

CRISTIANA MAGNI

DEFICIÊNCIA AUDITIVA NÃO-SINDRÔMICA: AVALIAÇÃO GENÉTICA (GENES DE CONEXINAS) E FENOTÍPICA (CLÍNICA E AUDIOLÓGICA)

Tese apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Genética, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, como requisito para obtenção do grau de Doutor em Genética.

Orientadora:

Profa. Dra. Eleidi A. Chautard Freire-Maia

Co-orientadores:

Prof. Dr. Ricardo Lehtonen R. de Souza.

Profa. Dra. Nina A. B. Pagnan

**CURITIBA
2007**

Universidade Federal do Paraná
Sistema de Bibliotecas

Magni, Cristiana
Deficiência auditiva não-sindrômica: avaliação
genética (genes de conexinas) e fenotípica (clínica e audiológica)./
Cristiana Magni. – Curitiba, 2007.
xix; 161f. : il. ; 30cm.

Orientadora: Eleidi A. C. Freire Maia

Tese (doutorado) - Universidade Federal do Paraná, Setor
de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em
Genética.

*“... tudo que fica pronto na vida
foi construído antes,
na alma !”*

Nizan Guanaes

*À minha tão amada família,
Luiz Carlos e Giulia,*

*dedico este trabalho,
por compartilharem
dos meus sonhos,
conquistas e
alegrias.*

*Ao meu pai, Giuseppe,
pela sua presença tão carinhosa
e dedicação incondicional.*

*À minha mãe Irene (in memoriam),
por ter me ensinado o valor da
compreensão e aceitação dos
desígnios de Deus.*

AGRADECIMENTOS

À Profa. Eleidi A. Chautard Freire Maia, que com sua transparência e serenidade, acreditou no valor deste trabalho, e com dedicação e valiosa orientação, foi o alicerce principal para a concretização do mesmo.

Ao Prof. Ricardo Lehtonen R. de Souza, pelos seus confiantes ensinamentos e amigável retaguarda durante todo o desenvolvimento desta pesquisa.

À Profa. Nina A. B. Pagnan, que com entusiasmo e cumplicidade, compartilhou comigo dos ensaios iniciais desta pesquisa.

Às mães e seus filhos deficientes auditivos, que por compreenderem a minha ansiedade científica, foram os protagonistas desta realização.

Às escolas de educação especial, que me receberam com carinho, por acreditarem em minhas convicções. Na Escola EPHETA, à diretora Maria Inês, às secretárias Angela e Claudinéia, à assistente social Rosiméri e à senhora Cleonice. Na Escola CENTRAU, à diretora Lize, à Profa. Wilma Sônia, à secretária Olinda, à Sra. Lourdes, à fonoaudióloga Júlia e à prestativa Fabiana. Na Escola ALCINDO FANAYA, à diretora Nerci, às secretárias Ivone e Rosana e à assistente social Maria Rita. Na Escola CRESA, à diretora Vanessa, à secretária Norma e à fonoaudióloga Silvania. Na Escola APAS, à diretora Cristianne, às secretárias Laís e Eliane e à coordenadora Maria Rosária.

À grande amiga Lilian Jacob, cuja sensatez e profissionalismo tanto admiro, e que propiciou a parceria desta pesquisa com o Programa de Pós-Graduação em Distúrbios da Comunicação da Universidade Tuiuti do Paraná.

À amiga Lisangela, pelo carinho e dedicação na coleta de sangue, e pelos momentos de desabafo e companheirismo.

Ao Laboratório de Análises Clínicas LABAC, pelo apoio quanto à coleta de sangue, em especial à Daniela.

À Danielle Jackowski, pela prestimosa ajuda na extração de DNA.

Ao Átila, à Liya, à Lupe e, mais especialmente, à Kelly, amigos do Laboratório de Polimorfismos e Ligação, que tantas vezes me ajudaram, entre erros e acertos, com conselhos valiosos.

À Profa. Regina C. Mingroni Netto, pelas brilhantes sugestões e fornecimento das amostras-controle.

Às colegas fonoaudiólogas, Fabrina Pavia Aguiar, Samira Natasha Tschoeke, Aline Tomiasi Bozio, Roberta Daroit e, mais especialmente, à Rafaela Mocellin Campêlo, pela paciência e dedicação quanto à realização das avaliações audiológicas.

Ao Departamento de Genética e à Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Genética, por toda a infraestrutura disponível.

À secretária Luciana Marques, pelo carinho e disponibilidade sempre marcantes.

À CAPES, pela bolsa de doutorado.

A todos que, mesmo não mencionando nomes, de alguma forma, contribuíram para a realização deste estudo.

MUITO OBRIGADA !

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	7
2.1 CONEXINAS, JUNÇÕES GAP E DEFICIÊNCIA AUDITIVA.....	10
2.2 MUTAÇÕES NOS GENES DAS CONEXINAS.....	17
2.2.1 <i>GJB2</i> (Conexina 26).	17
2.2.1.1 Mutações no gene <i>GJB2</i> e deficiência auditiva	18
2.2.1.2 Mutações no gene <i>GJB2</i> e características clínicas da perda auditiva.....	24
2.2.2 <i>GJB6</i> (Conexina 30).	29
2.3 OUTROS DISTÚRBIOS DECORRENTES DE MUTAÇÕES NOS GENES DAS CONEXINAS	34
3. OBJETIVOS	40
4. MATERIAIS E MÉTODOS	41
4.1 CASUÍSTICA.....	41
4.2 COLETA DE MATERIAL PARA ANÁLISE LABORATORIAL	44
4.3 AVALIAÇÃO LABORATORIAL	45
4.3.1 Extração do DNA	45
4.3.2 PCR (Reação em Cadeia da Polimerase)	46
4.3.3 Genotipagem do gene <i>GJB2</i> - Mutação <i>35delG</i>	47
4.3.3.1 Coloração do gel de poliacrilamida com nitrato de prata	51
4.3.4 Genotipagem do gene <i>GJB6</i> – Deleções <i>del(D13S1830)</i> e <i>del(D13S1854)</i>	52
4.4 AVALIAÇÃO AUDITIVA	55
4.4.1 Medidas de Imitância Acústica	56
4.4.2 Audiometria Tonal Liminar	57
4.4.3 Logaudiometria	58
4.4.4 Emissões Otoacústicas Evocadas (EOE)	59
4.4.5 Potencial Evocado Auditivo do Tronco Encefálico	60
4.4.6 Deficientes auditivos submetidos à avaliação audiológica	62
4.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA	65
5. RESULTADOS	67
5.1 CASOS FAMILIAIS E ESPORÁDICOS	67
5.2 GENOTIPAGEM DOS GENES <i>GJB2</i> E <i>GJB6</i>	70
5.3 DEFICIÊNCIA AUDITIVA E CONSANGÜINIDADE	74
5.4 ETNIA E DEFICIÊNCIA AUDITIVA	75
5.5 SUSPEITA E DIAGNÓSTICO DA DEFICIÊNCIA AUDITIVA	76
5.6 SINAIS EXTRA-AUDITIVOS	78
5.7 GENÓTIPOS E FATORES AMBIENTAIS	82
5.8 AVALIAÇÃO AUDITIVA.....	85
5.9 DEFICIÊNCIA AUDITIVA E DESENVOLVIMENTO DA FALA	103
6. DISCUSSÃO	105
6.1 FREQUÊNCIAS DA MUTAÇÃO <i>35delG</i>	106
6.1.1 Frequência de homozigotos e heterozigotos com a mutação <i>35delG</i>	107
6.1.2 Frequência de homozigotos e heterozigotos com a mutação <i>35delG</i> em famílias com e sem recorrência da deficiência auditiva	109
6.1.3 Frequências alélicas	111
6.2 FREQUÊNCIA DAS DELEÇÕES DO GENE <i>GJB6</i>	112

6.3 INDICADORES DE RISCO PARA A DEFICIÊNCIA AUDITIVA	115
6.4 SUSPEITA E DIAGNÓSTICO DA DEFICIÊNCIA AUDITIVA	123
6.5 SINAIS EXTRA-AUDITIVOS	126
6.6 AVALIAÇÃO AUDIOLÓGICA	128
6.7 COMENTÁRIOS FINAIS	134
7. CONCLUSÃO	137
8. REFERÊNCIAS	139
APÊNDICES	151

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 -	Genes relacionados à perda auditiva de herança autossômica recessiva.....	09
TABELA 2 -	Principais genes e conexinas relacionados à deficiência auditiva.....	16
TABELA 3 -	Proporção (%) de heterozigotos e/ou homozigotos, deficientes auditivos de diferentes populações, com mutações no gene <i>GJB2</i> e com a mutação <i>35delG</i>	23
TABELA 4 -	Distribuição da amostra segundo a faixa etária.....	43
TABELA 5 -	Distribuição da amostra segundo o grau de escolaridade.....	43
TABELA 6 -	Resultados esperados para cada teste realizado na avaliação audiológica com relação à localização do déficit auditivo.....	64
TABELA 7 -	Freqüências genótípicas e alélica (% ± Erro Padrão), referentes aos deficientes auditivos não consangüíneos de 144 famílias, quanto à mutação <i>35delG</i> do gene <i>GJB2</i>	71
TABELA 8 -	Freqüências genótípicas e alélicas, referentes aos deficientes auditivos não consangüíneos, quanto à mutação <i>35delG</i> do gene <i>GJB2</i> , segundo a classificação das famílias quanto à recorrência da deficiência auditiva.....	72
TABELA 9 -	Freqüência (%) e Erro Padrão (EP), referentes aos genótipos de 115 deficientes auditivos heterozigotos e selvagens para <i>35delG</i> , quanto às deleções $\Delta(GJB6-D13S1830)$ e $\Delta(GJB6-D13S1854)$ do gene <i>GJB6</i>	73
TABELA 10 -	Distribuição da amostra segundo o grau de consangüinidade dos genitores.....	75
TABELA 11 -	Distribuição de freqüência dos sobrenomes dos probandos, classificados pela presença e ausência da mutação <i>35delG</i>	76
TABELA 12 -	Média de idade dos probandos com relação à época da suspeita e diagnóstico da deficiência auditiva.....	77
TABELA 13 -	Comparações, por meio de teste t, das médias de idade (meses) na época do diagnóstico da deficiência auditiva, entre os diferentes genótipos quanto à mutação <i>35delG</i>	77
TABELA 14 -	Freqüência (%) dos sinais extra-auditivos ectodérmicos.....	79
TABELA 15 -	Freqüência (%) de sinais extra-auditivos, não relacionados às displasias ectodérmicas, nos 156 afetados.....	81
TABELA 16 -	Distribuição percentual dos fatores ambientais de risco para a deficiência auditiva, registrados no histórico dos 156 afetados, classificados de acordo com sua época de ocorrência.....	83
TABELA 17 -	Distribuição dos fatores ambientais, de acordo com a época de ocorrência, nos três genótipos do gene <i>GJB2</i> , para a mutação <i>35delG</i> , e respectivas comparações por meio de χ^2	83
TABELA 18 -	Caracterização dos fatores ambientais, ocorridos antes da deficiência auditiva, nos 34 probandos homozigotos para a mutação <i>35delG</i> do gene <i>GJB2</i>	84

TABELA 19 - Caracterização dos fatores ambientais, ocorridos antes da suspeita da deficiência auditiva, nos 24 afetados heterozigotos para a mutação <i>35delG</i>	85
TABELA 20 - Relação das categorias do diagnóstico audiológico (grau de perda e configuração da curva audiométrica) da orelha direita de 91 deficientes auditivos, não consangüíneos, que realizaram a Audiometria Tonal Liminar, classificados genotipicamente quanto à mutação <i>35delG</i>	86
TABELA 21 - Relação das categorias do diagnóstico audiológico (grau de perda e configuração da curva audiométrica) da orelha esquerda de 91 deficientes auditivos, não consangüíneos, que realizaram a Audiometria Tonal Liminar, classificados genotipicamente quanto à mutação <i>35delG</i>	87
TABELA 22 - Relação genótipo-fenótipo de 25 homozigotos para a mutação <i>35delG</i> , segundo as categorias de diagnóstico audiológico adotadas neste estudo, considerando-se a média da melhor orelha.....	88
TABELA 23 - Relação genótipo-fenótipo de 14 deficientes auditivos, não consangüíneos, heterozigotos para a mutação <i>35delG</i> , segundo as categorias de diagnóstico audiológico, adotadas neste estudo, considerando-se a média da melhor orelha.....	89
TABELA 24 - Relação genótipo-fenótipo de 52 deficientes auditivos não consangüíneos, homozigotos selvagens para a mutação <i>35delG</i> , segundo as categorias de diagnóstico audiológico adotadas neste estudo, considerando-se a média da melhor orelha.....	90
TABELA 25 - Relação genótipo-fenótipo de 19 deficientes auditivos, pertencentes a oito famílias classificadas segundo o grau de perda auditiva, considerando-se a média da melhor orelha.....	92
TABELA 26 - Frequência de deficientes auditivos dos três genótipos com relação à mutação <i>35delG</i> , quanto aos graus de perda auditiva.....	94
TABELA 27 - Médias tonais das frequências de 500,1K e 2KHz da melhor orelha e Desvio Padrão (DP) para os três genótipos de não consangüíneos, com relação à mutação <i>35delG</i> , com respectivas comparações de médias por meio da análise de variância ANOVA.....	95
TABELA 28 - Distribuição dos 91 deficientes auditivos não consangüíneos, genotipados para a mutação <i>35delG</i> , com relação ao tipo de configuração audiométrica.....	96
TABELA 29 - Distribuição dos deficientes auditivos não consangüíneos, com relação aos três genótipos, quanto à simetria ou assimetria da perda auditiva.....	96
TABELA 30 - Distribuição dos deficientes auditivos, não consangüíneos, que realizaram o limiar de detecção de voz (LDV), limiar de recepção de fala (LRF) e obtiveram o índice percentual de reconhecimento de fala (IPRF), na orelha direita (D) e esquerda (E).....	98
TABELA 31 - Distribuição dos deficientes auditivos, não consangüíneos, que realizaram as Medidas de Imitância Acústica (M.I.Ac), classificados de acordo com os genótipos para a mutação <i>35delG</i> do gene <i>GJB2</i>	99

TABELA 32 - Distribuição dos deficientes auditivos, não consangüíneos, que realizaram a pesquisa do PEATE, mostrando se houve ausência ou presença de resposta para orelha direita (OD) e esquerda (OE), e valores de χ^2 e p.....	102
TABELA 33 - Resultados da pesquisa do PEATE nos cinco homozigotos selvagens para a mutação <i>35delG</i> , que tiveram presença de resposta.....	103
TABELA 34 - Distribuição de freqüência dos 156 deficientes auditivos, quanto ao período de desenvolvimento da fala.....	104
TABELA 35 - Comparação das freqüências alélicas de <i>35delG</i> do gene <i>GJB2</i> , considerando-se três estudos realizados no Brasil, em amostras de afetados.....	111

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 -	Representação do processo homeostático dos íons k^+ no interior da cóclea, mostrando a expressão da Conexina 26 (verde e azul) nas células de suporte do Órgão de Corti, nos fibrócitos do Ligamento Espiral e nas células da Estria Vascular.....	12
FIGURA 2 -	Estrutura das junções <i>gap</i> : (a) Uma junção <i>gap</i> é um agrupamento de canais entre duas membranas plasmáticas que são separadas por um <i>gap</i> de 2-3nm; (b) Ambas as membranas contêm hemicanais de conexons, subunidades cilíndricas de conexinas; (c) Cada subunidade de conexina tem quatro α hélices transmembrânicas. Dois conexons se unem para formar uma junção <i>gap</i> , de 1,5-2,0 nm de diâmetro, conectando o citoplasma de duas células.....	13
FIGURA 3 -	Elementos que interagem nas junções <i>gap</i> : CL, <i>loop</i> intracelular; COOH, terminal carboxila; E1 e E2, domínios extracelulares; M1-4, domínios transmembrânicos; NH ₂ , terminal N.....	15
FIGURA 4 -	Desenho esquemático da composição do gene <i>GJB2</i>	17
FIGURA 5 -	Seqüência do exon 2 do gene <i>GJB2</i> , incluindo a região codificadora.	48
FIGURA 6 -	Ilustração dos três genótipos quanto à mutação <i>35delG</i> do gene <i>GJB2</i> : 1. Homozigoto selvagem; 2. Homozigoto para <i>35delG</i> e 3. Heterozigoto.....	50
FIGURA 7 -	Desenho esquemático mostrando a localização dos iniciadores utilizados na PCR multiplex: GJB6-1R e BKR-1, para amplificação da junção do ponto de quebra de <i>del(GJB6-D13S1830)</i> ; DelBK1 e DelBK2, para amplificação da junção do ponto de quebra de <i>del(GJB6-D13S1854)</i> ; Cx30Ex1A e Cx30Ex1B para amplificação do exon 1 do gene <i>GJB6</i> (adaptado de Del Castillo et al., 2006).....	53
FIGURA 8 -	Ilustração dos produtos de PCR correspondentes a segmentos do gene <i>GJB6</i> e de seus respectivos tamanhos em pares de bases (pb), indicados à direita da figura.....	54
FIGURA 9 -	As vias ascendentes do sistema nervoso central auditivo.....	61
FIGURA 10 -	Ilustração dos heredogramas das onze famílias com recorrência da deficiência auditiva em consangüíneos com $r \geq 0,25$	68
FIGURA 11 -	Reprodução de uma placa de gel de poliacrilamida, mostrando os fragmentos do produto de PCR após digestão com a enzima de restrição <i>MvaI</i>	70
FIGURA 12 -	Reprodução de uma placa de gel de agarose, mostrando os fragmentos do produto de PCR e o marcador de peso molecular.....	74
FIGURA 13 -	Gráfico de correlação entre as médias tonais dos 91 deficientes auditivos distribuídos nos três genótipos com relação à mutação <i>35delG</i>	91
FIGURA 14 -	Gráfico de correlação das médias tonais de 16 deficientes auditivos..	93

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 -	Parâmetros utilizados na realização do PEATE.....	62
Quadro 2 -	Valores de referência para análise dos resultados do PEATE, segundo KILENY (1996).....	62
Quadro 3 -	Número de deficientes auditivos que realizaram os exames da avaliação audiológica.....	63

LISTA DE ABREVIATURAS

ATL	Audiometria tonal liminar
dBNA	Nível de audição em Decibel
EOE	Emissões otoacústicas evocadas
EOET	Emissões otoacústicas evocadas por estímulo transiente
EOEPD	Emissões otoacústicas evocadas - produto de distorção
Cx26	Conexina 26
Cx30	Conexina 30
DNA	Ácido desoxiribonucléico
DFNA	Deficiência auditiva autossômica dominante
DFNB	Deficiência auditiva autossômica recessiva
<i>DFNB1</i>	Loco para deficiência auditiva autossômica recessiva
EDTA	Ácido etilenoaminotetraacético
EKV	Eritroqueratodermia variável
EP	Erro padrão
GJB2	Gene da conexina 26
<i>GJB6</i>	Gene da conexina 30
Hz	Hertz
IPRF	Índice percentual de reconhecimento de fala
KDa	Kilo Dalton
LDV	Limiar de detectabilidade de voz
LRF	Limiar de recepção de fala
OD	Orelha direita
OE	Orelha esquerda
PEATE	Potencial evocado auditivo do tronco encefálico
RFLP	Polimorfismo de comprimento dos fragmentos de restrição
SNP	Polimorfismo de um único nucleotídeo
TBE	Tampão Tris - ácido bórico - EDTA
TEMED	N'N'N'N' – tetrametiletilenodiamina

RESUMO

A deficiência auditiva neurossensorial, não-sindrômica, autossômica recessiva, é a forma mais comum de perda auditiva de origem genética, sendo que as mutações no gene *GJB2*, que codifica a Conexina 26, representam sua causa mais comum (aproximadamente 50%). A mutação *35delG* (deleção de uma guanina no nucleotídeo 35), tem sido encontrada com alta frequência em muitos grupos étnicos, além de também ter sido observada em heterozigose, em 10 a 42% dos afetados. Uma das hipóteses inclui a possibilidade de uma herança digênica, com a atuação do gene *GJB6*, que codifica a Conexina 30. Neste estudo, foram verificadas a mutação *35delG* (gene *GJB2*) e as deleções do gene *GJB6*, *del(GJB6-D13S1830)* e *del(GJB6-D13S1854)*, em 156 portadores de perda auditiva neurossensorial bilateral, pré-lingual, não sindrômica, residentes na cidade de Curitiba (Sul do Brasil), selecionados de escolas para deficientes auditivos. A faixa etária dos participantes foi de 13 meses a 42 anos, sendo 56% do sexo masculino. O DNA foi extraído de sangue periférico e a genotipagem da mutação *35delG* foi realizada após digestão do produto de PCR com a enzima *MvaI*, com subsequente eletroforese em gel de acrilamida a 8%. A genotipagem para as duas deleções do gene *GJB6* foi realizada por meio de uma PCR multiplex, com posterior eletroforese em gel de agarose a 2% corado com brometo de etídio. Em 144 deficientes auditivos não consangüíneos, a frequência dos homozigotos para a mutação *35delG* foi $20,14\% \pm 3,34\%$ e dos heterozigotos, foi $14,58\% \pm 2,94\%$, sendo a frequência do alelo *35delG* estimada em $27,43\% \pm 2,63\%$. Entre os 21 heterozigotos também examinados para as deleções do gene *GJB6*, dois são heterozigotos compostos, um para a deleção *del(GJB6-D13S1830)* e outro para a deleção *del(GJB6-D13S1854)*, cada um com uma frequência de $4,76\% \pm 4,65\%$, neste grupo de heterozigotos. Para análise da relação entre genótipo e fenótipo, foram realizados os seguintes exames de avaliação audiológica: audiometria tonal liminar (ATL), imitanciometria, emissões otoacústicas transientes e por produto de distorção, e potencial evocado auditivo do tronco encefálico. Concordando com alguns dos estudos já publicados, esses dados não revelaram diferenças significativas da expressividade fenotípica entre os três genótipos referentes à mutação *35delG*, considerando tanto o grau e a simetria da perda auditiva, bem como sua configuração. A perda auditiva de grau severo e profundo ocorreu em $88\% \pm 6\%$ dos homozigotos e em $79\% \pm 11\%$ dos heterozigotos. Correlação positiva significativa das médias de ATL (coeficiente de correlação = 79%) ocorreu entre os 8 pares de irmãos com deficiência auditiva, sugerindo a presença de genes modificadores, que tendem a levar a uma performance auditiva semelhante dentro das famílias.

Palavras-chave: Perda auditiva neurossensorial; genética; conexinas; mutação; displasia ectodérmica.

ABSTRACT

The sensorineural, nonsyndromic, autosomic recessive hearing impairment is the most common form of deafness with genetic origin and the mutations of the *GJB2* gene which encodes Connexin 26 represent its most frequent cause (about 50%). The *35delG* mutation (deletion of a guanine at nucleotide 35) has been found with high frequency in many ethnic groups and has been observed in heterozygosis of as much as 10 to 42% of affected. One of the hypothesis claims a digenic inheritance with the interaction of the *GJB6* gene, which encodes Connexin 30. In the present study, the *35delG* mutation (*GJB2* gene) and deletions of the *GJB6* gene, *del(GJB6-D13S1830)* and *del(GJB6-D13S1854)* were examined for 156 carriers of sensorineural bilateral, prelingual, nonsyndromic hearing impairment, living in the city of Curitiba (South Brazil), ascertained from schools for people with hard hearing impairment. Age range of the individuals was from 13 months to 42 years, being 56% males. DNA was extracted from peripheral blood leukocytes and the genotyping of the *35delG* mutation was carried after digestion of PCR product with the *MvaI* enzyme and subsequent electrophoresis on 8% polyacrylamide gel. Genotyping for the two *GJB6* gene deletions was performed by multiplex PCR followed by electrophoresis on 2% agarose gel stained with ethidium bromide. Among the 144 non consanguineous individuals with hearing impairment, the frequency of homozygotes for the *35delG* mutation was $20.14\% \pm 3.34\%$ and that of heterozygotes was $14.58\% \pm 2.94\%$, being the frequency of the *35delG* allele estimated as $27.43\% \pm 2.63\%$. Two compound heterozygotes were found within the 21 heterozygotes that were also examined for the *GJB6* gene deletions: one presented the *del(GJB6-D13S1830)* deletion and the other showed the *del(GJB6-D13S1854)* deletion, each one with a frequency of $4.76\% \pm 4.65\%$ in the heterozygote group for the *35delG* mutation. The following evaluations were performed for posterior analysis of genotype-phenotype relation: pure tone audiometry (PTA), immitanciometry, evoked otoacoustic emissions both transient and by distorted product, and auditory brainstem evoked potential. In accordance with some of the literature data, these data did not reveal any significant difference on phenotypic expressivity when the three genotypes for the *35delG* mutation were compared, considering the degree and symmetry of hearing impairment, as well as audiogram shape. Severe to profound hearing impairment appeared in $88\% \pm 6\%$ of homozygotes and in $79\% \pm 11\%$ of heterozygotes. Significant positive correlation of PTA means (correlation coefficient = 79%) occurred for the eight sib pairs with hearing impairment, suggesting the influence of modifying genes that tend to lead to similar hearing performance within families.

Key-words: Sensorineural hearing loss; genetics; connexins; mutation; ectodermal dysplasia.

1. INTRODUÇÃO

A audição é o principal canal sensorial pelo qual o indivíduo tem contato com a linguagem, e ser deficiente na linguagem oral não permite que o indivíduo se comunique livremente com seus semelhantes, adquirindo e compartilhando informações.

O deficiente auditivo não percebe os sons desde o útero materno. As oscilações de um mundo inteiro como, a respiração, os movimentos e a voz da mãe, além do seu primeiro grito, produzido no momento do seu nascimento, não são ouvidos por ele.

A existência de uma deficiência auditiva na infância, independentemente de seu grau, faz com que a criança apresente dificuldades educacionais, uma vez que todas as situações de aprendizagem são primariamente auditivas, além de impedir o desenvolvimento da linguagem oral e, posteriormente, as habilidades de leitura e escrita estarão também alteradas, já que são funções lingüísticas construídas a partir da fala.

Muitas alterações orgânicas ou funcionais são etiologicamente responsáveis por distúrbios do aparelho auditivo que ocasionam prejuízo da audição. Causas infecciosas ainda são muito comuns nos países em desenvolvimento, apesar da melhoria gradativa das condições de saúde pública, mas segundo GRUNDFAST, ATWOO e CHOUNG (1999), as chances de uma criança vir a perder a audição devido a causas infecciosas ou traumáticas vêm diminuindo com o tempo e, conseqüentemente, a importância relativa à deficiência auditiva hereditária vem aumentando.

Nos países desenvolvidos, a prevalência da deficiência auditiva é de, aproximadamente, um em cada 650 nascimentos (MEHL; THOMSON, 2002), e uma porcentagem de, aproximadamente, 60% de todas as causas de deficiência auditiva pré-lingual, pode ser atribuída a fatores genéticos (PARVING, 1996).

No Brasil, estima-se que quatro a cada 1000 crianças que nascem são portadoras de deficiência auditiva. No país cerca de 80% dos casos são causados por fatores ambientais, e os 20% restantes devem ser causados por fatores hereditários (PIATTO; MANIGLIA, 2001).

Segundo PARVING (1996), as diferentes formas de deficiência auditiva hereditária podem ser classificadas de acordo com o tipo (condutiva, neurossensorial ou mista); idade de manifestação (pré ou pós-lingual); etiologia (genética ou ambiental) e com base na presença ou ausência de sinais associados (sindrômica ou não-sindrômica).

A deficiência auditiva sindrômica pode estar associada com malformações cranio-faciais e/ou outras anormalidades, como displasias ectodérmicas. A perda auditiva pode ser congênita ou se desenvolver tardiamente como no caso da Síndrome de Vohwinkel, onde a queratose palmoplantar é evidente desde os primeiros meses de vida, enquanto a perda auditiva aparece na idade adulta (CALZOLARI; SENSI, 1996). Um grande número de síndromes já foi descrito em que a deficiência auditiva é uma das anomalias associadas, além de defeitos na formação embriológica da orelha e mais de 60 genes já foram mapeados no genoma humano relacionados a estas síndromes (VAN CAMP; SMITH, 2006). Entretanto, segundo CALZOLARI, SENSI e GUALANDI (2001), devido à enorme variabilidade de expressão clínica em muitas síndromes, a perda auditiva pode

constituir o principal ou, aparentemente, o único problema em alguns indivíduos, e o envolvimento significativo de outros órgãos ou sistemas pode, algumas vezes, obscurecer a deficiência auditiva.

Nos casos de deficiência auditiva não-sindrômica, a perda auditiva é um sintoma isolado mais prevalente nas crianças, constituindo, aproximadamente, 70% dos casos de deficiência auditiva, podendo ser congênita ou de aparecimento tardio. Em sua grande maioria, os estudos procuram enfatizar a severidade de uma deficiência auditiva pré-lingual, o que permite uma intervenção precoce. Um dos padrões de herança mais comum para a deficiência auditiva não-sindrômica é o autossômico recessivo, atingindo cerca de 80% dos casos genéticos (PARVING; DAVIS, 2001).

Há uma década, o mapeamento dos genes responsáveis pela perda auditiva de herança autossômica recessiva era considerado muito difícil por causa da extrema heterogeneidade genética combinada à ausência de critérios clínicos que permitissem diferenciação fenotípica entre indivíduos portadores de lesões da orelha interna causadas pelos diferentes genes (MORTON, 2002), porém, nos últimos anos tem ocorrido um rápido desenvolvimento do conhecimento no campo da genética, resultando na localização e isolamento de centenas de genes que envolvem o sistema auditivo (VAN CAMP; SMITH, 2006).

