al. Mutations in the gene encoding gap junction protein beta-3 associated with autosomal dominant hearing impairment. *Nat Genet* 1998; 20:370-3.
73. Coucke PJ, Van Hauwe P, Kelley PM, Kunst H, Schatteman I, Van Velzen D, et al. Mutations in the KCNQ4 gene are responsible for autosomal dominant deafness in four DFNA2 families. *Hum Mol Genet* 1999; 8:1321-8.

74. Kubisch C, Schroeder BC, Friedrich T, Lutjohann B, El-Amraoui A, Marlin S, Petit C, Jentsch TJ. KCNQ4, a novel potassium expressed in sensory outer hair cells, is mutated in dominant deafness. *Cell* 1999; 96:437-46.
75. Grifa A, Wagner CA, D'Ambrosio L, Melchionda S, Bernardi F, et al. Mutations in GJB6 cause nonsyndromic autosomal dominant deafness at DFNA3 locus. *Nat Genet* 1999; 23:16-8.
76. Vahava O, Morell R, Lynch ED, Weiss S, Kagan, ME, Ahituv N, et al. Mutation in transcription factor POU4F3 associated with inherited progressive hearing loss in humans. *Science* 1998; 279:1950-4.
77. Frydman M, Vreugde S, Nageris B, Weiss S, Vahava O, et al. Clinical characterization of genetic hearing loss caused by a mutation in the POU4F3 transcription factor. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 2000; 126:633-7.
78. Verhoeven K, Van Laer L, Kirschhofer K, Legan PK, Hughes DC, et al. Mutations in the human alpha-tectorin gene cause autosomal dominant non-syndromic hearing impairment. *Nat Genet* 1998; 19:60-2.
79. Govaerts PJ, De Ceulaer G, Daemers K, Verhoeven K, Van Camp G, et al. A new autosomal-dominant locus (DFNA12) is responsible for a nonsyndromic, midfrequency, prelingual and nonprogressive sensorineural hearing loss. *Am J Otol* 1998; 19:718-23.
80. Mustapha M, Weil D, Chardenoux S, Elias S, El-Zir E, et al. An alpha-tectorin gene causes a newly identified autosomal recessive form of sensorineural pre-lingual non-syndromic deafness, DFNB21. *Hum Mol Genet* 1999; 8:409-12.

81. Moreno-Pelayo MA, del Castillo I, Villamar M, Romero L, Hernandez-Calvin FJ, et al. A cysteine substitution in the zona pellucida domain of alpha-tectorin results in autosomal dominant, postlingual, progressive, mid-frequency hearing loss in a Spanish family. *J Med Genet* 2001; 30:e13.
82. Migliosi V, Modamio-Hoybjor S, Moreno-Pelayo MA, Rodriguez-Ballesteros M, Villamar M, Telleria D, et al. Q829X, a novel mutation in the gene encoding otoferlin (OTOF), is frequently found in Spanish patients with prelingual non-syndromic hearing loss. *J Med Genet* 2002; 39:502-6.
83. Willems PJ. Mechanism of disease: genetic causes of hearing loss. *N Engl J Med* 2000; 342:1101-9. 83.
84. Zhang JT, Nicholson BJ. The topological structure of connexin 26 and its distribution compared to connexin 32 in hepatic gap junctions. *J Membr Biol* 1994; 139:15-29.
85. Yeager M. Structure of cardiac gap junction intercellular channels. *J Struct Biol* 1998; 121:231-45.
86. Forge A, Becker D, Casalotti S, et al. Gap junctions and connexin expression in the inner ear. *Novartis Found Symp* 1992; 219:134-50.
87. Lautermann J, ten Cate WJ, Altenhoff P, Grummer R, et al. Expression of the gap-junction connexin 26 and 30 in the rat cochlea. *Cell Tissue Res* 1998; 294:415-20.
88. Kikuchi T, Kimura RS, Paul DL, Tasaka T, Adams JC. Gap junction systems in the mammalian cochlea. *Brain Res Brain Res* 2000; 32:163-6.
89. Unwin PN. Gap junction structure and the control of cell-to-cell communication. *Ciba Found Symp* 1987; 125:78-91.