O mapeamento do primeiro gene para deficiência auditiva não-sindrômica de herança autossômica recessiva, localizado no loco *DFNB1*, foi realizado por GUILFORD et al. (1994), através de análise de ligação. O gene foi localizado no braço longo do cromossomo 13 e corresponde ao gene da Conexina 26 (*GJB2*).

Um achado surpreendente tem sido a elevada prevalência de mutações neste gene, em uma porcentagem média de 50% dos casos de deficiência auditiva autossômica recessiva pré-lingual em várias populações, o que vem refletir um impacto significativo no aconselhamento genético. A mutação *35delG* tem sido uma das mais estudadas, e sua prevalência em deficientes auditivos é significativa em diversas populações da Europa Mediterrânea e tem sido observada, com frequência nesse loco, em heterozigose, sendo o único alelo mutante detectado mesmo após o seqüenciamento de toda a região codificadora do gene *GJB2*. A prevalência de heterozigosidade tem sido de 10 a 42% (ZELANTE et al., 1997; ESTIVILL et al., 1998; GUALANDI et al., 2002).

Uma explicação tem sido proposta para a heterozigose composta, a qual seria a possibilidade de uma herança digênica, em decorrência da existência de um outro gene, o *GJB6*, que codifica a conexina 30, presente no mesmo loco *DFNB1* (STEVENSON, 2003). Este gene tem sido um óbvio candidato por ser expresso nas mesmas estruturas da orelha interna em que o gene da conexina 26 também se expressa, além de ambas as conexinas serem funcionalmente relacionadas. Duas grandes deleções foram identificadas no gene *GJB6*, as quais têm sido extensivamente investigadas em diversas populações (DEL CASTILLO et al., 2002; 2005).

RICHARD (2003) afirma que a descoberta dos defeitos genéticos das junções *gap*, das quais fazem parte a conexina 26, a conexina 30 e tantas outras conexinas, tem auxiliado significativamente na compreensão do papel biológico destas estruturas, além de incitar um enorme interesse no estudo da sua biofisiologia, levando à especulação de que a complexidade e a redundância do

sistema de junções *gap* sejam responsáveis pelas confusas correlações genótipo-fenótipo em distúrbios das conexinas humanas.

Mutações nos genes que codificam várias conexinas são um surpreendente foco de pesquisa, diagnóstico e potencial terapia de diversos distúrbios genéticos humanos que afetam também a pele, sistemas sensoriais e nervos periféricos. Mutações em diferentes genes que codificam conexinas podem causar os mesmos ou semelhantes distúrbios. Uma vez que, muitos casos de deficiência auditiva pré-lingual são causados pela falta de conexinas específicas (Cx26 ou Cx30), a perda auditiva com aparecimento tardio e com distúrbio da pele é, principalmente, o resultado de mutações não-sinônimas em várias conexinas (RABIONET et al., 2002).

Reconhecendo o papel do gene *GJB2*, como sendo de grande importância para o estudo da deficiência auditiva não-sindrômica, vários estudos têm se preocupado em descrever as características clínicas do fenótipo relacionado à perda auditiva decorrente de mutações neste gene, e concordam, em sua grande maioria, com sendo uma deficiência auditiva, freqüentemente, pré-lingual, bilateral, simétrica, de grau severo a profundo. Uma minoria pode apresentar perda auditiva de grau moderado, podendo até ocorrer aparentes correlações da severidade da perda com mutações particulares no gene (KELLEY et al., 1998; DENOYELLE et al., 1999; MURGIA et al., 1999; CRYNS et al., 2004; HISMI et al., 2006).

Enfim, conclui-se que a proporção de causas genéticas tende a aumentar como resultado de melhorias que vêm sendo implantadas no setor de saúde dos países em desenvolvimento e existe considerável interesse em estabelecer a prevalência e tipos de mutações que causam a perda auditiva não-sindrômica no

Brasil, esclarecendo as relações genótipo/fenótipo da perda auditiva e propiciando um aconselhamento genético mais acurado.

Esse trabalho tem como objetivo verificar a presença de mutações nos genes *GJB2* e *GJB6*, em uma amostra formada por portadores de deficiência auditiva neurossensorial, realizando uma análise comparativa entre genótipo e fenótipo mediante avaliação audiológica completa.

2. REVISÃO DA LITERATURA

As deficiências auditivas decorrentes de formas complexas de herança são raras e difíceis de serem diferenciadas. O alto grau de heterogeneidade genética da deficiência auditiva reflete a grande diversidade de proteínas especializadas que são requeridas desde o órgão espiral, onde ocorre a condução eletro-mecânica do som, até o córtex auditivo, responsável pelo significado dos diferentes sons.

Embora exista uma grande variedade de síndromes em que a perda de audição está associada a anormalidades de diferentes órgãos, ou a distúrbios endócrinos ou metabólicos, na maioria dos indivíduos com deficiência auditiva, este é o único sintoma, podendo representar 70% de todos os casos de deficiência auditiva na infância (PARVING, 1996), constituindo o tipo de deficiência auditiva não-sindrômica.

Segundo PETIT (1996), em muitos casos, o diagnóstico de uma forma recessiva de perda auditiva é difícil, pois só se pode considerar como caso de herança recessiva, quando não há qualquer indício de causa ambiental, como infecções maternas ou perinatais ou o uso de drogas ototóxicas pela criança. Entretanto, cabe mencionar que, mesmo nos países desenvolvidos, 25% das crianças portadoras de deficiência auditiva permanecem em UTIs neonatais (DAVIS; PARVING, 1994).

As formas não-sindrômicas de deficiência auditiva genética são, convencionalmente, denominadas com a sigla *DFNA*, na qual *DFN* significa *deafness* e *A*, transmissão autossômica dominante, e com a sigla *DFNB*, na qual a

letra B significa transmissão autossômica recessiva. Atualmente, estas siglas significam o loco onde se encontram os genes para a deficiência auditiva não-sindrômica e o número que aparece logo depois da sigla significa a ordem de descobrimento do gene (PETIT, 1996; VAN CAMP; COUCKE; WILLEMS, 1996).

Desde 1994, quando foi descoberto o primeiro gene para deficiência auditiva não-sindrômica, o mapeamento de genes responsáveis pela perda auditiva autossômica recessiva é considerado difícil devido a grande heterogeneidade genética combinada com a ausência de critérios clínicos que permitiriam uma diferenciação dos defeitos da orelha interna, causados pelos diferentes genes (PETIT, 1996).

Até o momento, estão descritos mais de 20 genes relacionados à perda auditiva de herança autossômica recessiva. A Tabela 1 foi retirada da *Hereditary Hearing Loss Homepage* (VAN CAMP; SMITH, 2006) e nela estão relacionados alguns destes genes, incluindo os genes estudados no presente trabalho (*GJB2* e *GJB6*).

PETIT (1996) considera que a localização de um gene recessivo para a deficiência auditiva deve incluir a caracterização de uma nova entidade nosológica, com uma descrição detalhada de ambas as funções auditivas e vestibulares. A variabilidade intrafamiliar dos sintomas clínicos e de progressão da doença deve ser investigada, assim como a variabilidade interfamiliar também deve ser estimada por meio de investigação clínica dos indivíduos afetados. Finalmente, estimar a prevalência de um gene defeituoso depende de estudos realizados em famílias pertencentes a diferentes regiões do mundo.

TABELA 1 - Genes relacionados à perda auditiva de herança autossômica recessiva.

LOCOS	GENE	REFERÊNCIA
<i>DFNB1</i>	<i>GJB2</i> (Cx26)	KELSELL et al., 1997
<i>DFNB1</i>	<i>GJB6</i> (Cx30)	DEL CASTILLO et al., 2002
<i>DFNB2</i>	<i>MYO7A</i>	LIU et al., 1997; WEIL et al., 1997
<i>DFNB3</i>	<i>MYO15</i>	WANG et al., 1998
<i>DFNB4</i>	<i>SLC26A4</i>	LI et al., 1998
<i>DFNB6</i>	<i>TMIE</i>	NAZ et al., 2002
<i>DFNB7/DFNB11</i>	<i>TMC1</i>	KURIMA et al., 2002
<i>DFNB8/DFNB10</i>	<i>TMPRSS3</i>	SCOTT et al., 2001
<i>DFNB9</i>	<i>OTOF</i>	YASUNAGA et al., 1999
<i>DFNB12</i>	<i>CDH23</i>	BORK et al., 2001
<i>DFNB16</i>	<i>STRC</i>	VERPY et al., 2001
<i>DFNB18</i>	<i>USH1C</i>	OUYANG et al., 2002; AHMED et al., 2002
<i>DFNB21</i>	<i>TECTA</i>	MUSTAPHA et al., 2002
<i>DFNB22</i>	<i>OTOA</i>	ZWAENEPOEL et al., 2002
<i>DFNB23</i>	<i>PCDH15</i>	AHMED et al., 2003
<i>DFNB28</i>	<i>TRIOBP</i>	SHAHIN et al., 2003; RIAZUDDIN et al., 2006
<i>DFNB29</i>	<i>CLDN14</i>	WILCOX et al., 2001
<i>DFNB30</i>	<i>MYO3A</i>	WALSH et al., 2002
<i>DFNB31</i>	<i>WHRN</i>	MBURU et al., 2003
<i>DFNB36</i>	<i>ESPN</i>	NAZ et al., 2004
<i>DFNB37</i>	<i>MYO6</i>	AHMED et al., 2003
<i>DFNB61</i>	<i>PRES</i> (Prestin)	LIU et al., 2003
<i>DFNB67</i>	<i>TMHS</i>	SHABBIR et al., 2006

Fonte: VAN CAMP; SMITH (2006)

2.1 CONEXINAS, JUNÇÕES GAP E DEFICIÊNCIA AUDITIVA

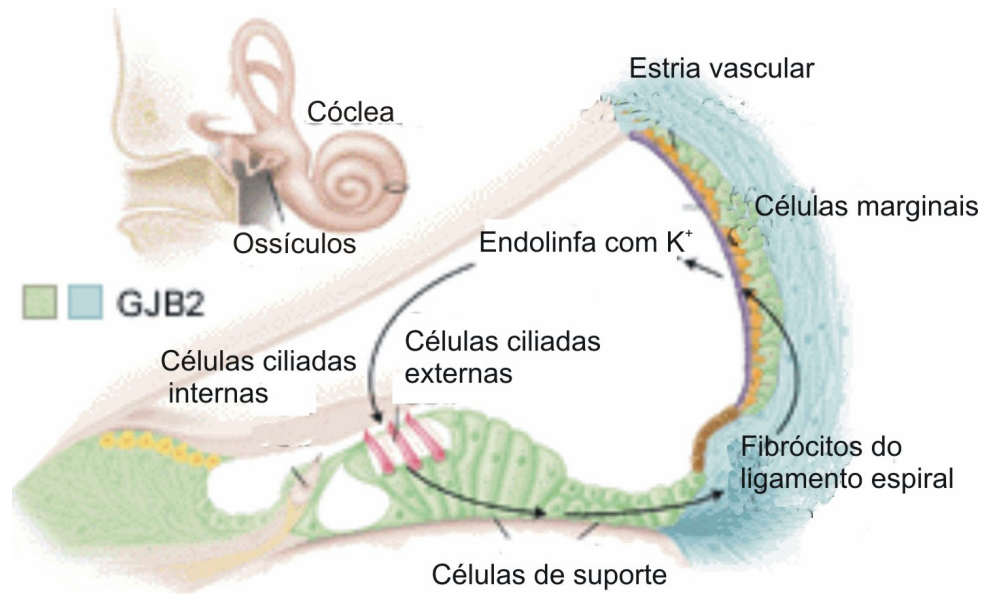
O mapeamento do primeiro gene para deficiência auditiva não-sindrômica autossômica recessiva, localizado no loco *DFNB1*, foi realizado por GUILFORD et al. (1994), através de análise de ligação. Os autores estudaram uma família numerosa e com alto grau de consangüinidade, proveniente de uma população isolada do nordeste da Tunísia. O gene foi localizado no cromossomo 13, no braço longo (q), na região 1 e banda 2, e corresponde ao gene *GJB2*, que codifica a Conexina 26 (Cx26).

O gene *GJB2* (*gap junction beta-2 protein*), que codifica uma proteína da família das conexinas, a conexina 26, além de, quando mutado, condicionar a forma autossômica recessiva mais comum de deficiência auditiva, apresenta outras mutações menos freqüentes que determinam uma forma autossômica dominante (*DFNA3*) de perda auditiva. No caso das deficiências auditivas, o comprometimento das junções *gap* interfere no processo de manutenção de altas concentrações de potássio intracelular, o que prejudicaria o mecanismo que permite resposta rápida das células ciliadas ao novo estímulo sonoro, resultando em perda auditiva (KELSELL et al., 1997; MUELLER, 2001).

A detecção do som envolve vários mecanismos moleculares e celulares. Dentro da cóclea, o estímulo hidro-mecânico do som resulta em movimentos ondulatórios da membrana basilar que suporta o órgão espiral e suas células ciliadas (Figura 1). O deslocamento da membrana basilar causa deflexão de um feixe de delicados filamentos de actina, denominados estereocílios, situados no ápice das células ciliadas. Uma deflexão dos estereocílios em um ângulo menor

que um grau, abre mecanicamente os canais de transdução, permitindo o influxo de íons de potássio da endolinfa para as células ciliadas externas, causando despolarização da membrana celular, e o influxo de íons de cálcio, o que conduz a estimulação do nervo auditivo aferente e a formação de sinapses com a região basal das células ciliadas, convertendo o estímulo sonoro em estímulos elétricos que são transmitidos ao sistema nervoso auditivo central (FRIEDMAN et al., 2000).

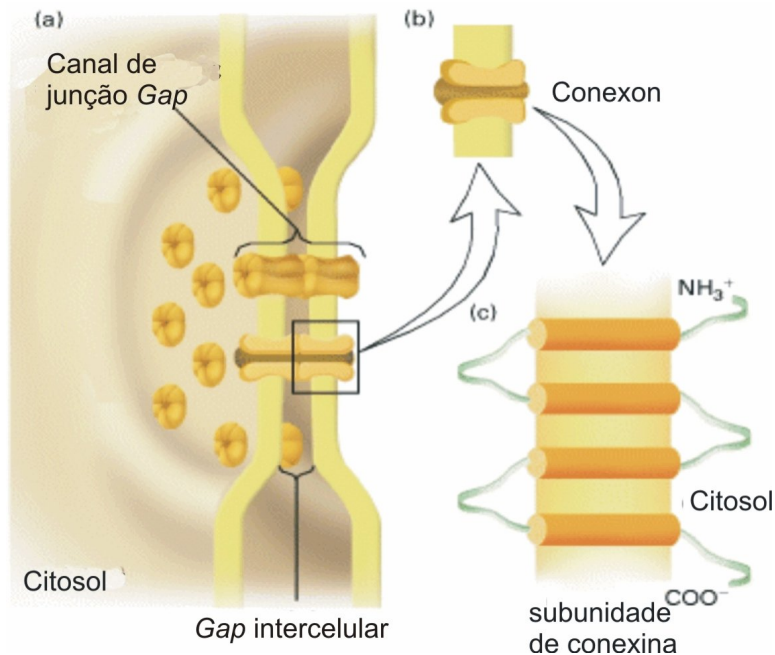
RABIONET et al. (2002) descrevem que para uma nova excitação da célula, o potássio deve ser removido, retornando à endolinfa. Tem sido formulada a hipótese de que as junções *gap* (ou junções comunicantes) das células epiteliais e do tecido conectivo, presentes na orelha interna, contribuem para a manutenção do potencial endolinfático, permitindo o retorno dos íons de potássio para a endolinfa. Tais junções *gap* são regiões de contato entre as células e amplamente distribuídas entre os diferentes tecidos. São de extrema importância na comunicação intercelular, permitindo a passagem direta de íons e outras pequenas moléculas (<1kDa) e são formadas por unidades protéicas, denominadas conexinas.



FONTE: STEEL (1999)

FIGURA 1 – Representação do processo homeostático dos íons K^+ no interior da cóclea, mostrando a expressão da Conexina 26 (verde e azul) nas células de suporte do Órgão de Corti, nos fibrócitos do Ligamento Espiral e nas células da Estria Vascular.

A unidade das junções *gap* é chamada de conexon, e é constituída por um cilindro que atravessa as membranas das células conectadas (Figura 2).



FONTE: DALE et al. (2001).

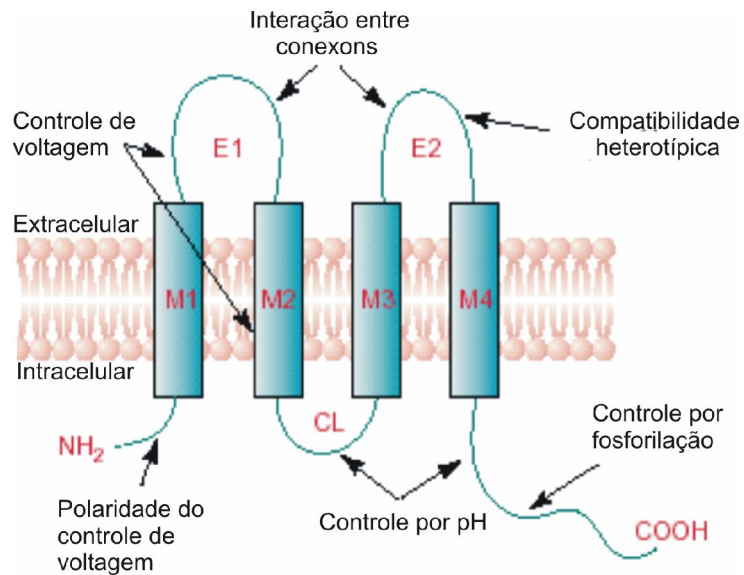
FIGURA 2 – Estrutura das junções *gap*: (a) Uma junção *gap* é um agrupamento de dois conexons entre duas membranas plasmáticas que são separadas por um *gap* de 2-3nm; (b) Ambas as membranas contêm hemicanais de conexons, que são subunidades cilíndricas de conexinas; (c) Cada subunidade de conexina tem quatro α hélices transmembrânicas. Dois conexons se unem para formar uma junção *gap*, de 1,5 a 2,0 nm de diâmetro, conectando o citoplasma de duas células.

Cada conexon é formado por seis proteínas transmembrânicas, as conexinas. Os conexons podem ser homoméricos, quando formados pela mesma conexina, ou heteroméricos, quando formados por subunidades de conexinas diferentes. Dois conexons que unem duas células podem ser idênticos ou não,

sendo denominados de canal homotípico e heterotípico, respectivamente (RABIONET et al., 2002; CHANG; VAN CAMP; SMITH, 2003).

As conexinas possuem quatro domínios transmembrânicos. O terminal carboxila e o terminal amino, bem como a alça entre o segundo e o terceiro domínio transmembrânico, são citoplasmáticos (Figura 3). Interações entre diferentes domínios de conexinas podem ser cruciais para a permeabilidade das junções *gap*. A abertura dos canais das junções *gap* parece ser regulada por vários fatores, tais como fosforilação, voltagem, acidificação, e outros. A maior variabilidade na seqüência das conexinas é encontrada nos domínios citoplasmáticos, que poderiam participar na regulação da atividade dos canais (RABIONET et al., 2002).

Segundo os mesmos autores, são conhecidas 20 conexinas humanas, as quais são classificadas de acordo com o peso molecular ou homologia em α , β e γ . A estrutura genômica das conexinas α e β é muito similar, sendo codificadas por genes estruturalmente semelhantes, com dois exons, sendo que o segundo contém toda a região codificadora.



Fonte: RABIONET et al. (2002)

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

A maioria dos genes de conexinas ocorre em agrupamentos como, por exemplo, os genes *GJB2*, *GJB6* e *GJA3* localizados no cromossomo 13 (Tabela 2).

TABELA 2 – Principais genes e conexinas relacionados à deficiência auditiva.

GENES	LOCALIZAÇÃO CROMOSSÔMICA	JUNÇÃO	CONEXINAS
<i>GJB1</i>	Xq13.1	Junção <i>gap</i> β_1	Cx 32
<i>GJB2</i>	13q11-q12	Junção <i>gap</i> β_2	Cx 26
<i>GJB3</i>	1p35.1	Junção <i>gap</i> β_3	Cx 31
<i>GJB4</i>	1p35.1	Junção <i>gap</i> β_4	Cx 30.3
<i>GJB5</i>	1p35.1	Junção <i>gap</i> β_5	Cx 31.1
<i>GJB6</i>	13q12	Junção <i>gap</i> β_6	Cx 30
<i>GJA1</i>	6q21-q23.2	Junção <i>gap</i> α_1	Cx 43
<i>GJA3</i>	13q11	Junção <i>gap</i> α_3	Cx 46

FONTE: RABIONET et al. (2002).

A epiderme, seus apêndices e outros epitélios, derivados da ectoderme da orelha interna e da córnea, utilizam excepcionalmente grande número (acima de 10) de diferentes conexinas que são expressas em distintos padrões durante o desenvolvimento embriológico e diferenciação epitelial (FORGE et al., 2002).

As funções cruciais que os conexons têm na fisiologia normal se refletem no amplo espectro de doenças humanas em que variantes alélicas de diferentes genes de junções *gap* têm sido implicadas. Estudos topológicos têm mostrado que existem muitas mutações deletérias que afetam domínios semelhantes de diferentes conexinas. Como regra geral, essas mutações comuns afetam o segundo domínio transmembrânico ou região muito próxima a ele, embora as mutações possam afetar todos os domínios (KRUTOVSKIKH e YAMASAKI, 2000).

O gene *GJB2*, que codifica a conexina 26, contém 5.427 pares de bases, com apenas dois exons. No cromossomo 13 (13q12), o exon 1 inicia-se na

posição do nucleotídeo 1.741.611 e o exon 2 termina na posição 1.747.037 (NCBI; ENTREZ, 2005 – nº NT024524). A região codificadora está situada no exon 2, como ilustrado na Figura 4.

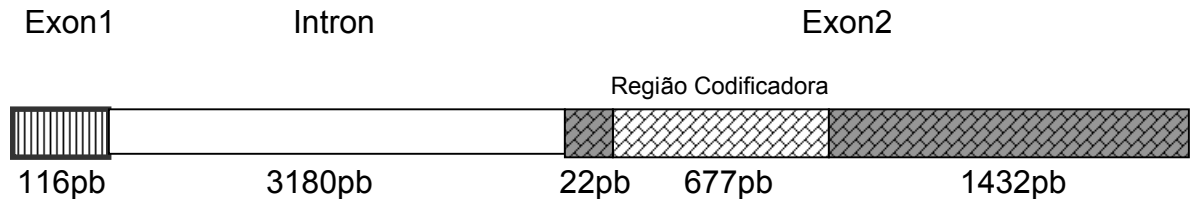


FIGURA 4 – Desenho esquemático da estrutura do gene *GJB2*

2.2 MUTAÇÕES NOS GENES DAS CONEXINAS

2.2.1 *GJB2* (Conexina 26)

RICHARD (2003) afirma que a descoberta dos defeitos genéticos das junções *gap* tem auxiliado significativamente na compreensão do papel biológico destas estruturas, além de incitar um enorme interesse no estudo da sua biofisiologia, levando à especulação de que a complexidade e a redundância do sistema de junções *gap* é responsável pelas confusas correlações genótipo-fenótipo em distúrbios das conexinas humanas. Resultados de vários estudos demonstraram que mutações nos genes das conexinas, dependendo de sua natureza e local, podem interferir na formação das junções *gap*, incluindo síntese das conexinas, oligomerização, transporte, degradação, interações conxon-conxon e/ou propriedades funcionais dos canais destas junções.

Alguns estudos funcionais têm sido conduzidos com o objetivo de analisar a expressão e as propriedades da comunicação intercelular, incluindo a capacidade da conexina mutada em formar canais intercelulares (D'ANDREA et al., 2002). Nove mutações de transmissão autossômica recessiva do gene da Conexina 26 (Cx26) foram analisadas e, embora a maioria delas resulte em uma completa perda de função da proteína, a formação das junções *gap* funcionais está mantida (BRUZZONE et al., 2003).

2.2.1.1 Mutações em *GJB2* e deficiência auditiva

Estudos de várias partes do mundo têm documentado a incidência de mutações no gene *GJB2* em indivíduos portadores de deficiência auditiva, atingindo uma porcentagem de 50% de todos os casos de deficiência auditiva autossômica recessiva pré-lingual, incluindo populações da França, Itália, Espanha, Reino Unido, Estados Unidos, Israel, e mais recentemente, Líbano, Grécia, Áustria, China, Brasil e Palestina (KELLEY et al., 1998; GREEN et al., 1999; SOBE et al., 2000; MUSTAPHA et al., 2001; FREI et al., 2002; LIU et al., 2002; OLIVEIRA et al., 2002; PAMPANOS et al., 2002; SHAHIN et al., 2002).

A mutação *35delG* tem sido muito estudada e é caracterizada pela deleção de uma Guanina, em uma série de seis, localizadas na posição 30-35, a partir do nucleotídeo 1, da região codificadora no exon 2 do gene *GJB2*. Por este motivo, alguns autores utilizam a denominação de *30delG* para a mesma mutação, a qual tem sido empregada indistintamente na literatura (CARRASQUILLO et al., 1997; DENOYELLE et al., 1997; ZELANTE et al., 1997). A deleção de uma

guanina nesta posição do gene resulta em um erro na matriz de leitura, convertendo o códon 12 de Glicina (GGT) para Valina (GTG), seguida de um códon de término prematuro na posição 13. Uma possível origem desta mutação seria um “deslizamento” da polimerase durante a síntese do DNA (KRAWCSAK; COOPER, 1991).

KELLEY et al. (1998) encontraram uma segunda deleção, *31del38*, começando na mesma seqüência de seis guaninas, levantando a hipótese de que essa seria uma região genômica com maior probabilidade de ocorrerem mutações. Este achado levantou a hipótese de que este sítio seria um ponto quente para mutação, denominado “hot spot”. Sendo a freqüência de homozigotos para a mutação *35delG* estimada em 1/10.000, e a freqüência de indivíduos com a deficiência auditiva estimada em 1/1000 e que 50% pode ser de etiologia genética, essa mutação seria responsável por 10% do distúrbio na população infantil e de 20% de toda deficiência auditiva hereditária. Esta freqüência coloca este tipo de deficiência auditiva na mesma categoria de distúrbios recessivos como, fibrose cística e doença de Tay-Sachs. Os autores postularam que se a hipótese com relação à natureza hipermutável desta região do gene *GJB2* fosse correta, uma alta freqüência da mutação *35delG* ocorreria em todos os grupos étnicos do mundo. Se considerarmos a prevalência da deficiência auditiva para um em 650 nascimentos (MEHL; THOMSON, 2002), a freqüência dessa mutação entre os deficientes auditivos torna-se ainda mais alta.

RABIONET et al. (2000) encontraram uma das freqüências mais altas de *35delG* (82%), além de ter encontrado outras 22 mutações entre deficientes auditivos das populações da Itália e Espanha, sugerindo que esta

heterogeneidade genética requer propostas de diagnóstico molecular diferenciado, para diferentes populações.

Entretanto, existem fortes evidências epidemiológicas contra a hipótese de múltiplas origens dessa mutação, considerando-se sua ausência em populações de origem não européia (GASPARINI et al., 2000).

ROTHROCK et al. (2003) buscaram evidências que comprovassem que a mutação *35delG* apareceu nas populações européias e do meio-leste por meio de um único evento mutacional em um cromossomo fundador. Estas evidências foram baseadas em dados de análise de polimorfismos de um único nucleotídeo (SNPs) da região cromossômica, próximos ao gene *GJB2*, que se estenderam em relação às análises de estudo anterior (VAN LAER et al., 2001), que especulou sobre a taxa de recombinação prevista para pequenas distâncias físicas entre os SNPs. Os achados de que todos os cromossomos analisados, contendo a mutação *35delG*, provenientes de várias populações, que apresentavam uma mesma variação relativamente rara (1245C SNP), sugerem que a *35delG*, provavelmente, ocorreu uma única vez em um cromossomo que carregava esse SNP.

Neste caso, a alta frequência de indivíduos com a mutação *35delG* sugere um efeito fundador ou uma vantagem seletiva para heterozigotos, ou ainda uma combinação de ambos, em contraposição à hipótese de que a seqüência de DNA, onde ocorre a mutação *35delG*, favoreça mutações de mudança de matriz de leitura. Esta última hipótese, entretanto, foi reforçada pela observação tanto de mutação por deleção (*35delG*), como de inserção (*35insG*) nesta região do gene *GJB2*. A alta frequência da mutação *35delG* facilita o diagnóstico molecular e o

aconselhamento genético para deficiência auditiva congênita esporádica e de herança autossômica recessiva (ESTIVILL et al., 1998).

Entretanto, em algumas amostras, a mutação *35de/G* não foi detectada, como é o caso das populações de Oman, da China, da República Altai (Rússia) e do Paquistão (SIMSEK et al., 2001; SHI et al., 2004; POSUKH et al., 2005; SANTOS et al., 2005), respectivamente.

SNOECKX et al. (2005) comentam que a baixa prevalência de mutações no gene *GJB2* na população da Indonésia pode ser consequência de vários fatores incluindo a presença de outras mutações em outros genes relacionados à deficiência auditiva, o isolamento geográfico e ausência de casamentos aleatórios.

No Irã, também foi encontrada uma prevalência bem menor da mutação *35de/G*, assim como na população paquistanesa (BROWN et al., 1996), comparativamente aos estudos realizados em populações do oeste europeu. Entretanto, a maior frequência de deficientes auditivos com mutações no *GJB2* foi encontrada no norte e noroeste do Irã (38,3% e 22,2%), respectivamente. Esta população faz fronteira com o norte do Mar Cáspio e permanece relativamente isolada de outras partes do Irã, por montanhas. Na Turquia, também foi encontrada uma frequência similar, de 31,7% (UYGUNER et al., 2003). Isto sugere que há um decréscimo gradual na frequência da mutação *35de/G*, do noroeste para o sul e leste, através dos países do Golfo Pérsico, contrastando com o gradiente do sul para o norte, dos países da Europa e reflete a importância histórica do sul da Europa e do leste do Mediterrâneo, como regiões de diversidade, por meio da movimentação das populações (NAJMABADI et al., 2002).

Em vários países da Europa, a prevalência de heterozigotos para *35delG* tem sido estimada entre 2 a 4% da população com audição normal (ESTIVILL et al., 1998; GASPARINI et al., 2000). Foi encontrado 1 em 51 (1,9%) caucasóides com a mutação *35delG*, em estudo realizado no Brasil, similar à maioria das populações européias (GASPARINI et al., 1997). Um outro estudo, realizado com neonatos no Estado de São Paulo, mostrou que *35delG* foi encontrada em 1 de 103 (0,97%) neonatos (SARTORATO et al., 2000).

SCOTT et al. (1998) estudaram uma amostra composta de portadores de deficiência auditiva neurossensorial autossômica recessiva, pertencentes a quatro famílias indianas, uma caucasiana, uma dominicana (Porto Rico) e uma israelita. A identificação da mutação *35delG* nestas famílias de três etnias diferentes sugere que é uma mutação relativamente comum, responsável por uma porção significativa do total de casos de perda auditiva autossômica recessiva, em diferentes populações.

DENOYELLE et al. (1999) investigaram 140 crianças portadoras de deficiência auditiva autossômica recessiva (*DFNB1*), pertencentes a famílias caucasianas originadas de vários países, como, Tunísia, França, Nova Zelândia e Reino Unido. A mutação *35delG* representou 86% de todos os alelos mutados e outras oito mutações diferentes foram encontradas no gene *GJB2*, sendo sete delas descritas pela primeira vez (*333delAA*, *269insT*, *L90P*, *-3170GA*, *509insA*, *312del14* e *P175T*).

Na Tabela 3, encontram-se relacionados alguns estudos em deficientes auditivos evidenciando a proporção de mutações no gene *GJB2*, bem como da mutação *35delG*, em diferentes populações.

TABELA 3 - Proporção (%) de heterozigotos e/ou homozigotos, deficientes auditivos de diferentes populações, com mutações no gene *GJB2* e com a mutação *35de/G*.

País/Origem	Afetados (n)	Mutações no <i>GJB2</i> (%)	Mutação <i>35de/G</i> het/hom (%)	Referências
Austrália	80	22,5	15,0	WILCOX et al., 2000
Europa Mediterrânea	35	63,0	60,0	ZELANTE et al., 1997
Itália e Espanha	136	57,3	43,0	ESTIVILL et al., 1998
Itália	179	32,9	32,9	GUALANDI et al., 2002
Reino Unido	142	33,1	24,6	HUTCHIN et al., 2005
Turquia	60	23,3	23,3	UYGUNER et al., 2003
Turquia	93	31,2	25,8	KALAY et al., 2005
Croácia	66	36,3	31,8	MEDICA et al., 2005
Eslováquia	90	52,2	50,0	MINARIK et al., 2005
Marrocos	116	24,0	24,0	GAZZAZ et al., 2005
Israel	75	38,7	21,3	SOBE et al., 2000
Israel (Ashkenazi)	27	70,4	26,0	LERER et al., 2000
Irã	664	16,7	13,4	NAJMABADI et al., 2005
Brasil	62	17,7	12,9	OLIVEIRA et al., 2002
Brasil	75	6,7	5,3	PFEILSTICKER et al., 2004
Brasil	33	27,3	27,3	PIATTO et al., 2004
Argentina	46	39,0	24,0	DALAMÓN et al., 2005

2.2.1.2 Mutações no gene *GJB2* e características clínicas da perda auditiva

Embora a função do gene *GJB2* seja de grande importância para o estudo da deficiência auditiva não-sindrômica, apenas alguns poucos estudos descrevem, detalhadamente, as características clínicas da perda auditiva decorrente de mutações neste gene.

De acordo com os achados de DENOYELLE et al. (1999), o perfil audiológico, em indivíduos com deficiência auditiva caracterizada por mutação no gene *GJB2* é, freqüentemente, pré-lingual, bilateral simétrica, de grau severo ou profundo, sendo que uma minoria apresenta perda auditiva de grau moderado e não há aparentes correlações da severidade da perda auditiva com mutações específicas no gene.

MORTON (2002) também descreve que, geralmente, indivíduos com perda auditiva autossômica recessiva têm deficiência auditiva congênita e pré-lingual, e indivíduos com perda auditiva autossômica dominante têm deficiência auditiva pós-lingual e progressiva. Uma explicação para estas características poderia ser a completa ausência da proteína funcional em distúrbios recessivos, enquanto em distúrbios autossômicos dominantes, essas mutações determinam uma função inicial e subsequente perda de audição devida a um processo degenerativo e cumulativo. Segundo BRAGA (1998), os genes dominantes relacionados à deficiência auditiva não-sindrômica têm penetrância incompleta.

MURGIA et al. (1999) conduziram um estudo com 53 indivíduos portadores de perda auditiva congênita não-sindrômica, a partir de grau moderado, cujo objetivo foi verificar a relevância das alterações do gene da Cx26

como causa da deficiência auditiva, definir características clínicas e delimitar o padrão audiométrico da perda auditiva. Homozigose para a mutação *35delG* foi encontrada em 30% dos indivíduos da amostra e a avaliação audiológica mostrou que a perda auditiva, além de ser simétrica, pode variar de grau moderado a profundo na média das frequências tonais médias (500, 1K e 2KHz), sendo que foi observada diferença no grau da perda entre os homozigotos quanto à mutação *35delG*, em uma mesma família.

ENGEL-YEGGER et al. (2003) selecionaram 128 indivíduos de um vilarejo com alto índice de consangüinidade e deficiência auditiva congênita e procuraram detectar o efeito das mutações *35delG*, *W77R* e *V37I* na expressão fisiológica e possíveis diferenças fenotípicas entre homozigotos e heterozigotos para cada mutação, e também entre portadores e não-portadores a fim de determinar o local da via auditiva afetado por estas mutações. A análise dos resultados fenotípicos deu-se por meio da avaliação audiométrica, das otoemissões acústicas e dos potenciais auditivos evocados do tronco cerebral. A perda auditiva entre homozigotos e heterozigotos variou de grau leve a profundo, com perda da função das células ciliadas externas.

Os autores concluíram que mutações no gene da Cx26 podem prejudicar o funcionamento coclear, o qual é dependente das junções *gap*. Os fenótipos similares de homozigotos e heterozigotos compostos sugeriram que as mutações investigadas afetam a função das células ciliadas externas, e que estas podem ser mais susceptíveis às mutações quando comparadas às células ciliadas internas, nervo auditivo e via auditiva no tronco cerebral. A variação no grau da perda de células ciliadas internas pode ser explicada pelas diferentes interações e

influências de outros genes sobre o gene da Cx26. Os autores acreditam que o exame de otoemissões acústicas por produto de distorção pode servir como teste sensitivo na avaliação precoce da deficiência auditiva, apesar de prover somente uma informação auditiva parcial, pois só analisa as células ciliadas externas. Além disso, os fenótipos de homozigotos e heterozigotos compostos também sugerem prejuízo parcial do funcionamento neural das células ciliadas internas e do nervo auditivo, o que vem reforçar a necessidade da avaliação adicional do potencial evocado auditivo do tronco cerebral.

Um estudo com 277 deficientes auditivos pertencentes a quatro países, sobre a correlação genótipo-fenótipo para a deficiência auditiva, decorrente de mutações no gene *GJB2*, trouxe novas elucidações sobre a heterogeneidade genética (CRYNS et al., 2004). As mutações foram classificadas quanto ao seu efeito funcional sobre a Conexina 26, em mutações inativantes (que conduzem a uma ausência ou truncamento da proteína) e não-inativantes. Os resultados revelaram que a cosegregação de alguns genótipos do gene *GJB2* têm perda auditiva significativamente menos severa, quando comparada com a perda auditiva em homozigotos para a mutação *35delG*. As mutações classificadas como inativantes conduzem a um fenótipo mais grave. A variante *V37I* tem sido relatada ou como uma “mutação” ou como um “polimorfismo” em estudos anteriores (KELLEY et al., 1998; ABE et al., 2000; WILCOX et al., 2000) e quando em homozigose ou em heterozigose com a mutação *35delG*, resulta em um fenótipo de perda auditiva de grau leve.

Um total de 63 indivíduos da Turquia também foi analisado quanto à variabilidade fenotípica da deficiência auditiva, considerando o efeito funcional

sobre a Conexina 26 (mutações inativantes e não-inativantes). Não foi encontrada diferença estatisticamente significativa na comparação do grau de perda auditiva entre homozigotos para a mutação *35delG* e demais genótipos, levando esses autores a concluírem que, a presença de diferentes graus de perda auditiva, em indivíduos com mutações no gene *GJB2*, permanece desconhecida (HISMI et al., 2006).

Na população de origem japonesa, a mutação mais comum é uma mutação inativante no gene *GJB2*, a *235delC*, comparativamente a *35delG*, cuja ancestralidade é de origem européia. A segunda mutação mais comum é a *V37I*, cujo fenótipo tem sido caracterizado como de perda auditiva leve. Com o propósito de comparar as diferenças nos fenótipos destas duas mutações e avaliar o quanto estas diferenças fenótípicas poderiam ser explicadas por estudos de expressão da proteína, OGUSHI et al.(2005) analisaram os dados da avaliação audiométrica de 60 indivíduos com mutações bialélicas no gene *GJB2*.

Os resultados deste estudo revelaram uma diferença significativa entre o grau da perda auditiva dos homozigotos para a *235delC* (grau severo e profundo) e dos homozigotos para a *V37I* (grau leve e moderado). Consistentemente com resultados encontrados em estudo anterior (CHOUNG; MOON; PARK, 2002), mutações com efeito inativante no domínio transmembrânico da conexina, como a *235delC*, conduzem a uma perda de função da proteína, resultando em deficiência auditiva grave. Já a mutação *V37I*, categorizada como não-inativante, não impede que a proteína seja encontrada ao longo da membrana citoplasmática como no indivíduo homozigoto selvagem, indicando que a proteína pode reter parte de sua função, resultando em um fenótipo menos grave. Sendo assim, os autores

consideraram o *status* da mutação *235delC*, comparável ao da mutação *35delG*, cujas prevalências de ambas nas respectivas populações, asiática e europeia, seriam devidas a efeito fundador (VAN LAER et al., 2001).

Na tentativa de estabelecer uma melhor correlação genótipo-fenótipo, FRANZÉ et al. (2005) analisaram os dados da avaliação audiométrica de heterozigotos para a mutação *35delG*, com aparente audição normal, consangüíneos de homozigotos para a mesma mutação. Os resultados foram comparados aos de um grupo controle e a diferença foi estatisticamente significativa quanto aos limiares das freqüências de 6000Hz e 8000Hz. Os heterozigotos apresentaram limiares auditivos >25dBNA nas freqüências agudas, o que caracteriza diminuição da sensibilidade auditiva.

MATSUNAGA et al. (2006) investigaram os aspectos clínicos da audição e do desenvolvimento da linguagem em indivíduos de origem japonesa, com deficiência auditiva congênita devido a mutações no gene *GJB2* e a outros fatores, que faziam parte de um processo de habilitação com o aparelho de amplificação sonora. As avaliações constaram de audiometria tonal liminar condicionada ou não, reconhecimento de fala com e sem o aparelho de amplificação sonora, desenvolvimento do vocabulário e performance de leitura. Todas essas avaliações foram realizadas de acordo com a faixa etária do indivíduo afetado. Como resultado, a proporção de indivíduos com perda auditiva de grau moderado tendeu a ser maior naqueles com mutações no gene *GJB2* do que nos indivíduos sem mutações neste gene, e a proporção de indivíduos com perda auditiva de grau profundo tendeu a ser maior em homozigotos para a mutação *235delC* do que em

heterozigotos compostos, apesar da diferença não ter sido estatisticamente significativa.

A avaliação do reconhecimento de fala mostrou-se compatível com disfunção coclear, assim como o desenvolvimento do vocabulário foi similar em ambos os grupos, mostrando ser ligeiramente menor que em indivíduos ouvintes normais. A performance de leitura também foi equivalente em ambos os grupos.

2.2.2 *GJB6* (Conexina 30)

A conexina 30 é codificada pelo gene *GJB6* localizado no loco *DFNB1*, a 35Kb do gene *GJB2* em direção ao telômero. Tem sido postulado que, em deficientes auditivos, o gene *GJB6* é um forte candidato a heterozigosidade composta com o gene *GJB2*, já que a conexina 30 é expressa nas mesmas estruturas da orelha interna onde também se expressa a conexina 26 (ligamento espiral, limbus espiral, estria vascular e células de suporte do Órgão de Corti)) e ambas são relacionadas, pois conexons compostos de Cx26 podem se ligar a conexons compostos de Cx30 para formar canais heterotípicos de junções *gap* (DAHL et al., 1996). Estudos de ligação realizados em indivíduos portadores de deficiência auditiva, de origem espanhola e cubana, heterozigotos para mutações no gene *GJB2*, revelaram que a outra mutação poderia estar na mesma região 13q12. Com a utilização de marcadores, os pesquisadores encontraram uma deleção de mais de 300Kb na região codificadora do gene *GJB6* (DEL CASTILLO et al., 2002).

Segundo DEL CASTILLO et al. (2002), a freqüente ocorrência de heteroziguidade para esta deleção, denominada de del(*GJB6-D13S1830*), concomitante com o gene *GJB2* poderia ser explicada com base em padrão de herança monogênico ou digênico. No caso de padrão monogênico de herança, seria necessário um elemento regulador que fosse essencial para a expressão do gene *GJB2* na orelha interna. Este hipotético elemento estaria localizado a montante de ambos os genes, e a deleção deste elemento suprimiria o nível de expressão do gene *GJB2*, o suficiente para produzir o fenótipo da deficiência auditiva. A segunda alternativa, a qual explicaria um padrão digênico de herança, sustenta a hipótese de que a deleção inativaria um segundo gene cuja proteína está funcionalmente relacionada à Conexina 26, que poderia ser o próprio gene da Conexina 30.

O estudo de DEL CASTILLO et al. (2002) relatou que indivíduos com perda auditiva pré-lingual poderiam ser homocigotos para mutações de ponto que inativariam alelos do gene *GJB6* ou heterocigotos para a deleção del(*GJB6-D13S1830*) e alelos mutantes do gene *GJB2*. Este tipo de padrão complexo de herança, em que a perda de dois dos quatro alelos resultam em deficiência auditiva, já tem sido relatado em outros distúrbios recessivos, como a retinite pigmentosa (KAJIWARA , BERSON e DRYJA, 1994 apud DEL CASTILLO et al., 2002).

Outros estudos revelaram que diferentes mutações não sinônimas no gene *GJB6* são responsáveis por perda auditiva autossômica dominante e/ou displasia ectodérmica hidrótica autossômica dominante, provavelmente porque

codificam proteínas não funcionais ou causam efeitos dominantes negativos (GRIFA et al., 1999; LAMARTINE et al., 2000).

DEL CASTILLO et al. (2003) apoiaram a hipótese do padrão digênico de herança ao investigarem a contribuição da deleção del(*GJB6-D13S1830*) para a deficiência auditiva em nove países. As maiores frequências foram encontradas na Espanha, França, Reino Unido, Israel e Brasil, variando de 5,9% a 9,7% de todos os alelos investigados do loco *DFNB1*. A frequência da deleção del(*GJB6-D13S1830*), em todas as populações estudadas, não foi alta o suficiente para resultar em um grande número de homozigotos (<0,5%). Este estudo expandiu os resultados de um estudo prévio realizado em 2002 (DEL CASTILLO et al., 2002) e confirmou que as deleções relatadas por LERER et al. (2001) e PALLARES-RUIZ et al. (2002) são a mesma del(*GJB6-D13S1830*), além de conferir o tamanho correto da deleção (309Kb) de acordo com dados do seqüenciamento.

DEL CASTILLO et al. (2005) relataram uma nova deleção, também truncando o gene *GJB6*, mas resultando em perda de um segmento menor que o da deleção del(*GJB6-D13S1830*). Esta nova deleção, denominada de del(*GJB6-D13S1854*), foi encontrada em *trans* em indivíduos afetados por mutações no gene *GJB2*, acometendo 25,5% dos heterozigotos de origem espanhola, 22,2% dos heterozigotos do Reino Unido, 6,3% dos heterozigotos do Brasil e 1,9% dos heterozigotos do norte da Itália. Os autores acreditam que esta deleção surgiu por recombinação homóloga desigual, envolvendo duas seqüências Alu que pertencem à subfamília Y e que este mecanismo pode gerar outras deleções no loco *DFNB1*.

Os mesmos autores também acreditam na existência de um elemento regulador em *cis*, ativando a expressão do gene *GJB2* está de acordo com a hipótese de que este elemento seria removido pelas deleções e sua ausência traria efeitos drásticos na expressão do gene *GJB2*, ao ponto em que a expressão do alelo normal se tornaria como um alelo nulo. Os autores comentam que ambas as hipóteses possam ser combinadas, mas que a haploinsuficiência da *Cx30* pode contribuir para a piora do fenótipo.

DEL CASTILLO et al. (2005) relatam que ambas as deleções inativam o gene *CRYL1*, removendo o intervalo de seqüência entre os genes *GJB6* e *CRYL1*, onde não tem sido relatada a existência de genes adicionais. O gene *CRYL1* é amplamente expresso e seu produto, λ -cristalina, mostra similaridade com 3-hidroxiacetilcolina A dehidrogenase, mas sua contribuição para a deficiência auditiva permanece desconhecida.

A variabilidade fenotípica entre indivíduos com heterozigosidade composta *GJB2/GJB6* foi verificada no estudo de BOLZ et al. (2004), que avaliaram dois indivíduos heterozigotos para a mutação *35delG* (*GJB2*) e para a deleção *del(GJB6-D13S1830)*. Um indivíduo apresentou grau profundo e o outro, grau moderado de perda auditiva. A explicação de um fenótipo menos severo com relação ao grau da deficiência auditiva poderia ser a existência de um elemento modificador, regulando a expressão do *GJB2* ou do *GJB6*, ou ainda de ambos os genes. O envolvimento de outros genes, por exemplo, o *GJB3* e *GJA1*, codificando outras proteínas de junções *gap* que poderiam ser funcionalmente relacionadas ou interagirem com o *GJB2* e/ou *GJB6* na orelha interna, também

pode desempenhar um interessante papel nesta variabilidade (LIU et al., 2000; 2001).

Um estudo realizado em diversos centros de pesquisa de diversos países coletou dados da avaliação audiométrica de 1531 indivíduos com mutações bialélicas no gene *GJB2* e com a deleção *del(GJB6-D13S1830)* do gene *GJB6*. O grupo de homozigotos para a mutação *35delG* foi considerado como de referência para as comparações, por ser o genótipo mais relatado em estudos anteriores e com a maior prevalência na amostra deste estudo. As comparações foram feitas em classes genótípicas, considerando o efeito funcional sobre a Conexina 26, em mutações inativantes e não-inativantes, como já citado em estudos anteriores. Os resultados revelaram que o fenótipo de heterozigotos compostos, para os genes *GJB2* e *GJB6*, apresenta maior severidade quanto ao grau de perda auditiva do que os homozigotos para a mutação *35delG*, além de confirmar uma variação fenotípica significativa nos demais genótipos analisados (SNOECKX et al., 2005).

No estudo de FREI et al. (2004) não foi detectada a presença da deleção *del(GJB6-D13S1830)* na população estudada, originada do leste da Áustria, revelando uma tendência observada em outros relatos que, em populações de afetados com baixa porcentagem de heterozigotos para mutações da conexina 26, a deleção *del(GJB6-D13S1830)* apresenta uma pequena ou nenhuma relevância. Este resultado também foi encontrado nas populações originadas da Turquia, da República Tcheca, de Marrocos, da Croácia, da Indonésia e do Irã, respectivamente (UYGUNER et al., 2003; KALAY et al., 2005; SEEMAN et al., 2005; GAZZAZ et al., 2005; MEDICA et al., 2005; SNOECKX et al., 2005; NAJMABADI et al., 2005).

2.3 OUTROS DISTÚRBIOS DECORRENTES DE MUTAÇÕES NOS GENES DAS CONEXINAS.

Mutações em genes de conexinas estão também relacionadas a síndromes ou distúrbios associados ao comprometimento da pele e anexos e do sistema nervoso periférico.

Segundo FREIRE-MAIA e PINHEIRO (1984), as displasias ectodérmicas formam um grupo heterogêneo de afecções, sendo que um grande número delas é muito pouco conhecido, tanto sob o ponto de vista clínico como etiológico. A grande maioria das displasias apresenta sinais em tecidos provenientes de dois ou mais folhetos embrionários. Os três folhetos embrionários (endoderme, mesoderme e ectoderme) já existem na terceira semana do embrião, dos quais se originarão todos os tecidos adultos.

Uma displasia é um defeito de organização tissular. Em 1971, FREIRE-MAIA apresentou uma classificação clínico-mnemônica das displasias ectodérmicas, em dois grupos: A – afecções com pelo menos dois sinais clássicos, (1) pêlo, (2) dente, (3) unha e (4) sudorese; B – afecções com apenas um dos sinais clássicos acompanhado de pelo menos um outro sinal afetando uma estrutura de origem ectodérmica, com ou sem malformação. Estes sinais clínicos deveriam ser derivados do que se supõe serem defeitos ectodérmicos primários. Um grande número de sinais corresponde a sinais ectodérmicos enquanto outros derivam de displasias com outra origem ou são malformações.

Atualmente, é reconhecido que a grande heterogeneidade clínica observada entre as displasias ectodérmicas está associada a uma grande

heterogeneidade genética. Para os mesmos autores, a heterogeneidade parece evidente, uma vez que sinais clínicos ocorrem com as respectivas freqüências de 91%, 80%, 75% e 42%, em pêlos, dentes, unhas e sudorese, respectivamente. A deficiência auditiva, sendo considerada como um item do grupo B, pode ocorrer em uma freqüência de 24%, podendo ser do tipo condutiva, neurossensorial ou ambas.

GUALANDI et al. (2002) estudaram 179 indivíduos de origem italiana, portadores de deficiência auditiva não-sindrômica, sendo que seis dentre 59 deles (9,8%), que apresentavam pelo menos um alelo mutado no gene *GJB2*, possuíam sinais extra-auditivos (pele, sistema vascular, células hematopoéticas e tireóide). Este achado sugere que mutações que levam à perda de função do gene podem também estar associadas à ocorrência de outros sinais clínicos além da deficiência auditiva.

Segundo RABIONET et al. (2002), o gene da Cx26 (*GJB2*), por exemplo, encontra-se alterado em pacientes portadores das seguintes displasias ectodérmicas de herança autossômica dominante: EKV (eritroqueratodermia variável), queratoderma palmo-plantar, síndrome de Vohwinkel, síndrome KID (queratite, ictiose e deficiência auditiva). A síndrome de Clouston (displasia ectodérmica hidrótica), também com herança autossômica dominante, está relacionada à mutação no gene da Cx30 (*GJB6*) e há uma forma de EKV com o mesmo mecanismo de herança, associada à mutação no gene da Cx31 (*GJB3*). O gene *GJB4* (Cx30.3) está relacionado ao EKV com Eritema gyratum repens. Além disso, novas síndromes, recentemente descritas, caracterizam-se pela associação entre deficiência auditiva e defeitos ectodérmicos, como a encontrada por

MÉGARBANÉ et al. (2002), que descreveram uma nova síndrome em dois irmãos que apresentavam craniossinostose, deficiência auditiva, retardo mental e alterações dos cabelos, e a encontrada por LANDAU et al. (2002), que descreveram uma família com deficientes auditivos em 4 gerações, portadores de eritroqueratodermia. Os autores acreditam que o fenótipo possa estar relacionado à mutação no gene da Cx30.3 (não foi realizada análise molecular).

SZYMKO-BENNETT et al. (2002) avaliaram as manifestações auditivas da Síndrome KID (*Keratitis-Ichthyosis-Deafness*), uma rara displasia ectodérmica caracterizada por hiperqueratose folicular, queratite vascularizante e perda auditiva congênita, com o objetivo de ressaltar a importância da identificação precoce da deficiência auditiva, bem como da intervenção otológica e audiológica precoce, a fim de maximizar a reabilitação de fala e de linguagem, enquanto existir resíduo auditivo significativo, na tentativa de superar as dificuldades de comunicação associadas a este distúrbio. Avaliaram cinco indivíduos portadores da forma esporádica da síndrome KID, com a presença das três maiores características clínicas: perda auditiva neurossensorial congênita, hiperqueratose cutânea e queratite na córnea. Um indivíduo apresentava perda auditiva neurossensorial de grau leve e, os demais, perda auditiva neurossensorial de grau severo para profundo. Esses autores observaram que a presença de queratose e de cistos no canal auditivo externo representa uma dificuldade permanente no processo de reabilitação auditiva, pois, freqüentemente, existe a rejeição quanto ao uso dos moldes auriculares e, conseqüentemente, do aparelho de amplificação sonora, o que ocorreu com três indivíduos deste estudo. Para estes casos, foi necessário o uso da língua de sinais em associação à comunicação oral, já que se

tornou inviável o uso da amplificação convencional. Entretanto, uma complicação adicional relaciona-se ao déficit visual resultante da queratite que interfere na percepção da língua de sinais, bem como na leitura oro-facial, dificultando o processo de reabilitação auditiva.

VAN GEEL et al. (2002) apresentaram evidências de que as síndromes KID e HID (*Hystrix-like Ichthyosis–Deafnesss*) são ambas associadas com uma idêntica mutação não-sinônima no gene da Cx26 e representam um espectro de variabilidade fenotípica associado com mutação de um único gene. A síndrome HID é um distúrbio queratinizante de transmissão autossômica dominante, caracterizado pela deficiência auditiva neurossensorial e hiperqueratose afetando toda a pele. O distúrbio se manifesta logo após o nascimento com eritrodermia e, após o primeiro ano de vida, o fenótipo se desenvolve significativamente. No indivíduo estudado foram observadas mudanças progressivas na pele desde o nascimento, sem presença de queratite. Foi notada a formação de múltiplos carcinomas desde os 31 anos de idade, ocorrendo, predominantemente, nas pernas. Os tumores foram retirados cirurgicamente e não houve recorrência. No exame clínico, foram observados hiperqueratose e eritroderma na face e couro cabeludo, como também nas palmas e nas solas dos pés. A perda auditiva é neurossensorial de grau severo a profundo e um filho deste paciente, do sexo masculino, era igualmente afetado, sugerindo herança autossômica dominante.

Os autores afirmaram que a queratite na síndrome HID possa ser menos severa que a encontrada na síndrome KID, apesar de relatarem que conclusões de vários outros estudos não afirmaram isso. A queratite é um sintoma não específico que não serve para diferenciar estes distúrbios. Existe uma

expressividade variável na síndrome KID. Mutações simultâneas e polimorfismos em outros genes que expressam características da pele podem explicar este fenômeno, entretanto não existem argumentos sólidos clínico-patológicos para diferenciar os dois distúrbios e, por meio dos achados de VAN GEEL et al. (2002), a mutação *D50N* no gene *GJB2* associada à síndrome KID confirmou, em nível molecular, que as duas síndromes são geneticamente idênticas.

RICHARD et al. (2002) procuraram evidências de que a síndrome KID seria causada por heterozigose devida a mutações não-sinônimas no gene *GJB2* (*D50N*, *S17F* e *G12R*). A substituição de aminoácido da mutação *D50N* ocorre na alça do primeiro domínio extracelular da Conexina 26, altamente conservado e que tem papel crucial na voltagem e nas interações conexon-conexon. As duas outras mutações (*S17F* e *G12R*) afetam resíduos no terminal amino do domínio citoplasmático, que são conservados entre todas as conexinas do tipo β de diferentes espécies, e ambas as mutações podem alterar a carga e a estrutura deste domínio. Sabendo que as junções *gap* são encontradas em muitos órgãos epiteliais, incluindo cóclea, epiderme palmoplantar, folículos capilares e glândulas sudoríparas, os autores estudaram a expressão da conexina em células lesionadas da pele de um indivíduo heterozigoto para a mutação *G12R*. As observações demonstraram que a mutação *G12R* não interfere na síntese e na distribuição intracelular da Cx26 *in vivo*. Nestas estruturas, foi observado por meio de imunofluorescência, que a Cx26 interage extensivamente com a Cx30 nas junções, seja no tipo selvagem ou mutado., e a partir da observação de que a distribuição e a intensidade da Cx43 e da Cx30 não foram significativamente

alteradas, foi formulada a hipótese de que a expressão do mutante da Cx26 na KID pode ser prejudicial para a função das junções *gap*, alterando o nível normal de conexinas na pele.

Os genes *GJB1* e *GJB3* são expressos no tecido nervoso e mutações nesses genes estão relacionadas a neuropatias periféricas. O gene *GJB1* localiza-se no cromossomo X e as formas dominante e recessiva da síndrome Charcot-Marie-Tooth, ligada ao X, deve-se à mutação desse gene. RABIONET et al. (2002) relata que existem mais de 240 mutações descritas em pacientes com esse fenótipo.

No caso do gene *GJB3*, LOPEZ-BIGAS et al. (2001) descreveram uma família com neuropatia periférica, úlceras de pele crônicas e deficiência auditiva assimétrica e de grau leve, relacionadas à mutação desse gene. O fenótipo é transmitido como autossômico dominante.

Neste estudo, será dada ênfase à verificação dos sinais clínicos listados por FREIRE-MAIA (1971), bem como sua relação genótipo-fenótipo quanto à presença de mutações no gene da Conexina 26.