90. Rousset B. Introduction to the structure and functions of junction communications or gap junctions. *Ann Endocrinol* 1996; 57:476-80.
91. Peracchia C, Wang XC. Connexin domains relevant to the chemical gating of gap junction channels. *Braz J Med Biol Res* 1997; 30:577-90.
92. Perkins G, Goodenough DA, Sosinsky GE. Three-dimensional structure of the gap junction connexon. *Biophys J* 1997; 72(Pt1):533-44.
93. Goodenough DA. The structure and permeability of isolated hepatocyte gap junctions. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 1976; 40:37-43.
94. Evans WH, Ahmad S, Diez J, George CH, Kendall JM, Martin PE. Trafficking pathways leading to the formation of gap junctions. *Novartis Found Symp* 1999; 219:44-54.
95. Falk MM. Cell-free synthesis for analysing the membrane integration, oligomerization, and assembly characteristics of gap junction connexins. *Methods* 2000; 20:165-79.
96. Fraser SE. Gap junctions and cell interactions during development. *Trends Neurosci* 1985; 8:3-4.
97. Staehelin LA. Structure and functions of intercellular junctions. *Int Rev Cytol* 1981; 90:243-8.
98. Goodenough DA. The structure of cell membranes involved in intercellular communication. *Am J Clin Pathol* 1975; 63:636-45.
99. Sosinsky GE. Image analysis of gap junction structures. *Electron Microsc Rev* 1992; 5:59-76.

100. Kikushi T, Kimura RS, Paul DL, Adams JC. Gap junctions in the rat cochlea: immunohistochemical and ultrastructural analysis. *Anat Embriol* 1995; 191:101-18.
101. Alberts B, Bray D, Johnson A, et al. *Molecular Biology of the Cell*. 3<sup>a</sup> ed. New York:Garland Publish; 1994. p.949-1009.
102. Ahmad S, Diez JA, George CH, Evans WH. Synthesis and assembly of connexins in vitro into homomeric and heteromeric functional gap junction hemichannels. *Biochem J* 1999; 339:247-53.
103. Yeager M, Nicholson BJ. Structure of gap junction intercellular channels. *Curr Opin Struct Biol* 1996; 6:183-92.
104. Amon T. Membrane Channel. Wide open connection to adjacent cells-Gap Junction. 2003; <http://www.colos1.fri.uni-lj.si/~colos/COLOS/EXAMPLES/BIOLOGY/GapJun1lgwa.html>.
105. White TW, Bruzzone R. Multiple connexin proteins in single intercellular channels: connexin compatibility and functional consequences. *Bioenerg Biomembr* 1996; 28:339-50.
106. Kumar NM. Molecular biology of the interactions between connexins. *Novartis Found Symp* 1999; 219:6-16.
107. Laboratoire des Biomembranes et Signalisation Cellulaire. 2003; <http://www.labo.univ-poitiers.fr/lbpc/FR/CJ/def-cxine.htm>.
108. Luk J. Cell adhesion molecules and immunity. 2003; <http://www.hku.hk/surgery/researchlab/id31.htm>.

109. Kammen-Jolly K, Ichiki H, Sholtz AW, Gsenger M, Kreczy A, Schrott-Fischer A. Connexin 26 in human fetal development of the inner ear. *Hear Res* 2001; 160:15-21.
110. Zelante L, Gasparini P, Estivill X, Melchionda S, D'Agruma L, Govea N, Mila M, Della Monica M, et al. Connexin 26 mutations associated with the most common form of non-syndromic neurosensory autosomal recessive deafness (DFNB1) in Mediterraneans. *Hum Molec Genet* 1997; 6:1605-9.
111. Murgia A, Orzan E, Polli R, Martella M, Vinazi C, Leonardi E, Arslan E, Zacchello F. Cx26 deafness: mutation analysis and clinical variability. *J Med Genet* 1999; 36:829-32.
112. Jun AI, McGuirt WT, Hinojosa R, Green GE, Fischel-Ghodsian N, Smith RJ. Temporal bone histopathology in connexin 26-related hearing loss. *Laryngoscope* 2000; 110:269-75.
113. Maw MA, Allen-Powell DR, Goodey RJ, Stewart IA, Nancarrow DJ, et al. The contribution of the DFNB1 locus to neurosensory deafness in a Caucasian population. *Am J Hum Genet* 1995; 57:629-35.
114. Gasparini P, Estivill X, Volpini V, Totaro A, Castellvi-Bel S, et al. Linkage of DFNB1 to non-syndromic neurosensory autosomal-recessive deafness in Mediterranean families. *Eur J Hum Genet* 1997; 5:83-8.
115. Estivill X, Fortina P, Surrey S, Rabionet R, Melchionda S, D'Agruma L, Mansfield E, Rappaport E, et al. Connexin 26 mutations in sporadic and inherited sensorineural deafness. *Lancet* 1998; 351:394-8.