3. OBJETIVOS

Verificar a presença de mutações nos genes *GJB2* e *GJB6* em uma amostra composta de indivíduos portadores de deficiência auditiva neurossensorial, realizando uma análise comparativa entre genótipo e fenótipo.

3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Identificar a presença da mutação *35delG* no exon 2 do gene *GJB2*.
- Identificar a presença das deleções *del(GJB6-D13S1830)* e *del(GJB6-D13S1854)* do gene *GJB6*.
- Caracterizar a afecção do ponto de vista fenotípico, avaliando:
 - a) tipo e grau de perda auditiva dos indivíduos portadores de deficiência auditiva neurossensorial;
 - b) prejuízo coclear e neural dos mesmos;
 - c) aspecto clínico dos afetados com relação à presença de sinais extra-auditivos, com especial atenção aos sinais ectodérmicos.
- Relacionar a manifestação fenotípica à(s) mutação(ões) encontrada(s).

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 CASUÍSTICA

A casuística deste estudo constituiu-se de uma amostra de 156 portadores de deficiência auditiva neurossensorial, residentes na cidade de Curitiba (PR), pertencentes a 144 famílias e integrantes de escolas de educação especial para deficientes auditivos.

Esse estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná, com o registro sob nº 023-06. A coleta da amostra foi feita a partir do consentimento da diretoria das escolas e dos pais ou responsáveis pelos portadores da deficiência, que concordaram em participar da entrevista (Apêndice 1) e que permitiram a coleta de sangue para análise laboratorial e a realização da avaliação auditiva, assinando o termo de consentimento (Apêndices 2 e 3).

O estudo seguiu 4 etapas para a coleta dos dados, sendo que as etapas 3 e 4 foram realizadas concomitantemente durante os anos de 2005 e 2006:

1. Anamnese clínica.
2. Coleta de sangue dos deficientes auditivos para análise laboratorial.
3. Avaliação laboratorial.
4. Avaliação audiológica completa, constando de avaliação comportamental e eletrofisiológica.

A anamnese clínica consta de uma investigação criteriosa de todas as informações pertinentes à provável etiologia e caracterização da deficiência

auditiva no âmbito familiar, social e educacional dos indivíduos. Outras informações com relação à presença de sinais extra-auditivos foram também investigadas para caracterização fenotípica da amostra.

Esta anamnese foi respondida por um dos pais ou responsável, na própria escola e/ou associação a que o indivíduo é integrante. O levantamento do heredograma foi realizado no momento da anamnese.

As entrevistas tiveram início em março de 2004 e foram realizadas até março de 2006, atingindo o número de 209. Entretanto, 53 casos foram retirados da amostra, em vista de diferentes fatores: mudança de escola e/ou de cidade (N = 26), recusa ou impossibilidade de doar sangue para a pesquisa (N = 16), deficiência auditiva sindrômica (N = 4), forte evidência de perda auditiva não congênita (N = 6) e perda auditiva diagnosticada durante o exame pré-natal (por meio de observação da movimentação do bebê na presença de estímulos sonoros de forte intensidade) em decorrência de rubéola gestacional (N = 1).

Os 156 casos, que compõem a amostra, apresentam deficiência auditiva supostamente congênita. Na anamnese de vários casos destes 156, foram registrados fatores ambientais significativos para o desenvolvimento de uma perda auditiva, os quais estão classificados no Apêndice 4.

A casuística é composta por 68 indivíduos do sexo feminino (43,6%) e 88 do sexo masculino (56,4%). A distribuição de faixa etária, calculada até 31 de dezembro de 2006, está mostrada na Tabela 4. A idade média (\pm E.P) é $12,47 \pm 0,51$ e a amplitude de variação foi de 1 a 43 anos.

TABELA 4 – Distribuição da amostra segundo a faixa etária.

FAIXA ETÁRIA (anos)	N	%
01 a 05	7	4,49
5,1 a 10	57	36,54
10,1 a 15	44	28,21
15,1 a 20	30	19,23
20,1 a 25	14	8,97
25,1 a 30	1	0,64
30,1 a 35	1	0,64
35,1 a 40	1	0,64
40,1 a 45	1	0,64
TOTAL	156	100

O grau de instrução dos indivíduos é bastante variado, sendo 45,51% freqüentam o ensino fundamental, de 1ª a 4ª série, como mostra a Tabela 5.

TABELA 5 - Distribuição da amostra segundo o grau de escolaridade.

GRAU DE ESCOLARIDADE	N	%
Educação Infantil	45	28,85
Ensino fundamental (1ª a 4ª série)	71	45,51
Ensino fundamental (5ª a 8ª série)	22	14,10
Ensino médio	17	10,90
Superior	1	0,64
Total	156	100

Com base na observação da cor da pele, da cor e tipo dos cabelos e da forma dos traços fisionômicos, 3 famílias de portadores de deficiência auditiva foram consideradas como resultantes de miscigenação entre africanos e europeus (2,08%), sendo as demais famílias classificadas como descendentes de europeus. No sentido de classificar melhor a origem étnica dos probandos, foi realizada uma análise da origem dos sobrenomes paternos. Apenas nos casos em que não havia essa informação, foi utilizado o sobrenome da mãe. A classificação dos sobrenomes foi feita após consulta à Internet (<http://www.ancestry.com>) e à bibliografia especializada (GUÉRIOS, 1981) e, no caso de nomes devocionais (santos, invocações de Nossa Senhora, símbolos religiosos e cerimônias católicas) foi atribuída etnia resultante de miscigenação entre africanos e europeus, conforme TAVARES-NETO e AZEVEDO (1977). Considerando-se os dados de sobrenome das 144 famílias, a frequência de probandos com origem europeia foi de 90,27%, os resultantes de miscigenação entre africanos e europeus tiveram frequência de 9,03%, havendo um probando de ascendência asiática (0,70%).

4.2 COLETA DE SANGUE PARA ANÁLISE LABORATORIAL

Este procedimento foi realizado na escola por intermédio de uma profissional farmacêutica. Foram coletados 5mL de sangue da veia superficial do antebraço, os quais foram misturados ao anticoagulante EDTA.

No Laboratório de Polimorfismos e Ligação, do Departamento de Genética, da Universidade Federal do Paraná, foi realizada a separação, por centrifugação a 2500rpm por 20 minutos, de alíquotas de plasma, hemácias e

leucócitos (creme leucocitário), bem como os demais procedimentos da Avaliação Laboratorial.

4.3 AVALIAÇÃO LABORATORIAL

4.3.1 Extração do DNA

Para extração do DNA foi utilizada a técnica de *salting-out* (LAHIRI; NURNBERGER Jr., 1991). A partir do creme leucocitário, foram realizados os seguintes passos:

- Lise das hemácias com 10ml de TKM1 (Tris-HCL pH 7,6 10mM, KCL 10mM, MgCl₂ 10mM, EDTA pH8,0 2mM); centrifugação a 2500rpm por 20 minutos e descarte do sobrenadante. Após centrifugação, foi repetida a lavagem com TKM1 até que as hemácias estivessem completamente lisadas. Foram adicionados 25µl de IGEPAL 630 (SIGMA) à solução de lavagem antes da primeira centrifugação (2500rpm por 20 minutos);
- Lise dos leucócitos com 800µl de TKM2 (Tris-HCL pH 7,6 10mM, KCL 10mM, MgCl₂ 10mM, EDTA pH 8,0 2mM, NaCl 0,4M) e adição de 50µl de SDS 10%, e incubação por uma noite em banho-maria a 55°C;
- Precipitação das proteínas após adição de 300µl de solução de NaCl saturada, 6M; centrifugação a 12000rpm por 20 minutos; passagem do sobrenadante para um novo tubo, descartando o precipitado;
- Precipitação do DNA após adição de 2 volumes de etanol absoluto gelado, com leve agitação;

- Lavagem do DNA com 1ml de etanol a 70%, sendo que este processo foi repetido por mais três vezes;
- Evaporação do etanol em estufa;
- Ressuspensão do DNA com água ultra pura ou TE;
- Banho-maria a 55°C por 3 dias;
- Manutenção do DNA em refrigerador por 3 dias.

Após a extração do DNA, em muitos casos foram feitas determinações da concentração de DNA das amostras no espectrofotômetro Biotec – GeneQuant RNA/DNA Calculator (Pharmacia).

4.3.2 PCR (Reação em Cadeia da Polimerase)

A metodologia da PCR baseia-se no princípio de que iniciadores totalmente complementares são eficientemente usados para amplificar uma seqüência alvo.

As soluções para amplificação foram feitas com 10 μ L de volume total da reação, contendo 9 μ L de PCR supermix (Invitrogen – 122mM Tris-HCl pH 8,4, 55mM KCl, 1,65mM MgCl₂, 220 μ M dGTP, 220 μ M dATP, 220 μ M dTTP, 220 μ M dCTP, 22 U/mL de *Taq* DNA polimerase recombinante e estabilizadores), 1 μ L de DNA (cerca de 150 ng), 10 pmoles de cada iniciador.

As PCRs foram realizadas em dois tipos de termocicladores, de acordo com a disponibilidade: MJ Research PTC-100 e Techgene FTgene2D.

As condições de ciclagem são descritas a seguir de acordo com a mutação a ser identificada.

4.3.3 Genotipagem do Gene *GJB2* – Mutação *35delG*

Esta mutação encontra-se no segundo exon deste gene, o qual possui 2.131pb, e a região codificadora, 677pb.

A análise da mutação foi realizada por intermédio da utilização da enzima de restrição *MvaI* (isoesquisômero da *EcoRII*), seguida de uma eletroforese em gel de poliacrilamida. A reação de PCR foi realizada com as seguintes condições de ciclagem: 1) Desnaturação inicial a 95°C por 5 min.; 2) Desnaturação a 94°C por 40 seg.; 3) Hibridação a 59°C por 30 seg.; 4) Extensão a 72°C por 2 minutos; 5) Repetir passos 2 a 4 por 39 vezes; 6) Extensão Final a 72°C por 2 min.; 7) Finalização a 15°C por 30 minutos.

Conforme ilustrado na Figura 5, as seqüências dos iniciadores utilizados, com seqüência recomendada segundo SCOTT et al. (1998) e WILCOX et al. (2000), são:

INICIADOR 1F - 5' – TCT TTT CCA GAG CAA ACC GC - 3' (20 pb)

MISMATCH - 3' – GCT GGT GGA GTG TTT GTT CAC ACC C **G** C - 5' (27pb)

FIGURA 5 – Seqüência do exon 2 do gene *GJB2*, incluindo a região codificadora (em maiúsculas), mostrando, em vermelho, o ponto da mutação *35delG* (G), a região de hibridização dos iniciadores 1F (linhas 3 e 4) e Mismatch (linhas 4 e 5) sublinhados, o sítio de reconhecimento da enzima para corte (em amarelo) e a base G (em verde), corresponde ao nucleotídeo modificado no iniciador Mismatch.

gatttaatcctatgacaaactaagttggttctgtcttcacctgttttggtgaggttgtgta
agagttggtgtttgctcaggaagagatthaagcatgcttgcttaccagactcagagaagt
ctccctgttctgtcctagctatgttcctgtggtgtgtgcattcgtcttttccagagcaaac
cgcccagagtagaagATGGATTGGGGCACGCTGCAGACGATCC↓TGGGGGTGTGAACAAA
CACTCCACCAGCATTGGAAAGATCTGGCTCACCGTCTTCTTCAATTTTCGCATTATGATCC
TCGTTGTGGCTGCAAAGGAGGTGTGGGGAGATGAGCAGGCCGACTTTGTCTGCAACACCCT
GCAGCCAGGCTGCAAGAACGTGTGCTACGATCACTACTTCCCCATCTCCCACATCCGGCTA
TGGGCCCTGCAGCTGATCTTCGTGTCCAGCCCAGCGCTCCTAGTGGCCATGCACGTGGCCT
ACCGGAGACATGAGAAGAAGAGGAAGTTCATCAAGGGGGAGATAAAGAGTGAATTTAAGGA
CATCGAGGAGATCAAAACCCAGAAGGTCCGCATCGAAGGCTCCCTGTGGTGGACCTACACA
AGCAGCATCTTCTTCCGGGTCATCTTCGAAGCCGCCTTCATGTACGTCTTCTATGTCATGT
ACGACGGCTTCTCCATGCAGCGGCTGGTGAAGTGCAACGCCTGGCCTTGTCCCAACACTGT
GGACTGCTTTGTGTCCCGGCCACGGAGAAGACTGTCTTACAGTGTTCATGATTGCAGTG
TCTGGAATTTGCATCCTGCTGAATGTCACTGAATTGTGTTATTTGCTAATTAGATATTGTT
CTGGGAAGTCAAAAAAGCCAGTTtaacgcattgcccagttgtagattaagaaatagacag
catgagaggggatgaggcaaccctgctcagctgtcaaggctcagtcgccagcatttcccaa
caciaagattctgaccttaaagtgaaccatttgaaaccctgtaggcctcaggtgaaactc
cagatgccacaatgagctctgctcccctaaagcctcaaaacaaggcctaattctatgcct
gtcttaatcttcttcttacttaagttagttccactgagaccccaggctgttaggggttattg
gtgtaaggtaactttcatattttaaacagaggatatcggcatttgtttcttctctgaggac
aagagaaaaagccaggttccacagaggacacagagaaggtttgggtgtcctcctggggtt
ctttttgccaactttccccacgttaaagggtgaacattggttctttcatttgctttggaagt
ttaaactcttaacagtgagacaaagttaccagtgccctaaactctgttacactttttggaag
continua

continuação

tgaaaactttgtagtatgataggttatTTTTgatgtaaagatgTtctggataccattatatg
 ttccccctgtttcagaggctcagattgtaatatgtaaaggtatgtcattcgcactactatga
 ttaatttgaaatatggtcTTTTggttatgaatactttgcagcacagctgagagaggctgt
 ctgTtgTattcattgtggtcatagcacctaacaacattgtagcctcaatcgagtgagacag
 actagaagttcctagttggcttatgatagcaaatggcctcatgtcaaataattagatgtaat
 tTgtgtaagaaatacagactggatgtaccaccaactactacctgtaatgacaggcctgtc
 caacacatctccctTTTTccatgctgtggtagccagcatcggaaagaacgctgatttaaaga
 ggtgagcttggaattttattgacacagtaccatttaatggggagacaaaaatgggggcca
 ggggagggagaagtTtctgtcgTtaaaaacgagTttggaaagactggactctaaattctgt
 tgattaaagatgagctTtgtctaccttcaaaagTttgTttggcttacccttcagcctcc
 aatttttaagtgaaaatataactaataacatgtgaaaagaatagaagctaaggTttgat
 aatattgagcagatctataggaagattgaacctgaatattgccattatgcttgacatggt
 ttcaaaaaatggtactccacatacttcagtgagggtaagtattTtctgtTgtcaagaat
 agcattgtaaaagcattTtgtaataataaagaatagctTtaatgatatgcttgtaactaaa
 ataattTtgtaatgtatcaaatacattTtaaacattTaaatataatctctataat

FONTE: (NCBI: ENTREZ, 2005 – nº M86849)

Na seqüência do iniciador Mismatch, uma Citosina é trocada por uma Guanina (destaque em verde). O produto de amplificação só manterá o sítio de reconhecimento para o corte da enzima, no caso do gene normal. Este sítio será modificado, apenas quando houver a deleção *35de/G*, impedindo o corte da enzima e gerando o próprio fragmento total de 89pb. No caso de cromossomos com a variante normal, o sítio de reconhecimento da enzima permanece intacto, produzindo dois fragmentos (29pb e 60pb). Os heterozigotos apresentam três fragmentos (29pb, 60pb e 89pb) como mostra a Figura 6.

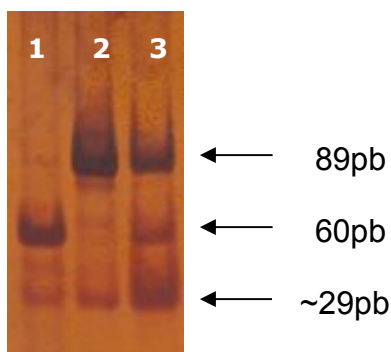


FIGURA 6. Ilustração dos três genótipos quanto à mutação *35delG* do gene *GJB2:1*. 1. Homozigoto selvagem; 2. Homozigoto para *35delG* e 3. Heterozigoto.

Antes de se realizar a digestão, 2,0 μ L do produto da PCR foi submetido a uma eletroforese em minigel de agarose 2%, por 30 min a 80V, para verificar se o produto tinha sido amplificado.

Foram utilizados 5 μ L do produto amplificado na digestão, juntamente com 4 μ L de H₂O ultra pura, 1 μ L de tampão R⁺ e 0,7 μ L de enzima *Mva*I. Essa solução final permaneceu uma noite em banho-maria a 37°C.

Para a análise dos resultados, o produto digerido foi misturado com 10 μ L de corante azul de bromofenol/xileno cianol e submetido à eletroforese em gel de poliacrilamida 8% (solução estoque 29:1) a 250V por 1h30min. Posteriormente, a placa de gel foi corada por impregnação com AgNO₃ (2,02g/L) para visualização do resultado.

4.3.3.1 Coloração do gel de poliacrilamida com nitrato de prata

Esta técnica foi descrita por BUDOWLE et al. (1991) e foram feitas pequenas alterações:

Logo após retirar o gel das placas de vidro, são realizadas as seguintes etapas:

1. Cobertura do gel com uma solução de HNO_3 a 1% durante 3 minutos.
2. Retirada da solução e lavagem com água destilada.
3. Cobertura do gel com uma solução de AgNO_3 (2,02g de AgNO_3 em 1000mL de água destilada) por 20 segundos em forno de microondas.
4. Retirada da solução de nitrato de prata e lavagem com água destilada.
5. A revelação foi feita com uma solução de Na_2CO_3 29,6g/L (170mL de Na_2CO_3 + 92 μL de formaldeído). Foi adicionado 1/3 dessa solução sobre o gel e após 1 minuto foi retirada a solução, e acrescido o restante da solução Na_2CO_3 , ficando no forno microondas por 20 segundos. Em seguida, deixou-se sob agitação até aparecerem as bandas de DNA.
6. Acréscimo de solução de ácido acético a 10% por 5 minutos e, posterior retirada da solução e lavagem com água destilada.
7. Acréscimo de solução de glicerol a 5% por 5 minutos.

Após coloração, foi executada a secagem dos géis, os quais foram colocados entre uma folha de papel filtro e uma de celofane, após terem sido embebidos em uma solução fixadora (30% de metanol e 1% de glicerol). A

secagem dos géis foi feita por intermédio da troca diária do papel filtro, colocado imediatamente abaixo do gel.

4.3.4 Genotipagem do gene *GJB6* – Deleções *del(D13S1830)* e *del(D13S1854)*.

Para detecção de ambas as deleções foi realizada uma PCR multiplex, segundo DEL CASTILLO et al. (2005), cujo objetivo é amplificar segmentos de DNA que contenham a junção dos pontos de quebra de cada deleção, bem como o exon 1 do gene *GJB6*, que é usado como um controle para checar a eficiência da PCR e para distinguir heterozigotos de homozigotos, sendo que o exon 1 é removido pelas deleções. A Figura 7 indica a localização das deleções e do exon 1, bem como dos respectivos iniciadores.

Foram utilizados três pares de iniciadores: um que amplifica a região que apresenta a junção dos pontos de quebra da deleção *del(GJB6-D13S1830)*, produzindo uma banda de 460pb; outro que amplifica a região que contém a junção dos pontos de quebra da deleção *del(GJB6-D13S1854)*, produzindo uma banda de 564pb e um terceiro par que amplifica o exon 1 do gene *GJB6*, produzindo uma banda de 333pb como controle da reação. O resultado a ser encontrado está mostrado na Figura 8.

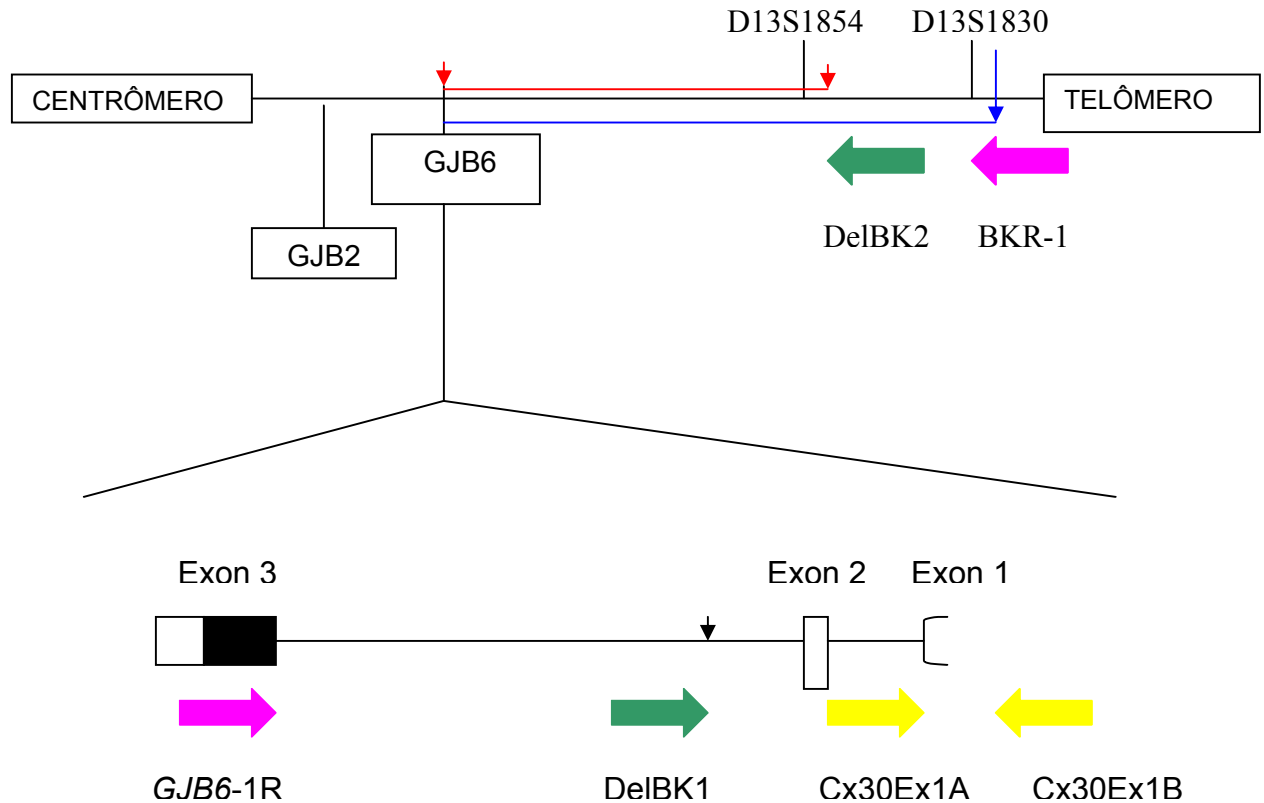


FIGURA 7. Desenho esquemático mostrando a localização dos iniciadores utilizados na PCR multiplex: GJB6-1R e BKR-1, para amplificação da junção do ponto de quebra de $\text{del}(GJB6-D13S1830)$; DelBK1 e DelBK2, para amplificação da junção do ponto de quebra de $\text{del}(GJB6-D13S1854)$; Cx30Ex1A e Cx30Ex1B para amplificação do exon 1 do gene *GJB6* (adaptado de Del Castillo et al., 2006). A linha vermelha mostra o segmento de DNA deletado em $\text{del}(GJB6-D13S1854)$, enquanto a linha azul mostra em $\text{del}(GJB6-D13S1830)$.

Produtos de PCR	A	B	C	D	E	pb
Del(<i>GJB6-D13S1854</i>)		_____	_____			564
Del(<i>GJB6-D13S1830</i>)			_____	_____	_____	460
exon 1 de <i>GJB6</i>	_____	_____		_____		333

FIGURA 8. Ilustração dos produtos de PCR correspondentes a segmentos do gene *GJB6* e de seus respectivos tamanhos em pares de bases (pb), indicados à direita da figura. A (homozigoto selvagem); B, heterozigoto para del(*GJB6-D13S1854*); C, heterozigoto composto, del(*GJB6-D13S1830*) / del(*GJB6-D13S1854*); D, heterozigoto para del(*GJB6-D13S1830*); E, homozigoto para del(*GJB6-D13S1830*).

Os iniciadores foram:

- Referentes ao ponto de quebra da deleção del(*GJB6-D13S1830*):
GJB6-1R, 5' – TTT AGG GCA TGA TTG GGG TGA TTT – 3' e
BKR-1, 5' – CAC CAT GCG TAG CCT TAA CCA TTT T – 3'.
- Referentes ao ponto de quebra da deleção del(*GJB6-D13S1854*):
DelBK1, 5' – TCA TAG TGA AGA ACT CGA TGC TGT TT – 3' e
DelBK2, 5' – CAG CGG CTA CCC TAG TTG TGG T – 3'.
- Controles: **Cx30Ex1A**, 5' – CGT CTT TGG GGG TGT TGC TT – 3' e
Cx30Ex1B, 5' – CAT GAA GAG GGC GTA CAA GTT AGA A – 3'.

O produto de PCR é aplicado em gel de agarose a 2% juntamente com corante Xileno Cianol. A corrida eletroforética é de 1 hora, a 80v. Posteriormente, o gel é imerso em brometo de etídio por 20 minutos e a visualização das bandas é feita por intermédio do transiluminador e fotografado com câmera digital, disponível na Unidade de Seqüenciamento e Análise de DNA (SEAD), do Departamento de Genética. A fotodocumentação das placas de gel foi gravada em computador, no formato jpg, para posterior análise dos resultados.

A caracterização das variantes alélicas e atribuição de genótipos foram realizadas a partir da comparação dos padrões eletroforéticos do DNA dos pacientes com padrões de mutações.

4.4 AVALIAÇÃO AUDITIVA

A quarta etapa da pesquisa foi realizada em parceria com o Laboratório de Pesquisas Fonoaudiológicas – Setor de Audiologia, do Programa de Pós-Graduação em Distúrbios da Comunicação, da Universidade Tuiuti do Paraná (UTP), localizado na cidade de Curitiba-PR. Dos 156 indivíduos da amostra, 101 realizaram parte ou a completa avaliação auditiva neste laboratório. Outros 5 indivíduos já possuíam alguma avaliação auditiva realizada em outras clínicas ou na própria escola, a qual foi considerada no presente estudo.

Os participantes foram submetidos aos seguintes procedimentos: entrevista inicial, inspeção visual do meato acústico externo, medidas de imitância acústica, audiometria tonal liminar (ATL) e logaudiometria, teste de emissões otoacústicas evocadas por estímulo transiente (EOET) e emissões otoacústicas

evocadas por produto de distorção (EOEPD), e avaliação do potencial evocado auditivo do tronco encefálico (PEATE).

A inspeção visual do meato acústico externo teve como objetivo verificar a eventual presença de impedimentos no mesmo, tais como grande quantidade de cera e/ou corpos estranhos, obstruindo a passagem do som e impossibilitando a realização do protocolo de avaliação auditiva. Quando detectados tais impedimentos, foi solicitado ao responsável pelo paciente que procurasse o médico otorrinolaringologista da escola para avaliação e conduta.

Os resultados de cada exame realizado foram categorizados, de forma a facilitar a análise estatística dos mesmos. Estas categorias estão descritas no Apêndice 5.

4.4.1 Medidas de Imitação Acústica

As medidas de imitação acústica foram as primeiras realizadas com o intuito de avaliar a integridade do sistema tímpano-ossicular, por meio da curva timpanométrica, complacência estática e pesquisa dos reflexos acústicos. Caso esse exame tenha dado resultado alterado, as demais avaliações não prosseguiram, sendo solicitado à família do paciente que procurasse um médico otorrinolaringologista.

O equipamento utilizado foi o AZ26 (*Interacoustics*), calibrado segundo as normas ISO 389 partes 1,3,4,7; IEC 60645; ISO 8253 partes 1,2,3 .

No Apêndice 6 encontra-se a ilustração dos diferentes tipos de timpanogramas mais freqüentemente encontrados clinicamente.

4.4.2 Audiometria Tonal Liminar (ATL)

Na audiometria tonal liminar foram pesquisados os limiares auditivos aéreos nas frequências de 0,25; 0,5; 1; 2; 3; 4; 6 e 8 kHz e os limiares ósseos nas frequências de 0,5; 1; 2; 3 e 4 kHz. Os limiares de via óssea foram testados somente quando os limiares de via aérea apresentaram-se maiores ou iguais a 25 dBNA, utilizando-se o método descendente.

O diagnóstico audiológico da perda auditiva foi atribuído, por meio da média dos limiares auditivos obtidos nas frequências de 0,5, 1, 2 e 4KHz, de acordo com a recomendação para descrição de dados genéticos e audiológicos para famílias com deficiência auditiva hereditária não-sindrômica, proposta pelo grupo de estudos sobre correlação genótipo-fenótipo, GENDEAF (MAZZOLI et al., 2003). O grau de perda auditiva teve a seguinte classificação: grau leve, 20-40dBNA; grau moderado, 41-70dBNA; grau severo, 71-95dBNA; grau profundo, >95dBNA. A configuração audiométrica foi classificada em :

- Ascendente: diferença >15dBNA entre as piores frequências graves e as frequências mais agudas.
- Curva em “U”: diferença >15dBNA entre os piores limiares das frequências médias, e os limiares das frequências graves e agudas.
- Levemente descendente: diferença de 15-29dBNA entre a média de 500 e 1KHz e a média de 4K e 8KHz.
- Fortemente descendente: diferença >30dBNA entre as mesmas médias citadas acima.

- Plana: diferença $<15\text{dBNA}$ entre as médias de 250 e 500Hz, 1K e 2KHz, e 4K e 8KHz.

A perda auditiva foi considerada simétrica quando houvesse uma diferença $<10\text{dBNA}$ entre a média de 500, 1K e 2KHz entre as orelhas.

A avaliação audiológica foi realizada por fonoaudiólogas, em uma cabine tratada acusticamente, utilizando-se um audiômetro *AC40 (Interacoustics)*, calibrado segundo as normas ISO 389 partes 1,3,4,7; IEC 60645; ISO 8253 partes 1,2,3, com fone TDH 39.

No Apêndice 7 estão ilustrados alguns exemplos de audiogramas encontrados nos deficientes auditivos desta amostra, conforme o grau e a configuração da perda auditiva.

4.4.3 Logaudiometria

Na logaudiometria foram pesquisados os limiares de recepção de fala (LRF) e o índice percentual de reconhecimento de fala (IPRF). O LRF é aquele no qual o indivíduo deve reconhecer um sinal de fala em 50% das apresentações. Como os indivíduos da amostra apresentam, em sua maioria, perda auditiva neurosensorial de grau severo a profundo, para a qual a dificuldade de comunicação e compreensão da fala não permite o entendimento da palavra, foi pesquisado, primeiramente, o limiar de detectabilidade de fala (LDF) para o qual o indivíduo não necessita reconhecer o sinal de fala, apenas detectá-lo. A determinação deste limiar confirma os limiares tonais obtidos anteriormente por via aérea e é essencial para a delimitação do campo dinâmico de audição.

O equipamento utilizado foi o audiômetro *AC40 (Interacoustics)*, calibrado de acordo com as normas ISO 389 partes 1,3,4,7; IEC 60645; ISO 8253 partes 1,2,3, com fone TDH 39.

4.4.4 Emissões Otoacústicas Evocadas (EOE)

Para a pesquisa das Emissões Otoacústicas Evocadas foi utilizado o equipamento *Otodynamics Ltda ILO96 Research OAE System*, acoplado a um microcomputador e uma impressora para a impressão dos registros das emissões.

O registro das emissões otoacústicas evocadas por estímulo transiente (EOET) teve como objetivo mensurar as emissões acústicas provenientes da funcionalidade das células ciliadas externas do órgão espiral. O estímulo aplicado foi do tipo “click”, não linear, com intensidade que variou de 79 a 85 dBNPS, nas faixas de frequência de 1 a 5 kHz. Entretanto, para a análise dos dados consideraram-se os registros obtidos na faixa de frequência de 1 a 4 kHz, visto que a prática clínica demonstra ausência freqüente do registro das EOET em 5 kHz em indivíduos adultos e idosos, sem queixa auditiva ou histórico de risco para a deficiência auditiva.

A estabilidade da sonda foi sempre superior a 85% e a calibração foi diária. A resposta foi considerada presente, quando a reprodutibilidade geral foi igual ou maior a 50% com amplitude de resposta igual ou maior a 3 dBNPS acima do ruído, em pelo menos três frequências consecutivas avaliadas, como proposto por PRIEVE et al. (1993).

A pesquisa das emissões otoacústicas evocadas por produto de distorção (EOEPD) foi realizada por meio do *Distortion Product-gram (Dp-gram)*, com a apresentação simultânea de dois tons primários, f_1 e f_2 ($f_1 < f_2$). A razão de f_2/f_1 foi fixada em 1,22 com os tons primários apresentados em intensidades diferentes ($L_1 > L_2$), ou seja, $L_1 = 65$ dBNPS e $L_2 = 55$ dBNPS. O *Dp-gram* foi registrado em passos de 3 pontos/oitavas e plotado em f_2 com uma faixa de frequências que se estendeu de 1001 Hz a 6348 Hz, sendo avaliadas as $f_2 = 1001, 2002, 3174, 4004, 6348$ Hz por se aproximarem das audiométricas 1000, 2000, 3000, 4000 e 6000 Hz. O registro de resposta utilizado foi equivalente a $2f_1 - f_2$. O nível de ruído de fundo foi sempre igual ou inferior a -5 dBNPS para cada frequência avaliada.

No Apêndice 8 encontra-se ilustrada a tela do programa computacional que mostra o registro das EOE.

4.4.5 Potencial Evocado Auditivo do Tronco Encefálico

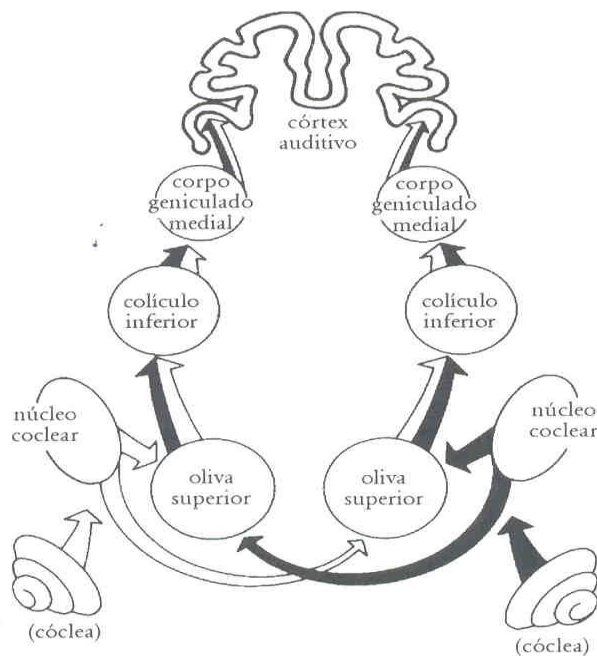
A pesquisa do potencial evocado auditivo do tronco encefálico (PEATE) conhecido como ABR (*Auditory Brain Response*), tem o objetivo de avaliar a atividade do sistema auditivo desde a orelha interna até o tronco encefálico alto. As respostas ocorrem nos 12 milisegundos após estimulação acústica e são constituídas por um potencial polifásico de 7 ondas, sendo mais característica e freqüente a onda V. É uma avaliação utilizada principalmente para o topodiagnóstico da lesão auditiva, sendo um método muito sensível nesta aplicação, considerando-se os seguintes parâmetros: limiar eletrofisiológico,

latências absolutas de onda I, III e V e latências interpicos entre ondas I-V, I-III e III-V (CASTRO JUNIOR; FIGUEIREDO, 1997).

A Figura 9 ilustra as vias ascendentes do sistema nervoso auditivo central, com seus diversos pontos onde ocorre o cruzamento ou a decussação das fibras nervosas.

O equipamento utilizado foi o *Bio-logic's Evoked Potential System (EP)*. O protocolo de avaliação, assim como os critérios para a análise dos registros estão descritos nos Quadros 1 e 2.

No Apêndice 9 encontra-se a ilustração do registro das ondas elétricas geradas pelo PEATE.



FONTE: BESS e HUMES, 1998

FIGURA 9 – As vias ascendentes do sistema nervoso central auditivo.

QUADRO 1 - Parâmetros utilizados na realização do PEATE

Parâmetros	
Estímulo	Click
Intensidade	90 dBHL
Polaridade	alternada
Rate	21,1 c/s
Filtro	30 a 3000 Hz
Canais	2
Eletrodos	Fz ativo, M1 e M2 referência, Fpz
Ganho	75000
Janela	10 ms
Análise	Latências absolutas e interpicos em milissegundos (ms) das ondas I, III e V.

QUADRO 2 - Valores de referência para análise dos resultados do PEATE, segundo MEIRA (2002)

VALORES DE REFERÊNCIA - LATÊNCIAS PEATE (ms)					
ABSOLUTAS			INTERPICOS		
ONDA I	ONDA III	ONDA V	I - III	III - V	I - V
1,54	3,73	5,52	2,19	1,79	3,98
DESVIO PADRÃO					
0,08	0,10	0,15	0,18	0,25	0,23

4.4.6 Deficientes auditivos submetidos à avaliação audiológica

No Quadro 3, é apresentado o número de deficientes auditivos que realizaram os diferentes exames da avaliação audiológica.

QUADRO 3 - Número de deficientes auditivos que realizaram os exames da avaliação audiológica.

EXAMES		N	
MEDIDAS DE IMITÂNCIA ACÚSTICA	TIMPANOMETRIA	106 (OD e OE)	
	MEDIDA DOS REFLEXOS ACÚSTICOS (RA)	105 (OD e OE)	
AUDIOMETRIA TONAL LIMINAR (ATL)		102 (OD e OE)	
LOGOaudiometria	LRF	98 (OD)	99 (OE)
	LDV	88 (OD)	91 (OE)
EMISSÕES OTOACÚSTICAS EVOCADAS (EOE)	EOET	104 (OD e OE)	102 com M.I.Ac. 2 sem M.I.Ac. ¹
	EOEPD	79 (OD e OE)	
POTENCIAL EVOCADO AUDITIVO DO TRONCO CEREBRAL (PEATE)		92 (OD e OE)	90 com M.I.Ac. 2 sem M.I.Ac. ¹

¹ Avaliação realizada fora do laboratório da UTP

OD = Orelha Direita; OE = Orelha Esquerda

LRF: Limiar de reconhecimento de fala; LDV: Limiar de detectabilidade de fala; EOET: transientes; EOEPD: produto de distorção; M.I.Ac: Medidas de imitância acústica.

Na Tabela 6, encontram-se os testes realizados para diagnosticar a deficiência auditiva e os resultados esperados, conforme a localização da lesão, indo desde a orelha média até o córtex cerebral.

TABELA 6 – Resultados esperados para cada teste realizado na avaliação audiológica com relação à passagem do estímulo sonoro, da orelha média ao córtex auditivo.

Testes	Orelha média	Orelha interna			Córtex
		CCE	CCI	Nervo auditivo	
ATL (via aérea)	□	□	□	◆	✗
ATL (via óssea)	✗	□	□	◆	✗
Timpanometria	□	✗	✗	✗	✗
Pesquisa dos reflexos acústicos	□	✗	◆	□	□
EOE	□	□	◆	✗	✗
PEATE	✗	✗	□	□	□

Fonte: KEATS e BERLIN (1999)

CCE: células ciliadas externas; CCI: células ciliadas internas

□ : ausente ou alterado; ✗: normal ou geralmente não afetado quanto à morfologia, se a audição periférica residual for significativa; ◆ : variação entre normal e alterado.

4.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os 156 deficientes auditivos estudados pertencem a 144 famílias. Assim, quando a análise exigiu foi considerado apenas o afetado mais velho entre os irmãos analisados, ou apenas a criança, no caso de uma família com quatro deficientes auditivos examinados (uma criança, seus pais e uma tia materna). Entretanto, em variáveis em que o deficiente auditivo pôde ser a unidade de estudo, foram analisados todos os examinados para a variável em questão.

As informações obtidas na anamnese e os resultados da avaliação auditiva, de interesse para as análises estatísticas, foram codificados de acordo com o exposto nos Apêndices 4 e 5, respectivamente.

Os dados obtidos com a realização das entrevistas foram computados no software SPHINX LÉXICA (ERGOLE, 1996) para análise freqüencial das variáveis contidas nas questões da entrevista.

A caracterização das variáveis da amostra, com dados de médias, erros e desvios padrões, amplitudes de variação e freqüências foi feita pelo programa STATISTICA for Windows (STATSOFT, Inc., 1996). Esse programa também foi utilizado para: análise de correlação; comparação de médias pelo teste t e pela análise de variância ANOVA; e comparação de freqüências pelo teste do χ^2 e pelo teste exato de Fisher.

As freqüências alélicas e genóticas foram estimadas pelo método de contagem direta do número de cromossomos e indivíduos, respectivamente.

Em algumas circunstâncias, em vista da forma como as variáveis eram apresentadas, o χ^2 foi calculado pelo programa CLUMP (SHAM e CURTIS,

1995). O teste dá resultado igual ao do χ^2 , sendo que não há necessidade de utilizar a correção de Yates, quando o esperado é menor que 5. Neste programa, o nível de significância é primeiramente obtido dos dados reais e, em seguida, um grande número de tabelas com os mesmos totais marginais dos dados reais, é gerado por simulação de Monte Carlo, com base na hipótese nula de que populações diferentes possuem a mesma distribuição de freqüência. No presente estudo, em geral, foram usadas 1000 tabelas, com exceção dos casos em que o nível de significância era muito próximo de zero, quando se usaram 10.000 tabelas. O valor da estatística de cada tabela é calculado e uma estimativa empírica do valor de p é a proporção de tabelas simuladas com uma estatística maior ou igual à obtida com os dados reais. A significância das análises realizadas se dá quando o valor de p é $\leq 0,05$.

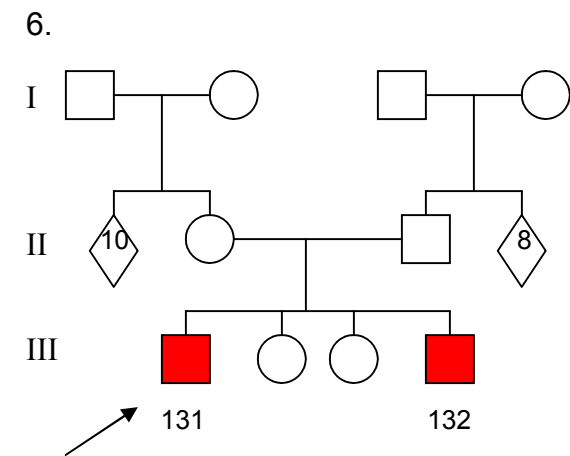
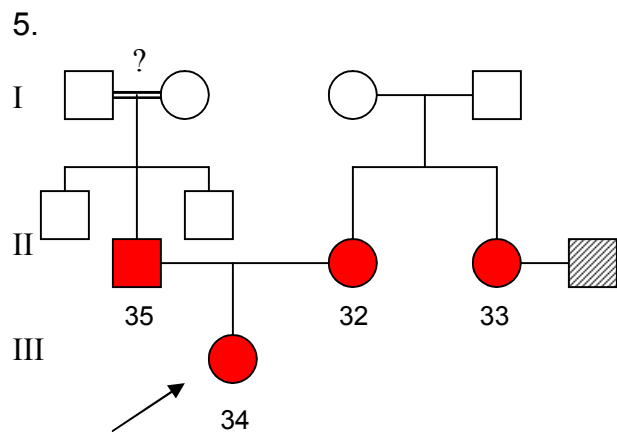
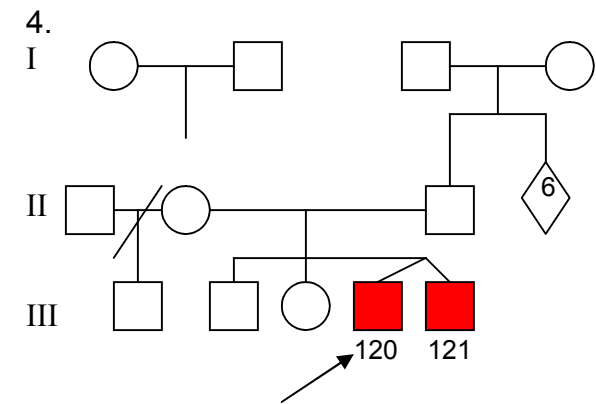
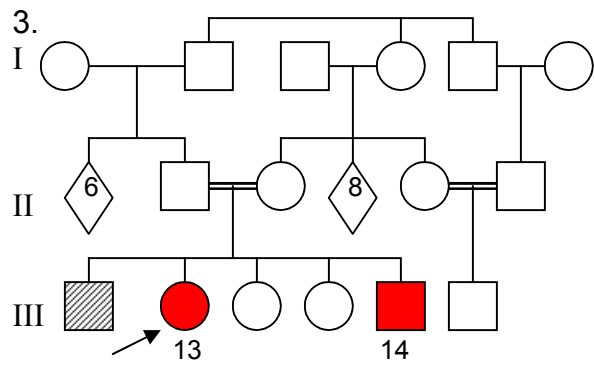
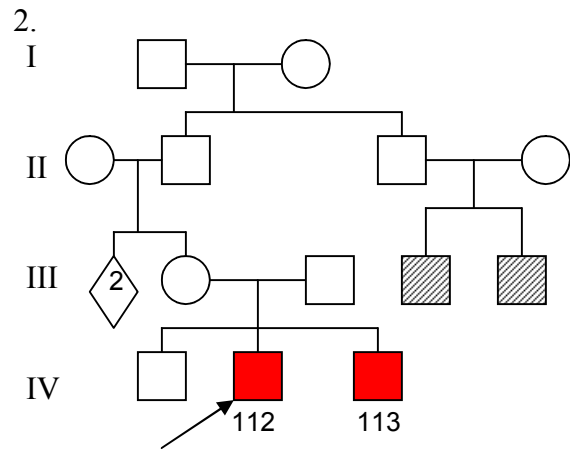
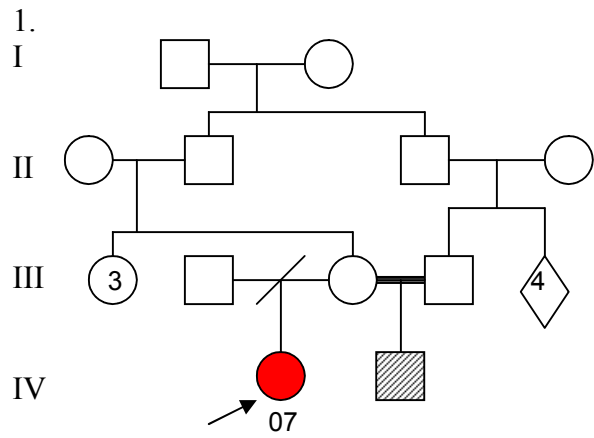
5. RESULTADOS

Inicialmente serão apresentados os resultados a respeito dos genótipos investigados para os genes *GJB2* e *GJB6* e, em seguida, variáveis da anamnese e dos exames de avaliação auditiva serão vistos em relação aos genótipos detectados. Em algumas análises, foram incluídos 144 deficientes auditivos não consangüíneos e, em algumas delas, foram considerados também afetados consangüíneos, em vista da variável examinada.

5.1 CASOS FAMILIAIS E ESPORÁDICOS

Os 156 afetados examinados pertencem a 144 famílias, 11 (7,6%) das quais apresentaram casos de deficientes auditivos com coeficiente de consangüinidade de primeiro ou segundo grau (Figura 10). Em dez destas famílias, houve afetados com coeficiente de consangüinidade (r) igual a 0,50 e uma família mostrou dois afetados com coeficiente de consangüinidade igual a 0,25 (meio irmãos). Os deficientes auditivos consangüíneos dos probandos que foram examinados no presente estudo, se distribuem da seguinte forma: três em uma família (pai, mãe e tia do probando), dois em uma família (irmãos do probando) e sete casos em sete famílias diferentes (um irmão do probando em cada família).

Casos familiares com coeficiente de consangüinidade abaixo de 0,25 foram relatados em uma parcela da amostra de 144 famílias (20,14%; $N = 29$).



continua

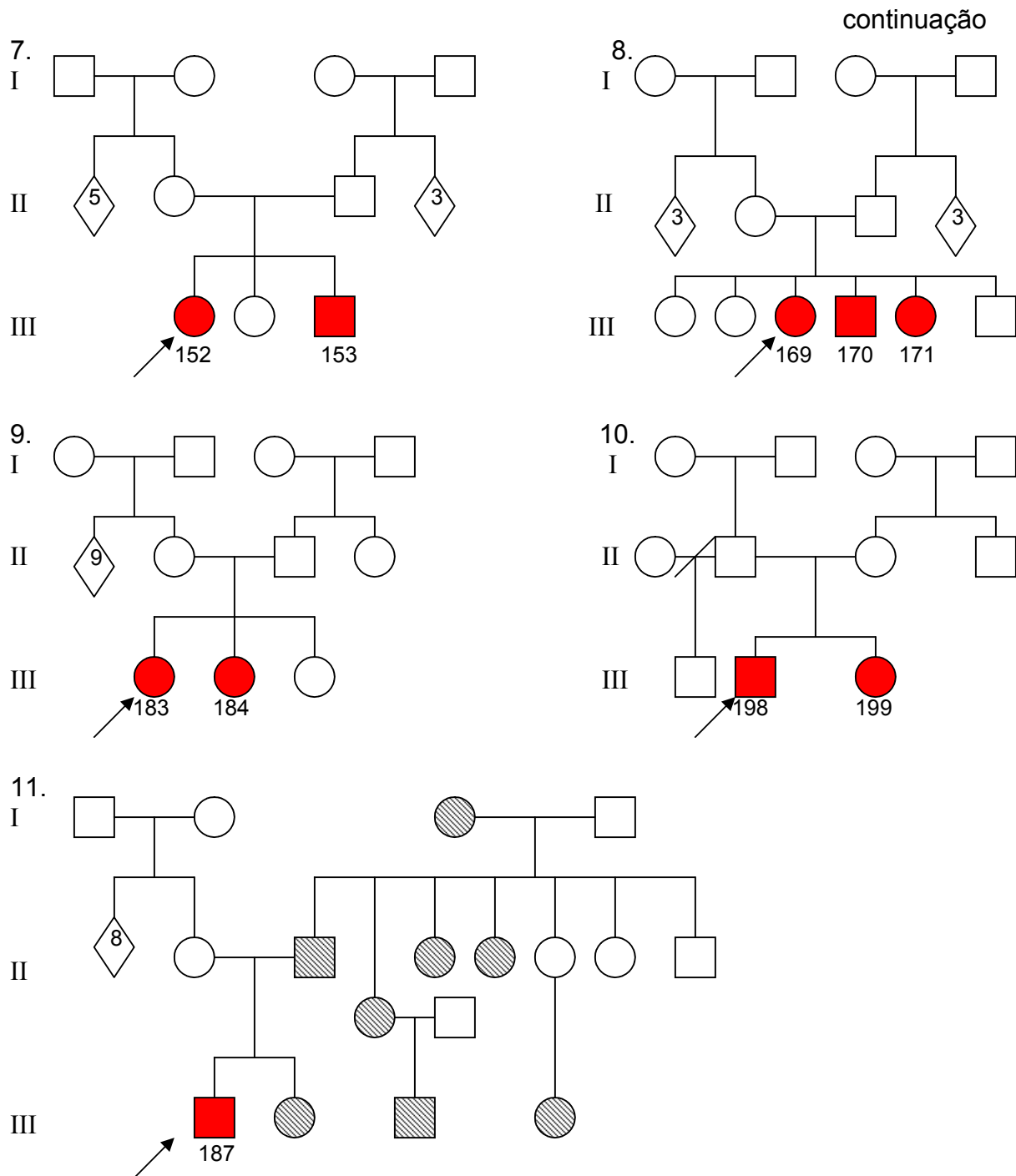






FIGURA 10. Ilustração dos heredogramas das onze famílias com recorrência da deficiência auditiva em consangüíneos com $r \geq 0,25$.

-   Deficientes auditivos examinados no presente estudo
-   Indivíduos afetados não examinados no presente estudo

Nesses casos, muitas mães ou informantes da entrevista não tinham conhecimento sobre a etiologia dessas deficiências, e nem mesmo se são congênitas ou adquiridas.

Englobando esses dois tipos de famílias, quanto à presença de consangüíneos deficientes auditivos, encontra-se a freqüência de 27,78% (40/144). Logo, em 104 famílias (72,22%), os casos foram isolados.

5.2. GENOTIPAGEM DOS GENES *GJB2* e *GJB6*

A Figura 11 mostra uma reprodução de placa de gel de poliacrilamida, na qual são mostrados os três genótipos desse gene, em relação à mutação *35delG*.

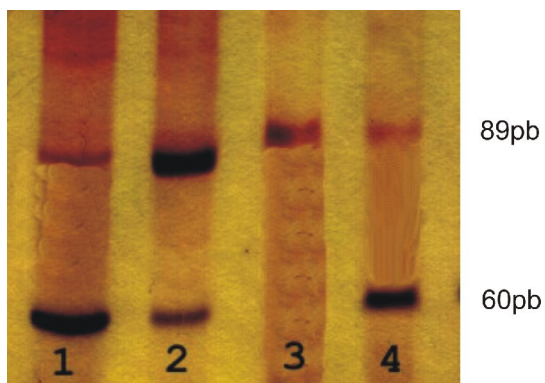


FIGURA 11 - Reprodução de uma placa de gel de poliacrilamida, mostrando os fragmentos do produto de PCR após digestão com a enzima de restrição *Mva*I. O homocigoto selvagem para a mutação *35delG* (1 e 4) apresenta o fragmento de 60pb, o heterocigoto (2) apresenta os fragmentos de 60pb e 89pb e o homocigoto (3) para a mutação apresenta o fragmento de 89pb.

Na análise dos genótipos se considerou apenas um deficiente auditivo por família. A Tabela 7 mostra as freqüências genotípicas e alélicas encontradas, em relação à mutação *35delG* do gene *GJB2*. Pode-se observar que a freqüência alélica de *35delG* foi $27,43\% \pm 2,63$, no total das 144 famílias.

TABELA 7 - Freqüências genotípicas e alélica ($\% \pm$ Erro Padrão), referentes aos deficientes auditivos não consangüíneos de 144 famílias, quanto à mutação *35delG* do gene *GJB2*.

FREQUÊNCIAS GENOTÍPICAS						FREQUÊNCIA ALÉLICA
Homozigoto <i>35delG</i>		Heterozigoto		Homozigoto selvagem		
N	% \pm EP	N	% \pm EP	N	% \pm EP	% \pm EP
29	20,14 $\pm 3,34$	21	14,58 $\pm 2,94$	94	65,28 $\pm 3,97$	27,43 \pm 2,63
TOTAL = 144						

Na Tabela 8, os casos foram classificados em familiares ou esporádicos (C), dependendo ou não da recorrência da deficiência auditiva em consangüíneos do probando. As famílias que apresentaram mais de um caso de deficiência auditiva (N = 40), ainda foram divididas, de acordo com o coeficiente de consangüinidade entre os afetados, em tipos: A ($r \geq 0,25$; N = 11) e B ($r < 0,25$; N = 29).

Quando a distribuição genotípica, encontrada no grupo de casos familiares (A + B) da Tabela 8 foi comparada com a dos casos esporádicos, a diferença não foi estatisticamente significativa ($\chi^2_{(2)} = 5,26$; $p = 0,072$).

A freqüência do alelo *35delG* variou de 23,08%, no grupo de casos isolados, a 50,00% no grupo com recorrência entre consangüíneos com $r \geq 0,25$. Quando a freqüência do alelo *35delG* do grupo de casos familiares (A + B) foi comparada com a de casos isolados, a diferença foi estatisticamente significativa ($\chi^2_{(1)} = 7,13$; $p = 0,013$).

TABELA 8 - Freqüências genótípicas e alélicas, referentes aos deficientes auditivos não consangüíneos, quanto à mutação *35delG* do gene *GJB2*, segundo a classificação¹ das famílias quanto à recorrência da deficiência auditiva.

TIPO DE FAMÍLIA (N)	FREQUÊNCIAS GENOTÍPICAS PARA A MUTAÇÃO <i>35delG</i>						FREQUÊNCIA ALÉLICA
	Homozigoto		Heterozigoto		Homozigoto selvagem		%
	N	%	N	%	N	%	± Erro Padrão
A (11)	5	45,45	1	9,10	5	45,45	50,00 ± 10,66
B (29)	8	27,59	4	13,79	17	58,62	34,48 ± 6,24
A + B (40)	13	32,50	5	12,50	22	55,00	38,75 ± 5,45
C (104)	16	15,38	16	15,38	72	69,23	23,08 ± 2,92

¹ Tipos: A - recorrência em consangüíneos com $r \geq 0,25$; B - recorrência em consangüíneos com $r < 0,25$; C - apenas casos esporádicos.

A genotipagem do gene *GJB6*, em relação as deleções del(*GJB6-D13S1830*) e del(*GJB6-D13S1854*), foi realizada em 115 dos deficientes auditivos, tendo sido excluídos os 29 homozigotos para a mutação *35delG* do gene *GJB2*. A Tabela 9 mostra a distribuição dos genótipos quanto aos genes *GJB2* e *GJB6*,

evidenciando dois casos de diferentes heterozigotos compostos. Nas famílias desses dois heterozigotos compostos não apareceram outros casos de deficiência auditiva em seus consangüíneos próximos ou distantes, segundo a informação dada na entrevista, pertencendo ao tipo de família com casos esporádicos.

TABELA 9 - Frequência (%) e Erro Padrão (EP), referentes aos genótipos de 115 deficientes auditivos heterozigotos e homozigotos selvagens, quanto às deleções *del(GJB6-D13S1830)* e *del(GJB6-D13S1854)* do gene *GJB6*.

HETEROZIGOTO PARA DELEÇÕES DE <i>GJB6</i>	GENÓTIPOS PARA A MUTAÇÃO <i>35delG</i>			
	HETEROZIGOTO <i>35delG</i> (N = 21)		HOMOZIGOTO SELVAGEM (N = 94)	
	N	% ± EP	N	% ± EP
<i>del(GJB6-D13S1830)</i>	1	4,76 ± 4,65	0	0
<i>del(GJB6-D13S1854)</i>	1	4,76 ± 4,65	0	0

A Figura 12 mostra uma reprodução de placa de gel de agarose, na qual são mostrados os genótipos dos dois heterozigotos compostos e do homozigoto selvagem para ambas as deleções do gene *GJB6*, identificados pela comparação com o marcador de padrão do DNA.