116. Kelley PM, Harris DJ, Comer BC, Askew JW, Fowler T, Smith SD, Kimberling WJ. Novel mutations in the connexin 26 gene (GJB2) that cause autosomal recessive (DFNB1) hearing loss. *Am J Hum Genet* 1998; 62:792-9.
117. Lench N, Houseman M, Newton V, Van Camp G, Mueller RF. Connexin 26 mutations in sporadic non-syndromical sensorineural deafness. *Lancet* 1998; 351:415.
118. Denoyelle F, Marlin S, Weil D, Moatti L, Chauvin P, Garabedian EN, Petit C. Clinical features of the prevalent form of childhood deafness, DFNB1, due to a connexin 26 gene defect: implications for genetic counselling. *Lancet* 1999; 17:1298-303.
119. Green GE, Scott DA, McDonald JM, Woodworth GG, Sheffield VC, Smith RJ. Carrier rates in the midwestern United States for GJB2 mutations causing inherited deafness. *JAMA* 1999; 281:2211-6.
120. Sobe T, Vreugde S, Shahin H, Berlin M, Davis N, et al. The prevalence and expression of inherited connexin 26 mutations associated with non-syndromic hearing loss in the Israeli population. *Hum Genet* 2000; 106:50-7.
121. Gabriel H, Kupsch P, Sudendey Jr, Winterhager E, Jahnke K, et al. Mutations in the connexin 26/GJB2 gene are the most common event in non-syndromic hearing loss among the German population. *Hum Mutat* 2001; 17:521-2.
122. Löffler J, Nekahm D, Hirst-Stadlmann A, Günther B, Menzel H-J, et al. Sensorineural hearing loss and the incidence of Cx26 mutations in Austria. *Eur J Hum Genet* 2001; 9:226-30.
123. Abe S, Usami S, Shinkawa H, Kelley PM, Kimberling WJ. Prevalent connexin 26 gene (GJB2) mutations in Japanese. *J Med Genet* 2000; 37:41-3.

124. Kudo T, Ikeda K, Kure S, Matsubara Y, Oshima T, et al. Novel mutations in the connexin 26 gene (GJB2) responsible for childhood deafness in the Japanese population. *Am J Med Genet* 2000; 90:141-5.
125. Rabionet R, Gasparini P, Estivill X. Connexins and Deafness Homepage. 2003; <http://www.crg.es/deafness/cx26mut.php>.
126. Denoyelle F, Weil D, Maw MA, Wilcox AS, Lench NJ, Allen-Powell DR, Osborn AH, Dahl H-HM, Middleton A, Houseman MJ, Dode C, Marlin S, and 17 others. Prelingual deafness: high prevalence of a 30delG mutation in the connexin 26 gene. *Hum Molec Genet* 1997; 6:2173-7.
127. Gasparini P, Rabionet R, Barbujani G, Melchionda S, Petersen M, et al. High carrier frequency of the 35delG deafness mutation in European populations. *Eur J Hum Genet* 2000; 8:19-23.
128. Morell RJ, Kim HJ, Goforth L, Friderici K, et al. Mutations in the connexin 26 gene (GJB2) among Ashkenazi Jews with nonsyndromic recessive deafness. *N Engl J Med* 1998; 339:1500-5.
129. Hamelmann C, Amedofu GK, Albrecht K, Muntau B, Gelhaus A, et al. Pattern of connexin 26 (GJB2) mutations causing sensorineural hearing impairment in Ghana. *Hum Mutat* 2001; 18:84-5.
130. Park HJ, Hahn SH, Chun YM, Park K, Kim HN. Connexin 26 mutations associated with nonsyndromic hearing loss. *Laryngoscope* 2000; 110:1535-8.
131. Antoniadis T, Rabionet R, Kroupis C, Aperis GA, Econimides J, et al. High prevalence in the Greek population of the 35delG mutation in the connexin 26 gene causing prelingual deafness. *Clin Genet* 1999; 55:381-2.