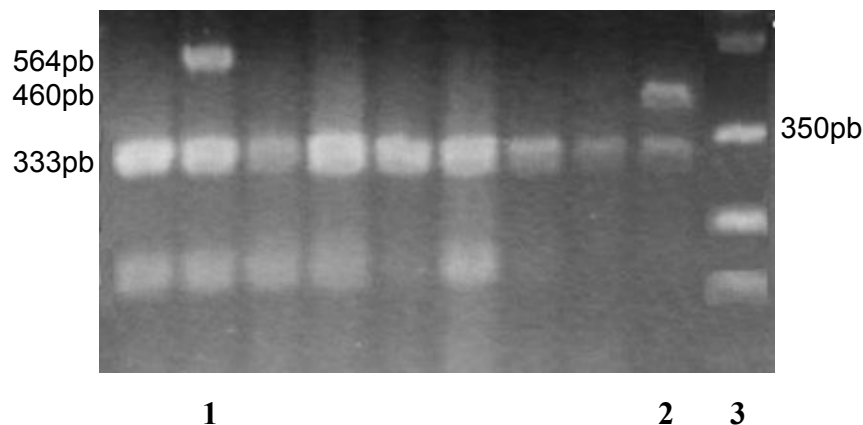


FIGURA 12 - Reprodução de uma placa de gel de agarose, mostrando os fragmentos do produto de PCR e o marcador de padrão do DNA. A posição 1 indica o heterozigoto para a deleção del(*GJB6-D13S1854*), apresentando os fragmentos de 333pb e 564pb; a posição 2 indica o heterozigoto para a deleção del(*GJB6-D13S1830*), apresentando os fragmentos de 333pb e 460pb e os demais fragmentos indicam os homozigotos selvagens, apresentando somente o fragmento de 333pb. O marcador de padrão do DNA é indicado na posição 3. As bandas na posição inferior correspondem aos iniciadores.

5.3. DEFICIÊNCIA AUDITIVA E CONSANGÜINIDADE

A Tabela 10 mostra a distribuição do grau de consangüinidade entre os pais dos afetados. Pode-se observar que 5,55% dos probandos têm pais com algum grau de consangüinidade entre eles. Dos filhos dos cinco casais primos em 1º grau, um é homozigoto para *35de/G*, um heterozigoto e três são homozigotos selvagens. Os três probandos, provenientes de casamento entre consangüíneos cujo grau não foi determinado, são: dois homozigotos para *35de/G* e um homozigoto selvagem. Assim, entre os filhos de consangüíneos foram

detectados três homozigotos para *35de/G* ($3/8 = 37,5\%$). A freqüência de casamentos entre primos em 1º grau, nesta amostra de 144 casais, é 3,47%.

TABELA 10 - Distribuição da amostra de 144 casais, segundo o grau de consangüinidade dos genitores.

GRAU DE CONSANGÜINIDADE	N	%
Nenhum	136	94,45
Primos 1º grau	5	3,47
Grau não explicado	3	2,08
TOTAL	144	100

5.4 ETNIA E DEFICIÊNCIA AUDITIVA

A análise da etnia dos probandos, realizada por intermédio quase que exclusiva dos sobrenomes paternos, revelou que 68,0% dos probandos portando um ou dois alelos mutados do gene *GJB2*, provenientes de 144 casais, têm ascendência portuguesa. O valor de χ^2 revelou não haver diferença significativa, quanto à origem dos sobrenomes, entre o grupo com o alelo mutado (*35de/G*) e o grupo com alelo selvagem, como mostra a Tabela 11. Sobrenomes menos representativos nesta amostra foram classificados como “Outros”.

TABELA 11 - Distribuição de freqüência dos sobrenomes dos probandos, classificados pela presença e ausência da mutação *35delG*.

SOBRENOMES	Mutação <i>35delG</i>				TOTAL N
	Homozigotos e Heterozigotos		Homozigotos Selvagens		
	N	%	N	%	
PORTUGUÊS	34	68,00	64	68,09	98
ITALIANO	3	6,00	10	10,64	13
AFRO-BRASILEIRO	6	12,00	7	7,45	13
ALEMÃO	3	6,00	5	5,32	8
OUTROS	4 ¹	8,00	8 ²	8,50	12
TOTAL	50	100	94	100	144

$$\chi^2_{(4)} = 1,56 ; p > 80\%$$

¹Três probandos têm sobrenome polonês e um, inglês; ²Sobrenomes distribuídos em: francês (dois); espanhol (dois); polonês (dois); inglês (um) e chinês (um).

5. 5. SUSPEITA E DIAGNÓSTICO DA DEFICIÊNCIA AUDITIVA

A Tabela 12 mostra as médias de idade dos afetados (em meses), em que a deficiência auditiva foi suspeitada pela família e aquela em que houve o diagnóstico do problema. A correlação entre ambas as variáveis é de 0,78 ($p < 0,01$), a qual já era esperada, evidenciando que a percepção do problema auditivo na criança levou os pais à procura de um diagnóstico, mesmo que tardio.

A diferença média entre a idade da suspeita e do diagnóstico da deficiência auditiva na amostra total de 156 afetados foi de 10,90 meses \pm 0,91 (EP), variando de 0 a 60 meses.

TABELA 12 - Média de idade dos probandos com relação à época da suspeita e diagnóstico da deficiência auditiva.

	IDADE (meses)		
	N	MÉDIA (\pm EP)	Amplitude de variação
SUSPEITA	156	18,29 (\pm 1,21)	3 – 84
DIAGNÓSTICO	156	29,06 (\pm 1,44)	6 - 90

A Tabela 13 mostra os valores das médias de idade de diagnóstico da deficiência auditiva, comparando os três genótipos do gene *GJB2*, em relação à mutação *35delG* e mostra que essas médias não diferem estatisticamente.

TABELA 13 - Comparações, por meio de teste t, das médias de idade (meses) na época do diagnóstico da deficiência auditiva, entre os diferentes genótipos quanto à mutação *35delG*.

COMPARAÇÕES	MÉDIA DE IDADE (MESES)		t	p
Homozigoto X Heterozigoto	Homozigoto 28,03	Heterozigoto 23,6	0,90	0,37
Homozigoto X Selvagem	Homozigoto 28,03	Selvagem 30,74	0,75	0,45
Heterozigoto X Selvagem	Heterozigoto 23,6	Selvagem 30,74	1,80	0,07

5.6 SINAIS EXTRA-AUDITIVOS

Por meio da entrevista foram obtidas informações sobre a presença de sinais extra-auditivos. Foram classificados em separado os sinais que evidenciassem alguma provável alteração na ectoderme. Dentre estes sinais, levou-se em conta alterações em pêlos, unhas e dentes, que são patognomônicos para a classificação das displasias ectodérmicas. Uma porcentagem de 67,3% (N = 105) não apresentou sinal ectodérmico e os demais 51 afetados, que apresentaram algum sinal desse tipo, estão registrados na Tabela 14.

Segundo a classificação de FREIRE-MAIA (1971), três casos dessa tabela podem ser considerados como de displasia ectodérmica do grupo A (afecções com pelo menos dois sinais clássicos): dois casos com distúrbios de pêlos e unhas (tipo 1-3) e um caso com distúrbios de pêlos, dentes e unhas (tipo 1-2-3). Além desses afetados com displasia do grupo A, excetuando-se os 31 casos com apenas sinais de pele, os 17 restantes podem ser classificados como apresentando displasia ectodérmica do grupo B (afecção com apenas um dos sinais clássicos, acompanhada de, pelo menos, um outro sinal afetando uma estrutura de origem ectodérmica, com ou sem malformações). Nestes casos, a estrutura de origem ectodérmica afetada é a orelha interna.

TABELA 14 – Frequência (%) dos sinais extra-auditivos ectodérmicos.

SINAIS	N	%
Pele	31	60,78
Pele e pêlos	2	3,92
Pele e dentes	2	3,92
Pele e unhas	2	3,92
Pêlos	4	7,85
Pêlos e unhas ¹	2	3,92
Pêlos, dentes e unhas ¹	1	1,96
Dentes	4	7,85
Unhas	3	5,88
TOTAL	51	100

¹ Displasia ectodérmica do grupo A

Assim, a displasia ectodérmica está presente em 12,82% (20/156) dos afetados. Sete desses, são homozigotos para a mutação *35delG* e pertencem ao grupo B das displasias ectodérmicas (três com alteração em pêlos; três em dentes e um, em unhas). Um é heterozigoto e pertence ao grupo A, com alteração em pêlos, dentes e unhas. Os demais 12 afetados são homozigotos selvagens, dois pertencem ao grupo A, ambos com alterações em pêlos e unhas, sendo que os outros dez casos mostram alterações nas seguintes estruturas: três em pêlos, três em dentes e quatro em unhas.

Os três homozigotos para *35delG*, que fazem parte do grupo B das displasias ectodérmicas e que apresentam alteração em pêlos, têm como característica o aparecimento prematuro de cabelos brancos, espalhados em toda a região do couro cabeludo ou em apenas uma parte dele, o que pode ser denominado de canície prematura.

Outros três homozigotos pertencentes ao grupo B, que apresentam alteração em dentes, têm como características, erupção tardia, malformação da

arcada dentária e agenesia dos incisivos. Um deles possui um irmão deficiente auditivo, homozigoto selvagem para *35de/G*, com alterações nos dentes (malformação de arcada dentária).

A alteração em unhas, presente em um homozigoto para *35de/G*, caracteriza-se pelo crescimento da ponta da unha para baixo, junto à pele, no dedo médio de ambas as mãos. Esse afetado apresenta um irmão deficiente auditivo, homozigoto selvagem, e que mostra distúrbios em pêlos e unha (alopecia parcial e defeito nas unhas dos dedos mínimos). O defeito nas unhas também está presente na mãe.

O probando heterozigoto para a mutação *35de/G*, pertencente ao grupo A das displasias ectodérmicas, apresenta os três sinais clínicos, caracterizados como: ausência de pêlos, agenesia dos dentes incisivos e concavidade das unhas dos dedos dos pés.

Na Tabela 15 estão relacionadas informações referentes a outros tipos de sinais extra-auditivos, como distúrbios de visão, problemas cardíacos e alteração da sudorese. Nenhum afetado apresentou esses três sinais extra-auditivos concomitantemente. Observando-se essa tabela contam-se 17 casos com problemas de visão, 11 com problemas cardíacos e 5 com ambos os problemas. Desses 33 afetados, 67% (N = 22) não apresentam a mutação *35de/G*.

Dos 17 com problemas de visão, quatro são homozigotos e quatro são heterozigotos para *35de/G*. As alterações de visão restringem-se à presença de miopia.

Dos 11 que relatam problemas cardíacos, um é homozigoto para a mutação *35de/G* e a informação dada pela mãe é que seja sopro. Dois são

heterozigotos, sendo que um deles apresenta malformação congênita no cordão umbilical e problema cardíaco, e o outro, a mãe relatou que apresenta taquicardia com certa freqüência, mas sem nenhum diagnóstico específico.

Os cinco deficientes auditivos, com problemas cardíacos e de visão, são homozigotos selvagens, sendo que três deles têm em seu histórico, a suspeita da ocorrência de rubéola na gestação.

A alteração na sudorese foi sempre registrada como excessiva e, nestes casos, o afetado apresentava extremidades frias e úmidas com freqüência, o que se considerou como um possível problema neurovegetativo e, por isto, não relacionado às displasias ectodérmicas, nas quais a hipoidrose é uma característica importante.

TABELA 15 – Freqüência (%) de sinais extra-auditivos, não relacionados às displasias ectodérmicas, nos 156 afetados.

SINAIS EXTRA-AUDITIVOS	N	%
Nenhum sinal	112	71,79
Sudorese	11	7,05
Problemas cardíacos	9	5,77
Distúrbios de visão	12	7,69
Sudorese e distúrbios de visão	5	3,21
Sudorese e problemas cardíacos	2	1,28
Problemas cardíacos e distúrbios de visão	5	3,21
TOTAL	156	100

5.7 GENÓTIPOS E FATORES AMBIENTAIS

Os fatores ambientais, ocorridos antes da percepção da deficiência auditiva, foram registrados em três grandes grupos, de acordo com o grau de importância em relação ao aspecto causal da deficiência auditiva. Primeiramente, levou-se em conta a ocorrência de infecções ou outros distúrbios durante o período de gestação (fatores pré-natais). Em segundo lugar, nos casos negativos quanto ao primeiro grupo, registraram-se os fatores de risco para a deficiência auditiva no período peri-natal. Em terceiro lugar, foram considerados aqueles casos com fatores pós-natais, como, por exemplo, a contração de doenças com caráter relevante devido à exposição à medicação ototóxica. A Tabela 16 mostra a distribuição dos fatores, nesses três grupos de prioridade, nos 156 afetados. Cabe ressaltar que as informações foram todas obtidas em anamnese, segundo relato da pessoa entrevistada, sem nenhuma comprovação médica.

As informações constantes na Tabela 16 foram classificadas de acordo com o genótipo do afetado, quanto à mutação *35delG*, sendo esses dados mostrados na Tabela 17. As análises comparativas, com relação à distribuição dos fatores ambientais nesses genótipos, revelaram diferença estatisticamente não significativa entre homocigotos e heterocigotos e mostraram que o conjunto desses dois genótipos difere significativamente do genótipo usual.

TABELA 16 – Distribuição percentual dos fatores ambientais de risco para a deficiência auditiva, registrados no histórico dos 156 afetados, classificados de acordo com sua época de ocorrência.

FATORES AMBIENTAIS DE RISCO	N	%
Pré-natais	41	26,28
Peri-natais	35	22,44
Pós-natais	30	19,23
Nenhum fator	50	32,05
TOTAL	156	100

TABELA 17 – Distribuição dos fatores ambientais, de acordo com a época de ocorrência, nos três genótipos do gene *GJB2*, para a mutação *35delG*, e respectivas comparações por meio de χ^2 .

ÉPOCA	HOMOZIGOTOS <i>35delG</i>		HETEROZIGOTOS <i>35delG</i>		HOMOZIGOTOS SELVAGENS	
	N	%	N	%	N	%
Pré-natal	6	17,65	2	8,33	33	33,67
Peri-natal	6	17,65	8	33,33	21	21,42
Pós-natal	2	5,88	3	12,50	25	25,50
Nenhum fator	20	58,82	11 ¹	45,84	19	19,39
Totais	34	100	24	100	98	100

¹ Incluindo os dois heterozigotos compostos (*GJB2 / GJB6*)

Homozigotos x Heterozigotos : $\chi^2_{(3)} = 3,48$; $p > 35\%$

(Homozigotos + Heterozigotos) x Homozigotos selvagens: $\chi^2_{(3)} = 24,2$; $p = 0,0001$

As Tabelas 18 e 19 discriminam os tipos de fatores que ocorreram nas três épocas de vida dos deficientes auditivos homozigotos e heterozigotos para a mutação *35delG*, respectivamente.

TABELA 18 - Caracterização dos fatores ambientais, ocorridos antes da suspeita da deficiência auditiva, nos 34 probandos homocigotos para a mutação 35delG do gene GJB2.

FATORES AMBIENTAIS		HOMOZIGOTOS 35delG	
		N	%
Pré-natais	toxoplasmose	2	5,89
	suspeita de rubéola	3 ¹	8,82
	anemia e epilepsia	1 ²	2,94
Peri-natais	icterícia	2 ²	5,88
	baixo peso	1 ²	2,94
	baixo peso e prematuridade	1	2,94
	anóxia, baixo peso, prematuridade, icterícia	1 ²	2,94
	transfusão sanguínea e infecção peri-natal	1	2,94
Pós-natais	Pneumonia (ototoxicidade)	1	2,94
	otite	1	2,94
Nenhum fator ambiental		20	58,83
TOTAL		34	100

¹ Um probando apresentou dois outros fatores ambientais: incompatibilidade de Rh (fator peri-natal) e uma virose, sem diagnóstico preciso; ²Também contraíram pneumonia (fator pós-natal) antes da percepção da deficiência auditiva.

TABELA 19 - Caracterização dos fatores ambientais, ocorridos antes da suspeita da deficiência auditiva, nos 24 afetados heterozigotos para a mutação 35deIG.

FATORES AMBIENTAIS		HETEROZIGOTOS 35deIG	
		N	%
Pré-natais	toxoplasmose	1	4,17
	suspeita de rubéola	1	4,17
Peri-natais	icterícia	2 ^{1, 2}	8,34
	icterícia e prematuridade	1	4,17
	má-formação	1	4,17
	baixo peso e icterícia	2 ³	8,34
	anóxia	1	4,17
	anóxia, icterícia e infecção peri-natal	1 ⁴	4,17
Pós-natais	Pneumonia (ototoxicidade)	1	4,17
	suspeita de meningite	1	4,17
	desidratação	1	4,17
Nenhum fator ambiental		11	45,80
TOTAL		24	100

¹ Um deles contraiu pneumonia; ² Um deles teve desidratação e convulsão

³ Também tiveram infecção neonatal e meningite; ⁴ Também contraiu hepatite.

5.8 AVALIAÇÃO AUDITIVA

A audiometria tonal liminar (ATL) foi realizada em 102 deficientes auditivos, pertencentes a 91 famílias. Primeiramente, serão descritos os resultados obtidos na orelha direita (Tabela 20) e, posteriormente, aqueles obtidos na orelha esquerda de deficientes auditivos não consangüíneos (Tabela 21). É possível observar, em ambas as tabelas, as distribuições dos três genótipos quanto às diferentes categorias do diagnóstico audiológico. Não houve diferença

estatisticamente significativa entre os três genótipos com relação aos diferentes graus de perda auditiva e configuração audiométrica estabelecidos para ambas as orelhas.

TABELA 20 - Relação das categorias do diagnóstico audiológico¹ (grau de perda e configuração da curva audiométrica) da orelha direita de 91 deficientes auditivos, não consangüíneos, que realizaram a Audiometria Tonal Liminar, classificados genotipicamente quanto à mutação *35delG*.

CATEGORIAS DO DIAGNÓSTICO AUDIOLÓGICO	GENÓTIPOS					
	HOMOZIGOTOS <i>35delG</i>		HETEROZIGOTOS		HOMOZIGOTOS SELVAGENS	
	N	%	N	%	N	%
3			1	7,14		
4			1	7,14	3	5,78
5	2	8,00				
6	1	4,00			1	1,92
7	3	12,00	2	14,29	11	21,15
8					1	1,92
9	1	4,00	2	14,29	1	1,92
10	10	40,00	5	35,71	18	34,62
11	7	28,00	3	21,43	17	32,69
12	1	4,00				
TOTAL	25	100,00	14	100,00	52	100,00

$$\chi^2_{(18)} = 21,82 ; p = 0,24$$

¹Categorias: 3 - grau leve e configuração ascendente; 4 - grau moderado e configuração plana; 5 - grau moderado e configuração levemente descendente; 6 - grau moderado e configuração fortemente descendente; 7 - grau severo e configuração plana; 8 - grau severo e configuração fortemente descendente; 9 - grau severo e configuração levemente descendente; 10 - grau profundo e configuração plana; 11 - grau profundo e configuração levemente descendente; 12 - configuração em forma de "U".

TABELA 21 - Relação das categorias do diagnóstico audiológico¹ (grau de perda e configuração da curva audiométrica) da orelha esquerda de 91 deficientes auditivos, não consangüíneos, que realizaram a Audiometria Tonal Liminar, classificados genotipicamente quanto à mutação *35delG*.

CATEGORIAS DO DIAGNÓSTICO AUDIOLÓGICO	GENÓTIPOS					
	HOMOZIGOTOS <i>35delG</i>		HETEROZIGOTOS		HOMOZIGOTOS SELVAGENS	
	N	%	N	%	N	%
1			1	7,14		
4	2	8,00			2	3,85
6	1	4,00	1	7,14	1	1,92
7	4	16,00	1	7,14	8	15,38
8			1	7,14	2	3,85
9	1	4,00	2	14,29	1	1,92
10	10	40,00	5	35,71	22	42,31
11	6	24,00	3	21,43	16	30,77
12	1	4,00				
TOTAL	25	100,00	14	100,00	52	100,00

$$\chi^2_{(16)} = 17,06 ; p = 0,38$$

¹Categorias: 1 - grau leve e configuração plana; 4 - grau moderado e configuração plana; 6 - grau moderado e configuração fortemente descendente; 7 - grau severo e configuração plana; 8 - grau severo e configuração fortemente descendente; 9 - grau severo e configuração levemente descendente; 10 - grau profundo e configuração plana; 11 - grau profundo e configuração levemente descendente; 12 - configuração em forma de "U".

Com o propósito de melhor averiguar a relação genótipo-fenótipo entre os probandos e, posteriormente, comparar com os demais estudos, na Tabela 22 estão descritos os fenótipos dos 25 deficientes auditivos homozigotos para a

mutação *35de/G*, que realizaram audiometria tonal liminar (ATL), considerando-se a melhor orelha. Os resultados apresentados nesta Tabela mostram que a média tonal geral dos homozigotos corresponde a um grau severo de perda auditiva (94dBNA) com amplitude de variação de grau moderado (54dBNA) a profundo (114dBNA).

TABELA 22 – Relação genótipo-fenótipo de 25 homozigotos para a mutação *35de/G*, segundo as categorias¹ de diagnóstico audiológico adotadas neste estudo, considerando-se a média da melhor orelha.

FENÓTIPO	GENÓTIPO			
	HOMOZIGOTO <i>35de/G</i>			
CATEGORIAS DO DIAGNÓSTICO AUDIOLÓGICO	N	%	MÉDIA TONAL EM 500, 1K e 2KHz (dBNA ± DP)	AMPLITUDE DE VARIAÇÃO DA MÉDIA TONAL (dBNA)
4	2	8,0	60	56 a 64
6	1	4,0	54	54
7 ²	5	20,0	78	71 a 88
10	11	44,0	99	99 a 114
11	5	20,0	104	100 a 110
12	1	4,0	71	71
TOTAL	25	100,0	94 ± 19	54 a 114

¹ Categorias: 4 - grau moderado e configuração plana; 6 - grau moderado e configuração fortemente descendente; 7 - grau severo e configuração plana; 10 - grau profundo e configuração plana; 11 - grau profundo e configuração levemente descendente; 12 - configuração em forma de “U”.

² Um deles apresentou perda auditiva assimétrica, sendo que o grau da orelha pior é profundo com configuração levemente descendente.

Da mesma forma, foi feita esta relação para os deficientes auditivos heterozigotos para a mutação *35de/G*. Na Tabela 23, encontram-se os resultados da avaliação auditiva de 14 indivíduos heterozigotos, cuja média tonal geral, das frequências de 500, 1K e 2KHz, corresponde à deficiência auditiva de grau severo (89dBNA), tendo variado de grau leve (34dBNA) a profundo (113dBNA).

TABELA 23 – Relação genótipo-fenótipo de 14 deficientes auditivos, não consangüíneos, heterozigotos para a mutação *35de/G*, segundo as categorias de diagnóstico audiológico¹, adotadas neste estudo, considerando-se a média da melhor orelha.

FENÓTIPO	GENÓTIPO			
	HETEROZIGOTO <i>35de/G</i>			
CATEGORIAS DO DIAGNÓSTICO AUDIOLÓGICO	N	%	MÉDIA TONAL EM 500, 1K e 2KHz (dBNA ± DP)	AMPLITUDE DE VARIAÇÃO DA MÉDIA TONAL (dBNA)
1	1	7,14	36	36
3	1 ²	7,14	34	34
7	2	14,29	76	66 a 85
8	1	7,14	87	87
9	1	7,14	78	78
10	5	35,72	110	105 a 113
11	3 ³	21,43	106	105 a 107
TOTAL	14	100,00	89 ± 27	34 a 113

¹ Classificação das categorias: 1 - grau leve e configuração plana; 3 - grau leve e configuração ascendente; 7 - grau severo e configuração plana; 8 - grau severo e configuração fortemente descendente; 9 - grau severo e configuração levemente descendente; 10 - grau profundo e configuração plana; 11 - grau profundo e configuração levemente descendente.

² Este indivíduo apresentou assimetria da perda auditiva, sendo que o grau da orelha pior é moderado e de configuração fortemente descendente; ³ Um deles é o heterozigoto composto para os genes *GJB2* e *GJB6* (*35de/G / D13S1854*).

Na Tabela 24, encontra-se a descrição do fenótipo de 52 deficientes auditivos homozigotos selvagens, segundo as categorias de diagnóstico audiológico adotadas neste estudo. A média tonal geral, das frequências de 500, 1K e 2KHz, corresponde à deficiência auditiva de grau profundo (95,3dBNA) variando de grau moderado (44dBNA) a profundo (120dBNA).

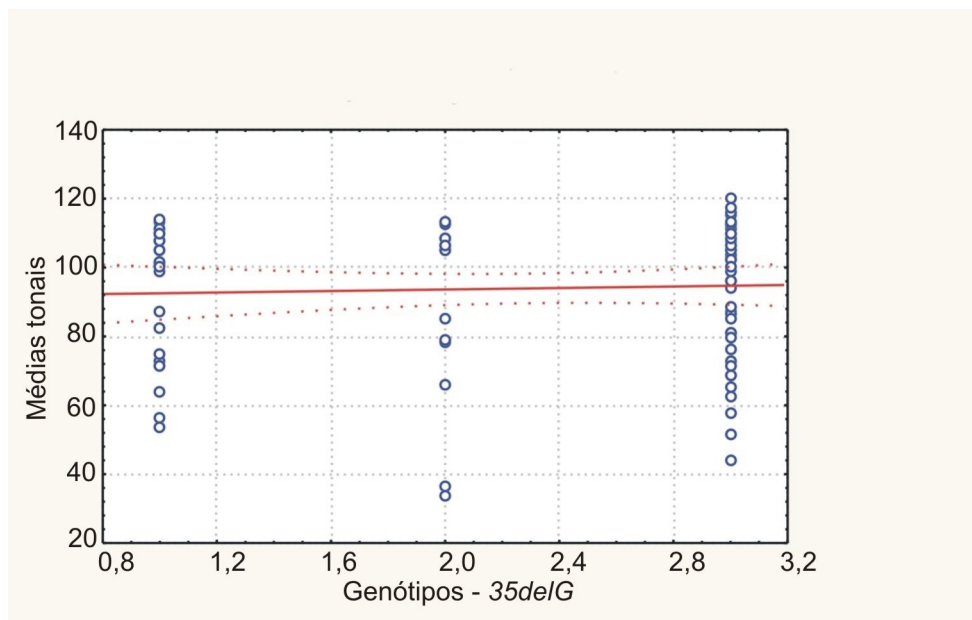
TABELA 24 - Relação genótipo-fenótipo de 52 deficientes auditivos não consangüíneos, homozigotos selvagens, segundo as categorias de diagnóstico audiológico¹ adotadas neste estudo, considerando-se a média da melhor orelha.

FENÓTIPO	GENÓTIPO			
	HOMOZIGOTO SELVAGEM			
CATEGORIAS DO DIAGNÓSTICO AUDIOLÓGICO	N	%	MÉDIA TONAL EM 500, 1K e 2KHz (dBNA ± DP)	AMPLITUDE DE VARIAÇÃO DA MÉDIA TONAL (dBNA)
4	4 ²	7,7	64	58 a 69
6	2 ³	3,8	48	44 a 51
7	12 ⁴	23,1	81	69 a 94
9	1	1,9	89	89
10	21	40,4	111	105 a 120
11	12	23,1	102	96 a 108
TOTAL	52	100,0	95 ± 19	44 a 120

¹ Classificação das categorias: 4 - grau moderado e configuração plana; 6 - grau moderado e configuração fortemente descendente; 7 - grau severo e configuração plana; 9 - grau severo e configuração levemente descendente; 10 - grau profundo e configuração plana; 11 - grau profundo e configuração levemente descendente.

² Dois deles apresentam perda auditiva assimétrica, sendo um com grau profundo e configuração levemente descendente e o outro com grau severo e configuração plana na pior orelha; ³ Dois deles apresentam perda auditiva assimétrica, sendo a pior orelha de grau severo e configuração fortemente descendente; ⁴ Quatro deles apresentam perda auditiva assimétrica, sendo a pior orelha de grau profundo e configuração levemente descendente.

Não existe correlação das médias tonais dos 91 deficientes auditivos com o genótipo em relação à mutação *35delG*, como mostra a Figura 13.



$$r = 0,05; t = 0,44; p = 0,66$$

FIGURA 13 - Gráfico de correlação entre as médias tonais (500, 1K e 2KHz) dos 91 deficientes auditivos distribuídos nos três genótipos com relação à mutação *35delG*. Os círculos azuis à esquerda do gráfico representam os 25 homozigotos para a *35delG*, os sinais no centro representam os 14 heterozigotos e os sinais à direita, representam os 52 homozigotos selvagens.

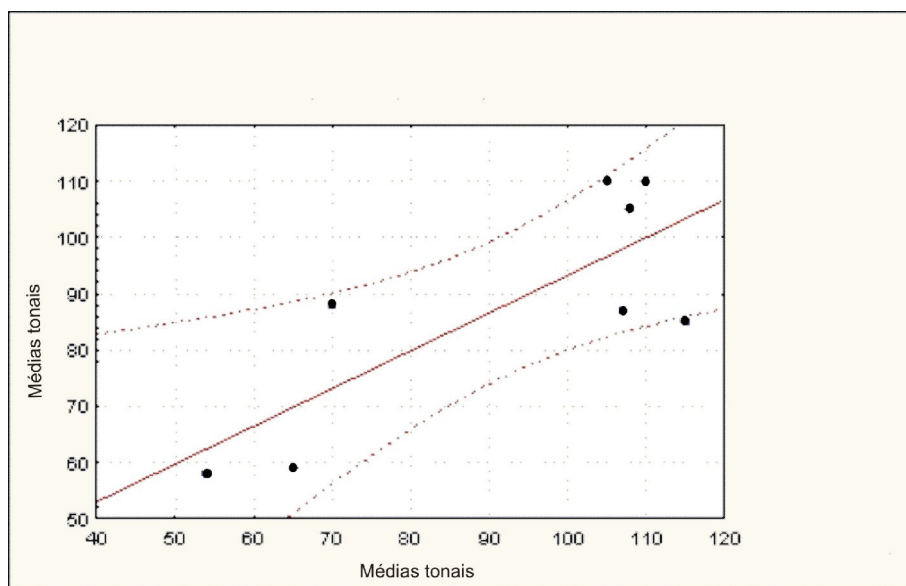
Na Tabela 25, é possível verificar a expressividade fenotípica intra e interfamiliar, no caso de oito famílias com deficiência auditiva em consangüíneos em 1º grau ($r = 0,50$), que realizaram audiometria tonal liminar (ATL).