132. Storm K, Willocx S, Flothmann K, Van Camp G. Determination of the carrier frequency of the common GJB2 (connexin-26) 35delG mutation in the Belgian population using an easy and reliable screening method. *Hum Mutat* 1999; 14:263-6.
133. Cohn ES, Kelley PM. Clinical phenotype and mutations in connexin 26 (DFNB1/GJB2), the most common cause of childhood hearing loss. *Am J Med Genet* 1999; 89:130-6.
134. Carrasquillo MM, Zlotogora J, Barges S, Chakravarti A. Two different connexin 26 mutations in an inbred kindred segregating non-syndromic recessive deafness: implications for genetic studies in isolated populations. *Hum Molec Genet* 1997; 6:2163-72.
135. Van Laer L, Couke P, Mueller RF, Caethoven G, Flothmann K, et al. A common founder for the 35delG GJB2 gene mutation in connexin 26 hearing impairment. *J Med Genet* 2001; 38:515-8.
136. Rothrock CR, Murgia A, Sartorato EL, Leonardi E, Wei S, Lebeis SL, Yu LE, Elfenbein JL, Fisher RA, Friederici KH. Connexin 26 35delG does not represent a mutational hotspot. *Hum Genet* 2003; 113:18-23.
137. Najmabadi H, Cucci RA, Sahebjam S, Kouchakian N, Farhadi M, Kahrizi K, et al. GJB2 mutations in Iranians with autosomal recessive non-syndromic sensorineural hearing loss. *Hum Mutat* 2002; 19:572-7.
138. Sartorato EL, Gottardi E, Oliveira CA, Magna LA, Annichino-Bizzacchi JM, Seixas CA, Maciel-Guerra AT. Determination of the frequency of the 35delG allele in Brazilian neonates. *Clin Genet* 2000; 58:339-40.

139. Oliveira CA, Maciel-Guerra AT, Sartorato EL. Deafness resulting from mutations in the GJB2 (connexin 26) gene in Brazilian patients. *Clin Genet* 2002; 61:354-8.
140. Angeli S, Utrera R, Dib S, Chiossone E, Naranjo C, Henriquez O, Porta M. GJB2 gene mutations in childhood deafness. *Acta Otolaryngol* 2000; 120:133-6.
141. Menéndez Ibis, del Castillo I, Carrillo B, Villamar M, León MP, Uriarte A, Moreno F. Mutaciones del gen de la conexina 26 (GJB2) en familias cubanas con sorderas no sindrómicas autosómicas recesivas. *Rev Cubana Invest Biomed* 2001; 20:167-72.
142. Wilcox SA, Saunders K, Osborn AH, Arnold A, Wunderlich J, et al. High frequency hearing loss correlated with mutations in the GJB2 gene. *Hum Genet* 2000; 106:399-405.
143. del Castillo I, Villamar M, Moreno-Pelayo MA, del Castillo FJ, Alvarez A, Telleria D, et al. A deletion involving the connexin 30 gene in nonsyndromic hearing impairment. *N Engl J Med* 2002; 346:243-9.
144. del Castillo I, Moreno-Pelayo MA, del Castillo FJ, Brownstein Z, Marlin S, Adina Q, et al. Prevalence and Evolutionary Origins of the del(GJB6-D13S1830) Mutation in the DFNB1 Locus in Hearing Impaired Subjects: a Multicenter Study. *Am J Hum Genet*. No prelo 2003.
145. Lerer I, Sagi M, Malamud E, Levi H, Raas-Rothschild A, et al. Contribution of connexin 26 mutations to non-syndromic deafness in Ashkenazi patients and the variable phenotypic effect of the mutation 167delT. *Am J Med Genet* 2000; 95:53-6.

146. Fuse Y, Doi K, Hasegawa T, Sugii A, Hibino H, et al. Three novel connexin 26 gene mutations in autosomal recessive non-syndromic deafness. *Neuroreport* 1999; 10:1853-7.
147. Brobby GW, Muller-Myhsok, Horstmann RD. Connexin 26 R143W mutation associated with recessive nonsyndromic sensorineural deafness in Africa. *N Engl J Med* 1998; 338:548-50.
148. Oliveira CA, Alexandrino F, Abe-Sandes K, Silva Jr WA, Maciel-Guerra AT, Magna LA, Sartorato EL. Frequency of 35delG in the GJB2 gene in samples of Caucasians, Asians and African Brazilians. *Hum Biol.* No prelo 2003.
149. Mueller RF, Nehammer A, Middleton A, Houseman M, Taylor GR, Bitner-Glindzicz M, et al. Congenital non-syndromal sensorineural hearing impairment due to connexin 26 gene mutations - molecular and audiological findings. *Int J Ped Otorhinolaryngol* 1999; 50:3-13.
150. Walch C, Anderhuber W, Köle W, Berghold A. Bilateral sensorineural hearing disorders in children: etiology of deafness and evaluation of hearing tests. *Int J Ped Otorhinolaryngol* 2000; 53:31-8.
151. Engel-Yeger B, Zaaroura S, Zlotogora J, Shalev S, Hujerir Y, Carrasquillo M, Barges S, Pratt H. The effects of a connexin 26 mutation - 35delG - an oto-acoustic emissions and brainstem evoked potentials: homozygotes and carriers. *Hear Res* 2002; 163:93-100.
152. Orita M, Susuki Y, Sekiya T, Hayashi K. Rapid and sensitive detection of point mutation and DNA polymorphisms using the polymerase chain reaction. *Genomics* 1989; 5:874-9.

153. Haefliger JA, Bruzzone R, Jenkins NA, Gilbert DJ, Copeland NG, Paul DL. Four novel members of the connexin 26 family of gap junction proteins: molecular cloning, expression and chromosome mapping. *J Biol Chem* 1992; 267:2057-64.
154. Saiki RK. The design and optimization of the PCR. In: Erlich HÁ, editor. *PCR technology – Principles and applications for DNA amplification*. New York: Oxford University Press; 1992. p.7-16.
155. Orita M, Iwahana H, Kanazawa H, Hayashi K, Sekya T. Detection of polymorphisms of human DNA by gel electrophoresis as single strand conformation polymorphisms. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989; 86:2766-70.
156. Bassam BJ & Caetano-Anollés G. Silver staining of DNA in polyacrylamide gels. *Appl Biochem Biotechnol* 1993; 42:181-8.
157. Grompe M. The rapid detection of unknown mutation in nucleic acids. *Nat Genet* 1993; 5:111-7.
158. Farah, SB. *DNA Segredos & Mistérios*. São Paulo: Sarvier; 1997. 276p.
159. McCabe ER, McCabe LL. State-of-the-art for DNA technology in newborn screening. *Acta Paediatr Suppl* 1999; 88:58-60.
160. Abdel-Rahman SZ, Nouraldeen AM, Ahmed AE. Molecular interaction of 2,3-[14C]-acrylonitrile with DNA in gastric tissues of rat. *J Biochem Toxicol* 1994; 9:121-8.
161. Scott DA, Kraft ML, Carmi R, Ramesh A, Elbedour K, Yari Y, Srisailapathy CRS, et al. Identification of mutation on the connexin 26 gene that cause autosomal recessive nonsyndromic hearing loss. *Hum Mutat* 1998; 11:387-94.

162. Little S. Amplification-refractory mutation system (ARMS) analysis of point mutations. In: Dracopoli NC, Haines JL, Korf BR, et al (ed). *Current Protocols in Human Genetics*. New York, NY:John Wiley & Sons Inc; 1998:981-9.
163. Antoniadis T, Gronskov K, Sand A, Pampanos A, Brondum-Nielsen K, Petersen MB. Mutation analysis of the GJB2 (connexin 26) gene by DGGE in Greek patients with sensorineural deafness. *Hum Mutat* 2000; 16:7-12.
164. Sanger F, Coulson AR. A rapid method for determining sequences in DNA by primed synthesis with DNA polymerase. *J Mol Biol* 1975; 94:444-8.
165. Bennett RL, Steinhaus KA, Stefanie BU, O'Sullivan CK, Resta RG, Doyle-Lochner D, et al. Recommendations for Standardized Human Pedigree Nomenclature. *Am J Hum Genet* 1995; 56:745-54.
166. Kenna MA, Wu B-L, Cotanche DA, Korf BR, Rehm HL. Connexin 26 studies in patients with sensorineural hearing loss. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 2001; 127:1037-42.
167. Pampanos A, Economides J, Iliadou V, Neou P, Leotsakos P, Voyiatzis, et al. Prevalence of GJB2 mutations in prelingual deafness in the Greek population. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol* 2002; 65:101-8.
168. Mustapha M, Salem N, Delague V, Chouery E, Ghassibeh M, Rai M, Loiselet J, Petit C, Megarbane A. Autosomal recessive non-syndromic hearing loss in the Libanese population: prevalence of the 30delG mutation and report of two novel mutations in the connexin 26 (GJB2) gene. *J Med Genet* 2001; 38:e36.
169. Frei K, Szuhai K, Lucas T, Weipoltshammer K, Schofer C, Ramsebner R, et al. Connexin 26 mutations in cases of sensorineural deafness in eastern Austria. *Eur J Hum Genet* 2002; 10:427-32.