TABELA 25 - Relação genótipo-fenótipo de 19 deficientes auditivos¹, pertencentes a oito famílias, classificadas segundo o grau de perda auditiva, considerando-se a média tonal (500, 1K e 2KHz) da melhor orelha.

GRAU DA PERDA AUDITIVA	GENÓTIPOS E MÉDIAS TONAIIS (dBNA)		
	Homozigoto <i>35delG</i>	Heterozigoto	Homozigoto selvagem
MODERADO	▷ (70)	▷ (68)	● (59)
	▲ (54)		● (65)
			▲ (58)
SEVERO	▷ (88)	✦ (87)	■ (85)
PROFUNDO	✦ (108)	✦ (107)	✖ (105)
	✦ (113)		✖ (110)
	★ (110)		
	★ (110)		
	■ (115)		
	✦ (105)		
	✦ (108)		
TOTAL	10	3	6

¹Famílias: pai, mãe, filha e tia materna - ✦; dois irmãos - ★; ■; ●; ✦; ✖; gêmeos fraternos - ▲; três irmãos - ▷.

Foram feitas três análises de correlação de médias tonais entre irmãos deficientes auditivos, tendo em vista que uma das famílias apresentou três irmãos afetados (Tabela 25). Dessa forma, em cada uma das análises de correlação foi considerado dois dos três irmãos desta família (♠). Também foram retirados desta análise, um pai e uma filha, pertencentes a uma família com quatro deficientes auditivos (♣), permanecendo somente a mãe e a tia materna. Os coeficientes de correlação das três análises realizadas, mostrando correlação positiva significativa das médias tonais entre irmãos, foram: 0,78 ($p = 0,022$); 0,79 ($p = 0,020$) e 0,87 ($p = 0,006$). Na Figura 14, o gráfico ilustra a correlação correspondente ao valor de r intermediário.



$$r = 0,79; t = 3,15; p = 0,020$$

FIGURA 14 - Gráfico de correlação das médias tonais (500, 1K e 2KHz) de 16 deficientes auditivos. Cada círculo no gráfico representa dois irmãos deficientes auditivos.

A Tabela 26 mostra as distribuições dos genótipos, quanto à mutação *35delG*, relacionadas somente ao grau de perda auditiva. Essas três distribuições não são estatisticamente diferentes.

TABELA 26 – Frequência de deficientes auditivos dos três genótipos com relação à mutação *35delG*, quanto aos graus de perda auditiva.

GENÓTIPOS	GRAUS DE PERDA AUDITIVA (%)				TOTAIS
	LEVE	MODERADO	SEVERO	PROFUNDO	
HOMOZIGOTO <i>35delG</i>	0	3 (12,0)	6 (24,0)	16 (64,0)	25
HETEROZIGOTO	2 (14,3)	1 (7,1)	3 (21,4)	8 (57,1)	14
HOMOZIGOTO NORMAL	0	7 (13,5)	12 (23,1)	33 (63,5)	52
TOTAIS	2	11	21	57	91

$$\chi^2_{(6)} = 11,5, p = 0,07$$

$$\chi^2_{(6)} \text{ de Máxima Verossimilhança (Teste de Fisher)} = 8,0; p = 0,24.$$

Também não houve diferença estatisticamente significativa entre os valores médios das médias tonais das frequências de 500, 1K e 2KHz das orelhas direita e esquerda, comparando-se os três genótipos com relação à mutação *35delG*, como mostra a Tabela 27. Esse resultado foi obtido após a aplicação de análise de variância ANOVA. O grau da perda foi identificado em 42 orelhas direitas e em 49 orelhas esquerdas.

TABELA 27 – Médias tonais das frequências de 500,1K e 2KHz da melhor orelha e Desvio Padrão (DP) para os três genótipos de não consangüíneos, com relação à mutação *35delG*, com respectivas comparações de médias por meio da análise de variância ANOVA.

GENÓTIPOS	MÉDIA TONAL EM 500, 1K e 2KHz NA ORELHA DIREITA (OD)			MÉDIA TONAL EM 500, 1K e 2KHz NA ORELHA ESQUERDA (OE)		
	N	MÉDIA	DP	N	MÉDIA	DP
HOMOZIGOTO <i>35delG</i>	14	95,9	± 20,5	11	91,3	± 18,5
HETEROZIGOTO	5	91,8	± 32,5	9	87,3	± 25,8
HOMOZIGOTO SELVAGEM	23	93,8	± 18,8	29	96,6	± 19,4
TOTAL	42	94,3	± 20,7	49	93,7	± 20,4
F	0,08; p = 0,92			0,81; p = 0,45		

As categorias de diagnóstico audiológico adotadas neste estudo foram agrupadas em quatro tipos de configurações audiométricas, com o propósito de comparar com outros estudos estas características fenotípicas. As configurações são: (1) plana; (2) descendente; (3) ascendente e (4) curva em “U”. Como mostra a Tabela 28, as distribuições das configurações não são diferentes estatisticamente, em relação aos genótipos considerados.

Também foi possível verificar que não houve diferença estatisticamente significativa entre a simetria da perda auditiva para os deficientes auditivos não consangüíneos, distribuídos nos três genótipos, conforme mostra a Tabela 29.

TABELA 28 – Distribuição dos 91 deficientes auditivos não consangüíneos, genotipados para a mutação *35delG*, com relação ao tipo de configuração audiométrica.

GENÓTIPOS	CONFIGURAÇÃO AUDIOMÉTRICA								TOTAIS
	Plana		Descendente		Ascendente		“U”		
	N	%	N	%	N	%	N	%	
Homozigotos <i>35delG</i>	16	64,0	8	32,0			1	4,0	25
Heterozigotos	7	50,0	6	42,86	1	7,14			14
Homozigotos selvagens	34	65,38	18	34,62					52
TOTAIS	57		32		1		1		91

$$\chi^2_{(6)} = 8,88, p = 0,18$$

TABELA 29 – Distribuição dos deficientes auditivos não consangüíneos, com relação aos três genótipos, quanto à simetria ou assimetria da perda auditiva.

GENÓTIPOS	PERDA AUDITIVA				TOTAL
	SIMÉTRICA		ASSIMÉTRICA		
	N	%	N	%	
Homozigotos <i>35delG</i>	23	92,0	2	8,0	25
Heterozigotos	13	92,9	1	7,1	14
Homozigotos selvagens	44	84,6	8	15,4	52
TOTAL	80		11		91

$$\chi^2_{(2)} = 1,25, p = 0,54$$

Nenhum dos 25 homozigotos para a mutação *35delG*, que foram avaliados quanto ao Limiar de Recepção de Fala (LRF), apresentou limiar de reconhecimento para palavras. Todos apresentaram apenas o Limiar de Detecção de Voz (LDV) compatível com a média dos limiares tonais.

Apenas para dois heterozigotos *35delG*, de um total de 12, foi obtido o LRF, sendo que somente um, que apresenta perda auditiva de grau severo com configuração plana na melhor orelha (esquerda), conseguiu índice percentual de reconhecimento de fala (IPRF) para palavras monossílabas e dissílabas, bilateralmente. Este afetado também apresentou latências absolutas normais na pesquisa do PEATE, para a melhor orelha. O outro heterozigoto, mesmo apresentando um grau de perda auditiva leve com configuração ascendente na melhor orelha (direita), não conseguiu o IPRF e também não apresentou latências absolutas na pesquisa do PEATE, bilateralmente. Os demais 10 heterozigotos somente apresentaram LDV, o qual foi compatível com a média dos limiares tonais.

Dos 51 homozigotos selvagens, que realizaram os testes de fala, apenas 4 apresentaram LRF, em ambas as orelhas, sendo 3 com IPRF para palavras monossílabas e dissílabas, e um com IPRF somente para monossílabas. Mais outros dois probandos apresentaram LRF somente na OD, com IPRF para monossílabos e dissílabos, e na orelha esquerda, LDV compatível com a média dos limiares tonais. Os demais 45 probandos apresentaram LDV em ambas as orelhas, compatível com a média tonal. Na Tabela 30, encontram-se descritos estes dados.

TABELA 30 – Distribuição dos deficientes auditivos, não consangüíneos, que realizaram o limiar de detecção de voz (LDV), limiar de recepção de fala (LRF) e obtiveram o índice percentual de reconhecimento de fala (IPRF), na orelha direita (D) e esquerda (E).

GENÓTIPOS	LDV (N)				LRF (N)				IPRF(%)			
	Presente		Ausente		Presente		Ausente		OD		OE	
	D	E	D	E	D	E	D	E	Mon	Diss	Mon	Diss
Homozigotos 35delG	25	25					25	25				
	10	10					10	10				
Heterozigotos					1	1			72	88	72	88
					1	1						
	45	45					45	45				
					1	1			36	64	84	88
					1	1			96		96	
Homozigotos selvagens		1			1				36	48		
		1			1				36	40		
					1	1			16	24	24	32
					1	1			52	80	24	32
TOTAL	80	82	0		8	6	80	7	6	5	4	

As medidas de imitância acústica foram realizadas em 95 deficientes auditivos não consangüíneos, classificados em 26 homozigotos para a mutação 35delG, 16 heterozigotos e 53 homozigotos selvagens (Tabela 31).

TABELA 31 – Distribuição dos deficientes auditivos, não consangüíneos, que realizaram as Medidas de Imitância Acústica (M.I.Ac), classificados de acordo com os genótipos para a mutação *35delG* do gene *GJB2*.

MEDIDAS DE IMITÂNCIA ACÚSTICA	GENÓTIPOS					
	Homozigoto <i>35delG</i>		Heterozigoto		Homozigoto selvagem	
	N	Tipo de alteração	N	Tipo de alteração	N	Tipo de alteração
Alterada			1	Curva tipo B	2 ¹	Curva tipo C
					2	Curva tipo Ar
Normal	26	Curva tipo A	15	Curva tipo A	49	Curva tipo A
TOTAL	26		16		53	

¹ Um deles apresenta alteração somente em uma orelha.

Os 26 homozigotos para a mutação *35delG* apresentaram curva timpanométrica normal, do tipo A, com ausência de reflexos acústicos, tanto contralateral quanto ipsilateralmente.

Dos 16 heterozigotos, apenas um deficiente auditivo apresentou curva timpanométrica alterada. Este probando foi genotipado como heterozigoto composto para os genes *GJB2* e *GJB6* (*35delG* / *D13S1830*) e realizou as medidas de imitância acústica em uma clínica particular. A curva timpanométrica apresentou-se alterada, do tipo B, onde não ocorre um ponto de admitância pela membrana timpânica, podendo haver presença de líquido no espaço da orelha

média. A pesquisa dos reflexos acústicos não foi realizada devido à intensa movimentação da criança durante a realização do exame. A pesquisa do PEATE também foi realizada na mesma clínica e apresentou, como laudo, ausência de latências absolutas em ambas as orelhas.

Os demais 15 heterozigotos apresentaram curva timpanométrica normal, do tipo A, com ausência de reflexos acústicos bilateralmente, tanto contralateral, como ipsilateralmente.

Dos 53 homozigotos selvagens, quatro apresentaram alteração na curva timpanométrica. Dois probandos apresentaram curva timpanométrica do tipo C, sendo que para um deles, somente na orelha direita. A pesquisa dos reflexos acústicos, tanto contralateral quanto ipsilateralmente, mostrou ausência para ambas as orelhas, nos dois probandos.

Outros dois probandos, homozigotos selvagens, também apresentaram alteração na curva timpanométrica, denominada de Ar. Esta alteração caracteriza-se por uma mobilidade reduzida da cadeia ossicular, produzindo uma curva timpanométrica com amplitude reduzida. O valor do volume da orelha média nestes probandos foi de 0,1cc, e os reflexos acústicos, contralateral e ipsilateralmente, estão ausentes.

Os demais 49 deficientes auditivos, que realizaram as medidas de imitância acústica, apresentaram curva timpanométrica normal, do tipo A, com ausência de reflexos acústicos, tanto contralateral quanto ipsilateralmente, em ambas as orelhas.

Todos os deficientes auditivos, não consangüíneos, que realizaram a pesquisa das EOE, tanto por estímulo transiente (N = 94), quanto EOE produto de distorção (N = 71), apresentaram ausência na resposta em ambas as orelhas.

A Tabela 32 mostra a distribuição dos deficientes auditivos (N = 83) que realizaram a pesquisa do potencial evocado auditivo do tronco encefálico (PEATE), de acordo com os genótipos. Não há diferenças estatisticamente significativas em relação aos genótipos.

Dos 83 deficientes auditivos, que realizaram a pesquisa do PEATE, 25 são homozigotos para a mutação *35de/G* e, destes, somente três têm presença de latências absolutas dentro da normalidade. O primeiro teve resposta presente bilateralmente. O segundo apresenta latências absolutas normais à direita e latências absolutas alteradas na orelha esquerda e o grau de perda auditiva é moderado em ambas as orelhas. O terceiro apresenta latências absolutas normais à direita e ausência de resposta na orelha esquerda, com configuração audiométrica em forma de “U”, onde a média das freqüências médias é pior que a média das freqüências altas e das freqüências baixas. A perda auditiva é bilateral mas apresenta assimetria entre as orelhas. Os demais 22 probandos homozigotos para *35de/G* têm ausência de resposta bilateralmente a 90dB na pesquisa do PEATE.

TABELA 32 - Distribuição dos deficientes auditivos, não consangüíneos, que realizaram a pesquisa do PEATE, mostrando se houve ausência ou presença de resposta para orelha direita (OD) e esquerda (OE), e valores de χ^2 e p.

GENÓTIPOS	PEATE				TOTALS
	AUSÊNCIA		PRESENÇA		
	OD	OE	OD	OE	
Homozigotos 35delG	22	23	3	2	25
Heterozigotos	16	15	1	2	17
Homozigotos selvagens	36	37	5	4	41
TOTALS	74	75	9	8	83

$\chi^2_{(2)} = 4,28$ (OD); p = 0,64 e $\chi^2_{(2)} = 4,06$ (OE); p = 0,67.

Dos 17 heterozigotos para *35delG* que realizaram a pesquisa do PEATE, somente um tem presença de latências absolutas dentro da normalidade bilateralmente, e o segundo tem presença somente na orelha esquerda. Os demais 16 heterozigotos têm ausência de resposta bilateralmente a 90dB na pesquisa do PEATE.

Dos 41 homozigotos selvagens que realizaram a pesquisa do PEATE, cinco apresentaram presença de resposta e os resultados estão descritos na Tabela 33.

TABELA 33 – Resultados da pesquisa do PEATE nos cinco homozigotos selvagens, que tiveram presença de resposta.

RESULTADOS DO PEATE		GENÓTIPO HOMOZIGOTO SELVAGEM	
OD	OE	N	%
Todas as latências presentes e normais	Todas as latências presentes e normais	1	20,0
Todas as latências presentes e alteradas	Todas as latências presentes e alteradas	2	40,0
Todas as latências presentes e normais	Ausência de resposta	1	20,0
	Ondas I e III, latências alteradas Onda V, latência normal	1	20,0
TOTAL		5	100

5.9 DEFICIÊNCIA AUDITIVA E DESENVOLVIMENTO DA FALA

A maioria dos indivíduos somente iniciou o desenvolvimento da fala após o ingresso na escola, o que pode ter ocorrido logo posteriormente à aquisição do aparelho de amplificação sonora, entre a faixa etária de 4 a 6 anos. Na Tabela 34, encontra-se a distribuição destes dados por período de tempo, dos 156 deficientes auditivos da amostra.

Os 20 deficientes auditivos que não desenvolveram a linguagem falada são distribuídos da seguinte forma: homozigoto para *35delG* (1); heterozigotos (4), sendo um deles heterozigoto composto (*GJB2* e *GJB6*); homozigotos selvagens (15).

TABELA 34 - Distribuição de freqüência dos 156 deficientes auditivos, quanto ao período de desenvolvimento da fala.

DESENVOLVIMENTO DA FALA	N	%
Antes de 1 ano	2	1,28
Entre 1 e 2 anos	33	21,15
Entre 2 e 3 anos	17	10,90
Entre 3 e 4 anos	14	8,97
Após o ingresso na escola	70	44,88
Só utiliza gestos e linguagem de sinais	20	12,82
TOTAL	156	100

O homozigoto para *35de/G*, que não desenvolveu a fala, não faz parte do grupo analisado para freqüências genotípicas e alélica (Tabela 6), por ser consangüíneo em 1º grau do probando. Não faz uso de aparelho de amplificação sonora atualmente e, na infância, não recebeu treinamento para reabilitação auditiva e de fala.

Dos quatro heterozigotos, que não desenvolveram a fala, dois têm idade inferior a dois anos e já estão fazendo uso do aparelho de amplificação sonora, além de freqüentarem sessões de treinamento para reabilitação auditiva e de fala em escolas especializadas. Os outros dois heterozigotos, não fazem uso do aparelho de amplificação sonora devido a não aceitação do mesmo. Um deles tem perda auditiva de grau profundo, bilateralmente e o outro, tem perda auditiva moderada bilateralmente, com suspeita de neuropatia auditiva, sugerida pelos profissionais que realizaram a avaliação auditiva na própria escola. A pesquisa das EOET e do PEATE revelou ausência de resposta bilateralmente.

6. DISCUSSÃO

A deficiência auditiva tem sido considerada o problema sensorial mais prevalente na população, afetando mais de 250 milhões de pessoas no mundo (MATHERS; SMITH; CONCHA, 2000) e o estudo de suas causas genéticas avançou significativamente nos últimos quatro anos.

A mutação *35delG* no gene *GJB2* que codifica a Conexina 26 tem sido a mutação mais estudada em diversas populações do mundo, sendo considerada a mais freqüente em relação a qualquer gene já estudado em caucasóides, referente à deficiência auditiva.

Esta mutação não é rara na população brasileira, sendo que três estudos brasileiros (SARTORATO et al., 2000; OLIVEIRA et al., 2004; PIATTO et al., 2005) obtiveram freqüências populacionais de heterozigotos para a mutação *35delG*: 0,97%, 2,00% e 2,24%, respectivamente. Em outros países essa freqüência populacional tem variado de 1,0% a 2,7%: Estados Unidos (1,0%); Austrália (1,0%); Áustria (1,7%); Turquia (1,8%); Portugal (2,2%); Espanha (2,5%) e França (2,7%), de acordo com, respectivamente, KELLEY et al., (1998); WILCOX et al., (2000); TEKIN et al., (2001); FREI et al., (2005); GASPARINI et al., (2000) e LUCOTTE et al., (2001). Além dessas, pode-se ressaltar a freqüência populacional de heterozigotos para a mutação *35delG* na população italiana, que tem sido descrita entre 2% a 4%, em vários estudos, alcançando o valor mais elevado entre as populações européias.

No presente estudo, a análise da etnia dos probandos (N = 144) mostrou 77% (111/144) com ascendência portuguesa e italiana, sendo que entre os

afetados, com a mutação *35delG*, esta frequência foi semelhante (74%; 37/50). Estes achados exemplificam os dados históricos da miscigenação da população brasileira com os imigrantes europeus, principalmente na região sul do país.

Um único estudo (PROPST et al., 2005) examinou uma amostra de deficientes auditivos de Toronto (Canadá), com o objetivo de determinar a relação entre etnia e mutações no gene *GJB2*. Nesse trabalho, a frequência de homo e heterozigotos com a mutação *35delG* (17/65), distribuiu-se de forma relativamente homogênea em descendentes de várias partes do mundo como: árabes (1), judeus (1), indianos (2), gregos (1), russos (1), africanos (2) e outros caucasóides (9).

BATISSOCO (2006) classificou a etnia de 198 deficientes auditivos em uma amostra de 300 indivíduos brasileiros (66%). Destes, 62% eram brancos (122/198), 32% pardos (64/198), 5% negros (10/198) e 1% oriental (2/198). Na amostra do presente estudo obtivemos a seguinte classificação: 97,9% brancos e 2,1% com miscigenação africana. Isto sugere que esta amostra, obtida em Curitiba, apresenta uma proporção maior de descendentes europeus do que a de São Paulo, estudada por BATISSOCO (2006).

6.1 FREQUÊNCIAS DA MUTAÇÃO *35delG*

Visando uma melhor comparação entre os achados do presente estudo com outros do Brasil, bem como do exterior, foram feitas comparações quanto às frequências de:

1. Homozigotos e heterozigotos com a mutação *35de/G* no total de famílias analisadas.
2. Homozigotos e heterozigotos com a mutação *35de/G* em famílias com e sem recorrência da deficiência auditiva.
3. Alelos

6.1.1 Frequência de homozigotos e heterozigotos com a mutação *35de/G*

Nos estudos descritos na Tabela 3, a frequência de homozigotos mais heterozigotos com mutação *35de/G* variou de 5,3% (Brasil) a 31,8% (Croácia), considerando uma grande variação no número e na diversidade das amostras de afetados.

Quatro estudos desenvolvidos no Brasil permitiram comparação da frequência de homo e heterozigotos com a mutação *35de/G* no total de famílias analisadas com deficientes auditivos. No presente estudo, 50 famílias não relacionadas (Tabela 7) apresentaram a mutação *35de/G*, num total de 144 famílias analisadas ($34,7\% \pm 4,0\%$ EP). Este achado não é estatisticamente diferente (teste exato de Fisher; $p = 0,54$) do achado de PIATTO et al. (2004), que encontrou uma frequência de 27,3% (9/33) de famílias apresentando essa mutação em homozigotos e heterozigotos, apesar da amostra desses autores diferir da amostra do presente estudo, por ter sido rigorosamente selecionada, excluindo qualquer tipo de fator ambiental pré-, peri- ou pós-natal.

Foi encontrada uma diferença estatisticamente significativa (teste exato de Fisher; $p = 0,001$) entre os achados do presente estudo e os de OLIVEIRA et al. (2002), no qual também foi excluída, tanto quanto possível, a influência de fatores ambientais. Na amostra desses autores, houve 12,9% (8/62) de homozigotos e heterozigotos com a mutação *35de/G*.

No estudo de PFEILSTICKER et al. (2004), a amostra analisada de 75 famílias brasileiras incluiu casos familiares e esporádicos, além daqueles que não tinham um diagnóstico etiológico conclusivo. A diferença também foi estatisticamente significativa, quando esses achados (5,3%; 4/75) foram comparados aos do presente estudo (teste exato de Fisher; $p < 0,0001$).

A frequência de homozigotos e heterozigotos (12,3%; 37/300), com a mutação *35de/G* do estudo brasileiro de BATISSOCO (2006), foi estatisticamente menor que a do presente estudo ($p < 0,0001$). É possível que essa diferença seja devido à maior proporção de afetados de origem mediterrânea na presente amostra.

Cabe ressaltar que, no presente estudo, não foram retirados os deficientes auditivos que apresentaram fatores ambientais que sugerissem a causa da deficiência auditiva. Como é possível observar na Tabela 18, dos 34 homozigotos que compuseram a amostra total de 156 deficientes auditivos, 14 apresentaram fatores ambientais em sua história clínica, sendo mais comuns aqueles dos períodos pré-natal, como toxoplasmose e suspeita de rubéola, e perinatal.

No estudo feito na Itália (GUALANDI et al., 2002), cuja frequência de homozigotos para a *35de/G* foi de 21,9% (34/155), dois homozigotos também apresentaram fatores perinatais, como baixo peso e anóxia, ao nascimento. Essa

amostra era composta de 155 indivíduos de origem italiana com deficiência auditiva não-sindrômica, e a frequência, de homozigotos e heterozigotos com a mutação *35de/G* (34,2%), também não foi estatisticamente diferente da amostra do presente estudo (teste de exato Fisher; $p = 100\%$).

Um estudo, com amostra de Marrocos (GAZZAZ et al., 2005), registrou uma frequência de 24,1% (28/116), a qual não mostrou diferença estatisticamente significativa ($p = 0,077$), quando comparada à frequência do presente estudo.

6.1.2 Frequência de homozigotos e heterozigotos com a mutação *35de/G* em famílias com e sem recorrência da deficiência auditiva

A comparação da frequência de homozigotos e heterozigotos para a mutação *35de/G*, em famílias com recorrência da afecção, foi possível com o estudo brasileiro de OLIVEIRA et al. (2002). Esse estudo encontrou, nessas famílias, uma frequência de 50,0% (5/10) com essa mutação, a qual não diferiu estatisticamente da frequência de 54,5% (6/11) do presente estudo (Tabela 8), de acordo com o teste exato de Fisher; $p = 100\%$. Entretanto, ao compararmos os dois estudos, quanto à frequência de homozigotos e heterozigotos, nas famílias com casos isolados, o teste exato de Fisher mostrou um valor de $p = 0,052$, no limite da significância. No estudo de OLIVEIRA et al. (2002), essa frequência foi de 11,5% (3/26) e, no presente estudo, foi de 30,8% (32/104). Cabe ressaltar que nos casos isolados do presente estudo ($N = 104$) não foram considerados 29 deficientes auditivos, que apresentavam outro indivíduo consanguíneo distante afetado, mas com $r < 0,25$ ou desconhecido.

No estudo de BATISSOCO (2006), a frequência de homozigotos e heterozigotos para a mutação *35de/G*, em famílias com recorrência da deficiência auditiva, foi de 8,3% (25/300) e em famílias com casos isolados, foi de 4,0% (12/300). Essas frequências foram significativamente menores do que as respectivas do presente estudo, conforme comparações pelo teste exato de Fisher: $p = 0,0002$ e $p < 0,0001$, respectivamente, provavelmente devido a diferenças étnicas entre as amostras.

O estudo com a amostra de Marrocos (GAZZAZ et al., 2005), em famílias com recorrência da deficiência auditiva, mostrou 31,6% de homozigotos e heterozigotos (12/38), enquanto nas famílias com casos esporádicos essa frequência foi de 20,5% (16/78). Esses dados não diferem significativamente dos do presente estudo: $p > 0,25$ e $p > 0,10$, respectivamente (teste exato de Fisher).

Na Turquia, TEKIN et al. (2003) encontraram uma frequência de 26,6% (41/154) nas famílias com recorrência da deficiência auditiva e de 16,7% (17/102) nas famílias com casos esporádicos. Comparando-se com o presente estudo, não houve diferença significativa da frequência de homozigotos e heterozigotos apenas quando se compararam as famílias com recorrência (teste exato de Fisher; $p = 0,077$), enquanto que nas famílias com casos esporádicos, a frequência do presente estudo foi significativamente maior (teste exato de Fisher; $p = 0,022$).

A variação das frequências de homozigotos e heterozigotos entre as diversas populações do mundo (Tabela 3), pode refletir uma história diferente de migrações humanas, corroborando com a hipótese da mutação *35de/G* ter sido consequência de um único evento ocorrido em um cromossomo fundador, como

explica o estudo sobre heterogeneidade haplotípica de ROTHROCK et al. (2003). Entretanto, a frequência conjunta de homozigotos e heterozigotos encontrada no presente estudo é, em geral, similar a de outros países mediterrâneos. Em vista disso, nas comparações com dados do exterior foram escolhidas amostras de regiões mediterrâneas e que trouxessem dados suficientes para essas comparações.

6.1.3 Frequências alélicas

A frequência alélica do presente estudo (Tabela 7) foi comparada com a de outros estudos brasileiros, como mostra a Tabela 35, sendo que não difere daquela encontrada por PIATTO et al., 2004 (teste exato de Fisher; $p > 0,30$), mas é estatisticamente maior que a encontrada por PFEILSTICKER et al., 2004 (teste exato de Fisher; $p < 0,0001$).

TABELA 35 – Comparação das frequências alélicas de *35de/G* do gene *GJB2*, considerando-se três estudos realizados no Brasil, em amostras de afetados.

ESTUDOS	Alelos mutados <i>35de/G</i> (N)	Cromossomos analisados (N)	Frequência alélica (%)
Presente estudo	79	288	27,4
PIATTO et al. (2004)	14	66	21,2
PFEILSTICKER et al. (2004)	6	150	4,0 *

* $p < 0,0001$ (teste exato de Fisher).

A freqüência alélica do presente estudo não diferiu de duas outras referentes a italianos: a) 25,1% (136/542), encontrada em um estudo de ORZAN et al., (2002) cujo $\chi^2_{(1)} = 0,54$ e $p > 0,45$; b) 28,1% (87/310), num estudo de GUALANDI et al., (2002) com $\chi^2_{(1)} = 0,03$ e $p > 0,85$. Também não diferiu da freqüência alélica de 21,6% (50/232), encontrada em Marrocos por GAZZAZ et al., 2005 ($\chi^2_{(1)} = 2,38$ e $p > 0,10$).

6.2 FREQUÊNCIA DAS DELEÇÕES DO GENE *GJB6*

A investigação de mutações no gene *GJB2*, em indivíduos com deficiência auditiva autossômica recessiva, tem revelado um grande número (10% a 50%) de heterozigotos com somente uma alelo mutado (KENNESON; VAN NAARDEN BRAUN; BAYLE, 2002). Os autores relatam que, mesmo realizando uma completa varredura do gene, incluindo além da região codificadora do exon 2, também o exon 1 e sítios de recomposição, muitos estudos não encontraram a segunda mutação esperada. Segundo DEL CASTILLO et al. (2003), estes achados poderiam ser atribuídos a limitações intrínsecas nas técnicas utilizadas para varredura de mutações ou à existência de mutações em outras regiões não codificantes do gene, ainda não identificadas. Entretanto, esses autores também levantaram a possibilidade da existência de outras mutações, no mesmo loco *DFNB1*, fora do gene *GJB2*.

As deleções de 309Kb e 232Kb do gene *GJB6*, $\Delta(GJB6-D13S1830)$ e $\Delta(GJB6-D13S1854)$ respectivamente, descobertas nos estudos de LERER et al.

(2001); DEL CASTILLO et al. (2002); PALLAREZ-RUIZ et al. (2002), confirmaram a existência de mutações fora do gene *GJB2*, indicando um padrão digênico de herança, envolvendo tanto o gene *GJB2* como o gene *GJB6*, na determinação da deficiência auditiva. A hipótese de um padrão digênico é reforçada por várias evidências já descritas anteriormente (item 2.2.2; Conexina 30). Segundo DEL CASTILLO et al. (2003), apesar de ainda não terem sido encontradas mutações de ponto no *GJB6*, uma hipótese é que a deleção neste gene pode eliminar um elemento regulador para o gene *GJB2*, o qual apesar de ainda não ter sido encontrado, poderia ser essencial para a expressão normal deste gene.

No presente estudo, foram encontrados dois heterozigotos compostos para os genes *GJB2* e *GJB6*, sendo que um apresenta a deleção $\Delta(GJB6-D13S1830)$ e o outro, a deleção $\Delta(GJB6-D13S1854)$, num total de 115 deficientes auditivos analisados, sendo 21 heterozigotos para a mutação *35delG* do gene *GJB2* e 94 homozigotos selvagens. A frequência de cada deleção no total dos cromossomos dos heterozigotos para *35delG* foi de 2,4% (1/42), havendo 4,7% de cada heterozigoto composto entre os 21 heterozigotos para a mutação *35delG*. Assim, consideramos que a genotipagem para essas duas deleções, que pode ser feita em uma única PCR, é bem indicada pois, no presente estudo possibilitou explicar a origem genética da deficiência auditiva em cerca de 9,5% dos heterozigotos.

Como acontece com a frequência da mutação *35delG*, a frequência da deleção $\Delta(GJB6-D13S1830)$ do gene *GJB6*, entre os heterozigotos para *GJB2*, pode variar entre as populações. Por exemplo, essa mutação alcança valores

altos em amostras de deficientes auditivos heterozigotos da Espanha (42,6%; DEL CASTILLO et al., 2003) ou é menos freqüente, como em amostra Tcheca (8,3%; 1/12;), segundo SEEMAN et al. (2005) ou até mesmo não foi encontrada, como na Áustria (FREI et al., 2004), na Croácia (MEDICA et al., 2005) e na Turquia (UYGUNER et al., 2003; KALAY et al., 2005). No caso da freqüência desta deleção, ocorre um gradiente do oeste para o leste europeu em sentido decrescente, segundo MEDICA et al. (2005).

A freqüência da deleção $\Delta(GJB6-D13S1830)$ do presente estudo, entre os alelos mutados do loco *DFNB1* (sem considerar $\Delta GJB6-D13S1854$ para permitir comparação com outros estudos) foi de 1,3% (1/80) e não diferiu das freqüências relatadas para a Austrália (1,3%; 2/150) e Bélgica (1,4%; 2/138), obtidas em um estudo multicêntrico (DEL CASTILLO et al., 2003). Neste mesmo estudo multicêntrico, a freqüência dessa deleção entre os mutados do loco *DFNB1*, encontrada numa amostra do Brasil, coletada pela equipe da Profa. Dra. Edi Lúcia Sartorato, foi considerada uma das mais altas (7,1%; 2/28), juntamente com as encontradas na Espanha (9,7%; 7/72), França (8,2%; 23/280); Reino Unido (5,9%; 6/102) e Israel (7,1%; 9/126).

A freqüência de 4,8% (1/21) da deleção $\Delta(GJB6-D13S1854)$, entre os heterozigotos para *35delG* (Tabela 8), não é estatisticamente diferente da encontrada em uma amostra do Brasil (6,3%; 1/16; teste exato de Fisher com $p = 100\%$), examinada pela equipe da Dra. Sartorato, constante do estudo de DEL CASTILLO et al. (2005), referente a um heterozigoto composto que também apresentava a mutação *V37I* do gene *GJB2*. Na Itália, onde a freqüência de heterozigotos para *35delG* é considerada uma das mais altas do mundo, a

freqüência da deleção $\Delta(GJB6-D13S1854)$ entre os heterozigotos (1,9% 1/53) também não difere da encontrada no presente estudo (teste exato de Fisher; $p > 0,45$).

6.3 INDICADORES DE RISCO PARA A DEFICIÊNCIA AUDITIVA

Grande é a preocupação dos profissionais da saúde, que se dedicam ao tratamento de deficientes auditivos, frente à incidência estimada desta deficiência ao nascimento (1-3/1000), sendo 100 vezes mais prevalente que a fenilcetonúria e dez vezes mais prevalente que o hipotireoidismo (BAROCH, 2003).

A realidade brasileira distancia-se muito da realidade de países do Primeiro Mundo, quando se trata da detecção e do diagnóstico precoce da deficiência auditiva. Dentre os Indicadores de Risco para Deficiência Auditiva (IRDA) segundo o *Joint Committee on Infant Hearing* (2000), estão a história de deficiência auditiva familiar e a consangüinidade entre os genitores, entre outros que serão comentados posteriormente. Tem sido descrita a freqüência de consangüinidade entre genitores dos deficientes auditivos, em vários estudos brasileiros, que discutem o diagnóstico precoce e as prováveis etiologias da deficiência auditiva.

Para SALERNO et al. (1985), a consangüinidade dos genitores foi considerada a principal causa pré-natal de deficiência auditiva dentre os IRDA, com uma freqüência de 52,2% (35/67), em estudo de 782 deficientes auditivos do Distrito Federal e de outros estados vizinhos. Excluindo-se os afetados que tiveram otites, cuja perda auditiva não é neurosensorial, a freqüência da

consangüinidade na amostra geral é de 8,3% (35/423). Esses autores relatam a ocorrência, com relativa freqüência, de casamentos consangüíneos nas pequenas cidades do interior dos Estados de Goiás, Minas Gerais e do Nordeste, regiões de onde provêm os indivíduos avaliados. Similarmente, KOKITSU-NAKATA, GUION-ALMEIDA e RICHIERI-COSTA (2004) também encontraram uma freqüência de consangüinidade parental de 8,7% (12/138) entre os genitores dos deficientes auditivos neurossensoriais.

DUARTE e SILVA (1997) relataram consangüinidade comprovada entre os genitores de afetados, em 2,1% dos casos esporádicos de Recife (11/520), enquanto BUTUGAN et al. (2000) identificaram uma freqüência de 5,8% (9/154), na capital de São Paulo. Em contraste com esses valores, uma freqüência de consangüinidade extremamente alta (22,4%), entre os genitores dos afetados, foi encontrada por LONGHITANO e BRUNONI (2000), na capital de São Paulo, quando comparada com aquela da população urbana brasileira (em torno de 1%), segundo os achados de AGOSTINI e MEIRELLES-NASSER (1986).

No presente estudo, 5,6% (8/144) dos probandos têm genitores com algum grau de consangüinidade entre eles e a freqüência de deficientes auditivos afetados pela mutação *35delG*, nessas famílias, foi de 50% (4/8): três homozigotos e um heterozigoto. Uma revisão de três estudos sobre a freqüência de casamentos consangüíneos, com informações obtidas na diocese de Curitiba (DE BASSI e FREIRE-MAIA, 1985), mostrou as seguintes freqüências: 2,79% (1945-1951); 1,07% (1967) e 0,44% (1980). Esses valores diminuem com o tempo, como é esperado em decorrência do aumento populacional. O valor de 5,6% encontrado no presente estudo é estatisticamente maior que o encontrado

por DE BASSI (1983) citado por DE BASSI e FREIRE-MAIA (1985), de 0,44% (32/7332), de acordo com o valor de $\chi^2_{(1)} = 69,54$ ($p < 0,0001$). O resultado dessa comparação mostra o casamento consangüíneo, entre os genitores dos afetados, como um importante IRDA.

Considerando somente a homozigose da mutação *35delG* em famílias com genitores consangüíneos, temos uma freqüência de 37,5% casos (3/8), no presente estudo. O único dado desse tipo de freqüência foi relatado para a população turca (TEKIN et al., 2003), na qual 11 afetados homozigotos (10,3%) são provenientes de 107 casais consangüíneos. Quando comparada com a do presente estudo, a diferença mostrou-se no limite da significância (teste exato de Fisher = 0,056).

Dentre os outros IRDA, segundo o *Joint Committee on Infant Hearing* (2000), estão: recém-nascido com peso inferior a 1500g; tamanho pequeno para a idade gestacional; asfixia perinatal grave; hemorragia intracraniana ou leucoencefalomalácia; infecção congênita suspeitada ou confirmada; síndromes associadas à deficiência auditiva; recém-nascido acometido por meningite bacteriana; medicação ototóxica; hiperbilirrubinemia com nível próximo ao de indicação de transfusão exsangüínea; malformações craniofaciais; recém-nascido com permanência em UTI por mais de 48hs.

No presente estudo, apesar do grupo de homozigotos selvagens, quando comparado ao conjunto de homozigotos e heterozigotos para a mutação *35delG*, ter apresentado uma freqüência estatisticamente maior de fatores ambientais de risco para a deficiência auditiva, como seria esperado, cabe ressaltar que 14 dos

34 homozigotos para a mutação *35delG*, incluindo-se aqui os consangüíneos afetados dos probandos, apresentaram algum fator ambiental em seu histórico clínico.

Um dos fatores pré-natais mais preocupantes e citados na literatura, devido aos seus efeitos teratogênicos, é a rubéola gestacional. Há grande vulnerabilidade do feto no primeiro trimestre da gestação aos efeitos do vírus que costuma provocar a tríade clássica: catarata congênita, deficiência auditiva e malformações cardíacas, segundo NIEDZIELSKA; KATSHA e SZYMOLA (2000).

Em várias populações, os adultos jovens apresentam grande susceptibilidade a essa doença, sendo que de 26% a 70% das mulheres com idade para engravidar ainda são susceptíveis. A idade gestacional no momento da infecção fetal é que determina o grau de risco do dano, sendo este risco ao feto inversamente proporcional à idade gestacional. A deficiência auditiva neurosensorial é uma das manifestações da rubéola, assim como outros distúrbios: da linguagem, do desenvolvimento motor, intelectual e comportamental e do aprendizado, entre outros (GAMBA, 2000).

Em vários estudos brasileiros, a rubéola no período gestacional apresenta uma freqüência significativa na determinação da etiologia da deficiência auditiva. Freqüências de 23,6%, 5,8% e 4,7% foram encontradas, respectivamente, por CECATTO et al. (2003); BUTUGAN et al. (2000) e SALERNO et al. (1985). Na Arábia Saudita, apenas 2,6% (8/302) apresentaram rubéola durante a gestação (ZAKZOUK e AL-ANAZY, 2002). No presente estudo, 12,2% (19/156) relataram suspeita de rubéola ou rubéola confirmada no período

da gestação. Esse dado mostra grande variação entre os estudos, que deve depender, entre outros fatores, do tipo de seleção dos afetados.

Numa frequência de 8,8% (3/34), os deficientes auditivos do presente estudo, homocigotos para a mutação *35de/G*, apresentaram a suspeita da rubéola na gestação como fator pré-natal. Um heterocigoto para a mutação *35de/G* (4,17%; 1/24) também apresentou, como fator pré-natal, a suspeita de rubéola na gestação. Essa suspeita pode, muitas vezes, ter sido levantada pela presença de leve alteração da temperatura corporal ou aparecimento de pequenas manchas avermelhadas no rosto e região do colo. Entretanto, muitas mulheres contraem a doença sem tomarem conhecimento dela e casos como esses acabam sendo, muitas vezes, considerados de etiologia desconhecida.

Dos deficientes auditivos do presente estudo, homocigotos para a mutação *35de/G*, 5,9% (2/34) apresentaram um outro tipo de fator pré-natal, a toxoplasmose na gestação. Um heterocigoto para a mutação *35de/G* também apresentou como fator pré-natal, a toxoplasmose na gestação (4,17%; 1/24). Esta infecção materna não obrigatoriamente é transmitida para o feto, sendo que segundo DINIZ (2000), a taxa de transmissão aproxima-se de 40% e é inversamente relacionada ao tempo de gestação no qual a infecção ocorreu, comprometendo freqüentemente o sistema nervoso central.

Em toda a amostra de afetados do presente estudo, a frequência de deficientes auditivos com histórico de toxoplasmose foi de 4,5% (7/156). No Brasil, BUTUGAN et al. (2000) encontrou uma frequência de 1,9% (3/154) com história de toxoplasmose na gestação, que não difere da registrada no presente estudo (teste exato de Fisher; $p > 0,20$). Na Arábia Saudita, ZAKZOUK e AL-ANAZY

(2002) encontraram uma frequência de 1,3% (4/302), que comparada com a do presente estudo mostrou valor de p no limite da significância (teste exato de Fisher; $p = 0,054$).

Assim sendo, cabe aqui ressaltar, como já foi exposto anteriormente que, na amostra do presente estudo, não foram excluídos os deficientes auditivos que apresentaram fatores ambientais em seu histórico, com exceção daqueles sindrômicos e com suspeita de deficiência auditiva que não fosse pré-lingual. Portanto, fica claro que nesta amostra de indivíduos com deficiência auditiva pré-lingual, 3,2% (5/156) são homozigotos para a mutação *35delG* e apresentaram um fator de risco pré-natal significativo. Caso tivessem sido excluídos da amostra que seria posteriormente analisada geneticamente, continuariam sendo caracterizados como deficientes auditivos com causa supostamente desconhecida.

Dentre os fatores peri-natais, podemos destacar a prematuridade e o baixo peso ao nascimento. A referência utilizada é a sugerida pelo *Joint Committee on Infant Hearing* (2000), sendo considerado baixo, o peso inferior a 1500g. O crescimento fetal é resultado de uma interação entre o potencial de crescimento (fatores fetais) e fatores de suporte de crescimento que são os maternos, placentários e ambientais (ESPERIDIÃO, 2000).

No presente estudo, 10,9% (17/156) dos deficientes auditivos apresentaram estes indicadores, representando 48,6% dos IRDA peri-natais (17/35). Estes fatores foram relatados para três homozigotos *35delG* (8,8%; 3/34) e três heterozigotos (12,5%; 3/24). SALERNO et al. (1985) encontraram uma frequência alta (57,9%; 11/19) destes indicadores entre os demais do período peri-natal, assim como MANFREDI e SANTOS (2002), que encontraram

freqüência de 50% de recém nascidos com o indicador de baixo peso ao nascimento, e 83,3%, apresentando prematuridade. BUTUGAN et al (2000) encontraram uma freqüência de 40,91% (63/154) de fatores peri-natais como prováveis etiologias, sendo que 31 destes casos apresentaram baixo peso ao nascimento e prematuridade (49,2%; 31/63). Embora a prematuridade isolada não represente risco potencial para a deficiência auditiva, acredita-se que alguns achados em estudos brasileiros refletem a realidade do sistema de atenção à saúde da gestante e do recém-nascido nas maternidades do Sistema Único de Saúde (SUS), como determinantes para altas freqüências de IRDA peri-natais.

Dentre os IRDA pós-natais mais relevantes, encontra-se a meningite e a medicação ototóxica, que caracterizariam a deficiência auditiva, mesmo que pré-lingual, em deficiência auditiva adquirida. A freqüência da ocorrência de meningite em estudos brasileiros foi relatada como igual a 33,3% (SALERNO et al., 1985) e a 8,4% (BUTUGAN et al., 2000; CECATTO et al., 2003). Na Arábia Saudita, ZAKZOUK e AL-ANAZY (2002) identificaram uma freqüência de 6,3% (19/302). O presente estudo apresentou uma freqüência de ocorrência da meningite de 8,9% (14/156), considerando-se dois deficientes auditivos heterozigotos para a mutação *35delG*, sendo que um teve suspeita de meningite e o outro contraiu a doença (8,3%; 2/24).

O uso excessivo de drogas ototóxicas, principalmente antibióticos aminoglicosídeos para o tratamento de broncopneumonias, pode causar a deficiência auditiva, e também é descrito com relevância na literatura. No Brasil, CECATTO et al. (2003) mostraram uma freqüência de 3% (4/131) e MANFREDI e SANTOS (2002) e SALERNO et al. (1985) descreveram freqüências similares de

21,7% e 22,3%, respectivamente. No presente estudo, a informação quanto ao uso de tal medicação foi obtida pelo relato da pessoa entrevistada, na maioria dos casos, a mãe da criança afetada, não sendo comprovado o uso da medicação em relatório médico. A frequência encontrada foi de 8,9% (14/156), representada por cinco homozigotos para a mutação *35de/G* (14,7%; 5/34), dois heterozigotos (8,3%; 2/24) e sete homozigotos selvagens (7,1%; 7/98).

Cabe ressaltar aqui que, embora a administração dos medicamentos ototóxicos possa ultrapassar 10 ou mais dias, existe uma preocupação dos profissionais que atuam em UTIs neonatais ou berçários de alto risco, em relação a este tempo, de modo que, muitas vezes, essa administração é interrompida no 10º dia. A troca da medicação é uma alternativa, mas em casos críticos, como a pneumonia, a manutenção do ototóxico é mantida.

A etiologia desconhecida da deficiência auditiva ainda representa uma frequência relativamente alta em muitas populações. Atualmente, com o avanço dos testes genéticos para identificação das mutações mais comuns, relacionadas à deficiência auditiva, espera-se diminuir a angústia de muitos pais e a insatisfação de muitos profissionais da saúde que tratam do deficiente auditivo. Para 75 deficientes auditivos, cuja etiologia era desconhecida, LONGHITANO e BRUNONI (2000) conseguiram supor, por meio das informações obtidas em entrevistas, uma causa genética (33%; 75/228). No presente estudo, foi possível identificar a causa genética em 34 homozigotos para *35de/G* e em 2 heterozigotos compostos nos 156 afetados estudados (23,1%). Para 11 desses 36 afetados (30%), não havia sido registrada nenhuma informação que levasse a supor provável etiologia, representando 7% da amostra total. Também pode se supor

etiologia genética na grande maioria dos 19 heterozigotos simples, nos quais ainda não se detectou outra mutação.

Outros estudos, como os de SALERNO et al. (1985), BUTUGAN et al. (2000) e de DUARTE e SILVA (1997), encontraram uma frequência de deficiência auditiva com suposta etiologia desconhecida de, respectivamente, 8,7%, 19,4% e 45,5%. Na Arábia Saudita também foi suposta a frequência de 21,2% (64/302) de deficientes auditivos com etiologia desconhecida (ZAKZOUK e AL-ANAZY, 2002).

Entre os homozigotos selvagens, identificados no presente estudo, 10 (6,4%) não apresentam nenhum IRDA relatado.

É importante ressaltar que os números que aparecem vinculados à causa hereditária da deficiência auditiva, em todas essas pesquisas, podem ser subestimados dos valores reais, pois a maioria dos casos tidos como de etiologia desconhecida consiste, provavelmente, de formas autossômicas recessivas. A etiologia obscura associa-se geralmente aos casos esporádicos de deficiência auditiva, que formam uma parcela substancial de todo o universo dos deficientes auditivos. DUARTE e SILVA (1997) afirmam que esses casos criam problemas especiais para o aconselhamento genético.

6.4 SUSPEITA E DIAGNÓSTICO DA DEFICIÊNCIA AUDITIVA

As conseqüências da deficiência auditiva incluem a incapacidade para interpretar sons de fala, com freqüente redução da habilidade para a comunicação, atraso na aquisição de linguagem, desvantagens econômicas e educacionais, isolamento social e estigmatização (MATHERS; SMITH; CONCHA,

2000). De acordo com o Censo realizado em 2000, a incidência de deficiência auditiva na população brasileira, em geral, foi de 16,7% (IBGE, 2007).

No Brasil, a idade média do diagnóstico da deficiência auditiva pré-lingual está em torno de três a quatro anos, podendo levar até dois anos para ser concluído, acarretando danos irreparáveis para a criança, além de onerar custos para a sociedade.

PÁDUA et al. (2005) citam o trabalho desenvolvido por NÓBREGA (1994; 2004), o qual concluiu que a confirmação diagnóstica até os dois anos de idade ocorreu apenas em 13% dos deficientes auditivos estudados, embora 56% tenham sido suspeitados nesta fase, resultando em um tempo perdido de mais de dois anos entre a suspeita clínica e a confirmação da deficiência.

No presente estudo, a idade de suspeita da deficiência auditiva pela família mostrou uma variação de 3 a 84 meses, com média entre 16 a 21 meses, considerando-se dois EP. CECATTO et al. (2003) observaram dois picos de idade de suspeita: um de 8 a 10 meses, e o outro de 12 a 24 meses. Estes achados correspondem a uma faixa etária muito tardia para proporcionar o desenvolvimento adequado, pois como comprovado pelo estudo de YOSHINAGA-ITANO (1998), a detecção de alterações auditivas e a intervenção (estimulação auditiva e/ou protetização) iniciadas até seis meses de idade garantem à criança um desenvolvimento de linguagem (receptiva e expressiva), bem como o seu desenvolvimento social, comparáveis aos das crianças normais da mesma faixa etária. BUTUGAN et al (2000) encontraram uma freqüência de 38,9% (60/154) de deficientes auditivos que foram diagnosticados até os seis meses e 51,2% (79/154) até os 12 meses.

A média de idade, obtida no presente estudo, para o diagnóstico da deficiência auditiva, com base em dois EP vai de 26 a 32 meses. Houve uma correlação positiva, conforme seria esperado, entre as idades de suspeita e diagnóstico da deficiência auditiva ($r = 78\%$). As médias, tanto da suspeita, quanto do diagnóstico da deficiência, foram comparadas entre os diferentes genótipos com relação à mutação *35delG*, e não foi encontrada nenhuma diferença estatisticamente significativa, como mostra a Tabela 13.

Cabe aqui relatar que, em cinco das nove famílias do presente estudo, com recorrência da deficiência auditiva em irmãos, tanto a idade de suspeita da deficiência auditiva, bem como a idade do diagnóstico do segundo afetado, foram anteriores à do primeiro. Isso reflete uma maior percepção e conscientização dos pais quanto às conseqüências da deficiência auditiva para o desenvolvimento da criança, além de terem sido estimulados, pelos profissionais das escolas onde o primeiro filho afetado já freqüentava, a investigar mais precocemente a possibilidade do segundo filho também ser portador da mesma deficiência, assim que tivesse ocorrido a suspeita. Nas demais quatro famílias, a época de diagnóstico, referente ao segundo filho afetado não foi anterior à do primeiro.

A detecção precoce da deficiência auditiva tornou-se uma prioridade nos EUA desde 1990. O Centro Nacional de Deficiência Auditiva Infantil, Marion Downs (Marion Downs National Center for Infant Hearing) no Colorado, mantido pelo Serviço Público Americano de Saúde, tem como objetivo coordenar a implantação da Triagem Auditiva Neonatal Universal (TANU) em vários estados americanos, priorizando a triagem auditiva, o diagnóstico e a intervenção da deficiência auditiva. É proposto que o diagnóstico seja feito até os três meses de

idade e que a intervenção (protetização e habilitação auditiva) seja iniciada até os seis meses de idade.

Este assunto tem sido tema de reflexão e discussão de profissionais e pesquisadores brasileiros. O Grupo de Apoio à Triagem Auditiva Neonatal Universal (GATANU – www.gatanu.org) procura divulgar e padronizar a TANU em programas desenvolvidos em maternidades de todo o Brasil.

6.5 SINAIS EXTRA-AUDITIVOS

Em muitos estudos, a ocorrência da deficiência auditiva juntamente com outros sinais extra-auditivos, em portadores de mutações no gene *GJB2*, pode ser considerada apenas como uma observação sem maior aprofundamento. Existem especulações de que a perda de função do gene *GJB2* poderia contribuir para outros fenótipos, que não sejam a deficiência auditiva. Por trás desta visão, KELSELL et al. (2001) comentam sobre o que tem sido chamado de “código conexina”. Este amplo espectro de tipos celulares que utilizam as conexinas na comunicação intercelular, além dos diferentes arranjos de conexinas em uma complexa rede de conexons, ainda não está bem explicado. ROUAN et al. (2001) sugerem um efeito dominante negativo da mutação da conexina 26 sobre a expressão da conexina 43, a partir de estudos realizados *in vitro*, e esta interferência tem sido proposta como patogênica, quanto ao envolvimento da pele em indivíduos portadores de mutações no gene *GJB2*.

No presente estudo, foram investigados sinais extra-auditivos relacionados às displasias ectodérmicas, ou seja, distúrbios em pêlos (ou cabelos), dentes,

unhas e sudorese. Cabe ressaltar que estes sinais não foram investigados clinicamente, sendo apenas registradas as informações obtidas na anamnese.

A presença de sinais que podem caracterizar uma displasia ectodérmica ocorreu em 12,8% (20/156) da amostra de deficientes auditivos (Tabela 14).

Três homozigotos para a mutação *35delG*, classificados como pertencentes ao grupo B das displasias ectodérmicas, apresentam como sinal o aparecimento prematuro de cabelos brancos, espalhados em toda a região do couro cabeludo ou em apenas uma parte dele, o que pode ser denominado de canície prematura. A canície prematura é um traço que pode ter muitas causas, podendo ser um dos traços das síndromes de Book, de Waardenburg e de Lison ou em sua forma simples de aparecimento pode ter um padrão de herança dominante (OMIM; ENTREZ, 2007 - %139100). Cabe ressaltar que, no presente estudo, não foi investigada a presença dessa característica nos genitores dos afetados.

Alterações nos dentes e unhas também foram observadas em outros dois homozigotos para a mutação *35delG*, sendo que em uma das famílias ocorre recorrência do sinal no irmão e na mãe, conforme informação dada na anamnese. Um afetado heterozigoto para a mutação *35delG*, pertencente ao grupo A das displasias ectodérmicas, desperta certa curiosidade por apresentar três sinais clínicos, em pêlos, dentes e unhas.

Questionamentos podem surgir quanto à classificação destes casos dentro do universo das síndromes, por apresentarem um conjunto de sinais, mas considerando a hipótese do “código conexina”, comentado por KELSELL et al. (2001) e a necessidade de mais pesquisas nesta área, este estudo sugere uma

futura investigação clínica e genética destes indivíduos, principalmente quanto aos heterozigotos que apresentaram esses sinais ectodérmicos, na tentativa de encontrar o outro alelo mutado, seja no gene *GJB2* ou em outro gene relacionado à deficiência auditiva, como o *GJB1* ou o *GJB3*. Parece razoável o comentário de GUALANDI et al. (2002) quanto ao fato de que mutações no gene *GJB2* possam contribuir para fenótipos clínicos associados à deficiência auditiva, com a mutação afetando um componente celular específico de outras conexinas e/ou a expressão de outros genes interagindo com o gene *GJB2*.

6.6 AVALIAÇÃO AUDIOLÓGICA

Apesar do gene *GJB2* ter um importante papel na deficiência auditiva não-sindrômica, somente poucos estudos descrevem as características clínicas associadas à perda auditiva em detalhes. Muitos pesquisadores, que já investigaram a prevalência da mutação *35delG*, têm mostrado interesse em verificar a relação entre o genótipo e o fenótipo.

No presente estudo, a avaliação audiológica, realizada nos deficientes auditivos, constituiu-se de procedimentos que investigaram possíveis alterações desde a orelha média até o córtex.

Apesar dos estudos realizados no exterior não citarem a realização das medidas de imitância acústica, como parte da avaliação audiológica dos afetados, trata-se de um procedimento clínico rotineiro, com exceção dos casos em que não é indicado pelo médico otorrinolaringologista. A timpanometria, como primeira medida a ser avaliada, consiste em expressar, por meio de um gráfico, a facilidade

com a qual a energia sonora flui através de um sistema que pode, ou não, oferecer uma oposição ao fluxo dessa energia. Sendo assim, os resultados da timpanometria foram normais para 90 dos 95 deficientes auditivos, caracterizando um sistema tímpano-ossicular que não impediu a passagem da energia sonora. As alterações registradas em cinco deficientes auditivos, sendo um deles heterozigoto para a mutação *35delG*, como mostra a Tabela 31, não prejudicaram a análise dos resultados dos demais procedimentos realizados, pois o dado isolado de complacência da membrana timpânica não tem valor diagnóstico.

A medida do reflexo acústico, bem como a sua interpretação, constitui uma das técnicas diagnósticas mais importantes em audiologia clínica. O músculo do estapédio, com inserção num dos ossículos da orelha média, contrai-se bilateralmente na presença de um som suficientemente forte. O limiar do reflexo acústico, obtido por meio desta medida, é a menor intensidade pela qual ocorre a contração deste músculo, agindo como um efeito protetor à entrada de energia sonora muito intensa para a orelha interna. Para desencadear este reflexo em indivíduos com audição normal, o valor mínimo necessário de intensidade varia de 70 a 100 dBNA. Portanto, não fica difícil entender porque 91 deficientes auditivos, do presente estudo, apresentaram reflexos acústicos ausentes, tanto contralateral quanto ipsilateralmente, pois sendo portadores de perda auditiva de grau severo a profundo, nem a intensidade máxima do equipamento (120 dBNA) foi possível de ser captada. Somente um deficiente auditivo, homozigoto selvagem, teve reflexos acústicos presentes, tanto contralateral quanto ipsilateralmente, nas quatro frequências analisadas em ambas as orelhas, pois a perda auditiva é de grau leve.

A audiometria tonal liminar (ATL) é um procedimento comportamental padronizado para descrever a sensibilidade auditiva. Segundo o *American National Standards Institute* (ANSI) S3.20-1973, o nível mínimo de pressão sonora de um sinal acústico que produz sensação auditiva, é definido como sendo o limiar de audibilidade. Esta avaliação foi realizada em 102 deficientes auditivos do presente estudo.

Para obtenção do grau de perda auditiva, deve ser obtida uma média dos limiares tonais, de apenas três frequências das oito pesquisadas, classificadas em graves, médias e agudas. O diagnóstico audiológico utilizado para o presente estudo baseou-se nas recomendações do grupo GENDEAF (MAZZOLI et al., 2003) para a classificação do grau e da configuração da perda auditiva, conforme descrito no Material e Métodos.

As distribuições das categorias