170. Rabionet R, Zelante L, Lopez-Bigas N, D'Agruma L, Melchionda S, Restagno G, et al. Molecular basis of childhood deafness resulting from mutations in the GJB2 (connexin 26) gene. *Hum Genet* 2000; 106:40-4.
171. Prasad S, Cucci RA, Green GE, Smith RJH. Genetic testing for hereditary hearing loss: connexin 26 (GJB2) allele variants and two novel deafness-causing mutations (R32C and 645-648delTAGA). *Hum Mutat* 2000; 16:502-8.
172. Baris I, Kilinc MO, Tolun A. Frequency of the 35delG mutation in the connexin 26 gene in Turkish hearing impaired patients. *Clin Genet* 2001; 60:452-5.
173. Simsek M, Al-Wardy N, Al-Khayat A, Shanmugakonar M, Al-Bulushi T, Al-Khabory M, et al. Absence of deafness associated connexin 26 (GJB2) gene mutations in the Omani population. *Hum Mutat* 2001; 18:545-6.
174. Dahl H-HM, Saunders K, Kelly TM, Osborn AH, Wilcox S, Wesson-Cone B, et al. Prevalence and nature of connexin 26 mutations in children with non-syndromic deafness. *MJA* 2001; 175:191-4.
175. Liu XZ, Xia XJ, Ke XM, Ouyang XM, Du LL, Liu YH, et al. The prevalence of connexin 26 (GJB2) mutations in the Chinese population. *Hum Genet* 2002; 111:394-7.
176. Shahin H, Walsh T, Sobe T, Lynch E, King MC, Avraham KB, Kanaan M, Genetics of congenital deafness in the Palestinian population: multiple connexin 26 alleles with shared origins in the Middle East. *Hum Genet* 2002; 110:284-9.
177. Marziano NK, Casalotti SO, Portelli AE, Becker DL, Forge A. Mutations in the gene for connexin 26 (GJB2) that cause hearing loss have a dominant negative effect on connexin 30. *Hum Mol Genet* 2003; 12:805-12.

178. Wu BL, Kenna M, Lip V, Irons M, Platt O. Use of a multiplex PCR/sequencing strategy to detect both connexin 30 (GJB6) 342Kb deletion and connexin 26 (GJB2) mutations in cases of childhood deafness. *Am J Med Genet* 2003; 212:102-8.
179. Nance WE. The genetics of deafness. *Ment Retard Disabil Res Rev* 2003; 9:109-19.
180. Bruzzone R, Veronesi V, Gomès D, Bicego M, Duval N, Marlin S, et al. Loss-of-function and residual channel activity of connexin 26 mutations associated with non-syndromic deafness. *FEBS Letters* 2003; 533:79-88.
181. Pandya A, Arnos KS, Xia XJ, Welch KO, Blanton SH, Friedman TB, et al. Frequency and distribution of GJB2 (connexin 26) and GJB6 (connexin 30) mutations in a large North American repository of deaf probands. *Genet Med* 2003; 5:295-303.
182. Stevenson VA, Ito M, Milunsky JM. Connexin-30 deletion analysis in connexin-26 heterozygotes. *Genet Test* 2003; 7:151-4.
183. Rabionet R, Estivill X. Allele specific oligonucleotide analysis of the common deafness mutation 35delG in the connexin 26 (GJB2) gene. *JMed Genet* 1999; 36:260-1.
184. Kurvinen K, Hietanen S, Syrjänen K, Syrjänen S. Rapid and effective detection of mutations in the p53 gene using nonradioative single-strand conformation polymorphism (SSCP) technique applied on PhastSystem®. *J Virol Methods* 1995; 51:43-54.
185. Vidal-Puig A, Moller DE. Comparative Sensitivity of Alternative Single-Strand Conformation Polymorphism (SSCP) Methods. *Biotechniques* 1994; 17:490-6.

186. Cohn ES, Kelley PM, Fowler TW, Gorga MP, Lefkowitz, et al. Clinical studies of families with hearing loss attributable to mutations in the connexin 26 gene (GJB2/DFNB1). *Pediatrics* 1999; 103:546-50.
187. Antoniadis T, Pampanos A, Petersen MB. Prenatal diagnosis of prelingual deafness: carrier testing and prenatal diagnosis of the common GJB2 35delG mutation. *Prenat Diagn* 2001; 21:10-3.
188. Smith RJ, Hone S. Genetic screening for deafness. *Pediatr Clin North Am* 2003; 50:315-29.
189. Baris I, Koksall V. Multiplex detection of common mutations in the connexin-26 gene. *Genet Test* 2003; 7:63-5.
190. Fernandez-Burriel M, Rodriguez-Quinones F. A simple method of screening for the common connexin-26 gene 35delG mutation in nonsyndromic neurosensory autosomal recessive deafness. *Genet Test* 2003; 7:147-9.
191. Marlin S, Garabedian E-N, Roger G, Moatti L, Matha N, Lewin P, Petit C, Denoyelle F. Connexin 26 gene mutations in congenitally deaf children. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 2001; 127:927-33.
192. Yoshinaga-Itano C, Sedey AL, Coulter DK, Mehl AL. Language of early-and later-identified children with hearing loss. *Pediatrics* 1998; 102:1161-71.

Referências Bibliográficas - International Committee of Medical Journal Editors (Vancouver Style). Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical Journals. *Ann Intern Med* 1997; 126:36-47.



## **8 - APÊNDICES**

---

---

# APÊNDICE 1

## TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

São José do Rio Preto,----- de..... de.....

Eu, -----, na qualidade de responsável legal do(a) paciente----- autorizo a participação no estudo "Análise molecular do gene conexina26 em pacientes com deficiência auditiva sensorineural não-sindrômica". Este estudo está sob a responsabilidade da Dr<sup>a</sup> Vânia Belintani Piatto (FAMERP), CREMESP 66.642. Serão coletadas amostras de sangue de veia superficial do antebraço para a pesquisa de surdez de causa desconhecida. Estou ciente dos riscos mínimos que esta pesquisa pode trazer que são: infecção leve no local da punção e pequeno acúmulo de sangue (hematoma) superficial. Também fui informado de que os resultados desta pesquisa serão publicados em revista científica da área médica resguardando o sigilo médico, não os utilizando para outros fins. Para tanto, autorizo a divulgação dos resultados. Fui esclarecido ainda, sobre a liberdade de retirar meu consentimento a qualquer momento e não mais participar desta pesquisa. Também estou ciente dos benefícios que esta pesquisa pode trazer para o diagnóstico e prevenção da deficiência auditiva.

\_\_\_\_\_  
Paciente ou Responsável Legal  
RG.....

\_\_\_\_\_  
Dr<sup>a</sup> Vânia Belintani Piatto  
CREMESP 66.642  
Fone (17) 2105700 R5859

## APÊNDICE 2

### DISCIPLINA DE OTORRINOLARINGOLOGIA E SERVIÇO DE CIRURGIA DE CABEÇA E PESCOÇO - FAMERP

Nome:

Idade:                      Sexo:                      Profissão:                      Est. Civil:  
Local Trabalho:                      Religião:  
Endereço:

Queixa Principal:

Histórico da Doença Atual:

Revisão dos Sistemas:

História Progressiva de:

Diabetes Tipo I:	Hipertensão Arterial:
Doença Respiratória:	Tuberculose:
Câncer:	Doença Cardiovascular:
Exposição à ruídos/gases:	Outros:

Investigação dos fatores de risco para deficiência auditiva: pré-natais, neonatais, pós natais, história gestacional, tipo de parto, casamento consanguíneo:

Uso de Medicções: presente:                      passado:

Sensibilidade a drogas:

Hábitos Sociais:

Álcool:                      Tabagismo:                      Outros:

História Familiar:

Surdez:	Câncer:	Doença Pulmonar:
Alergias:	Hipertensão Arterial:	Doença Cardiovascular:
Diabetes Tipo I:	Tuberculose:	Outros: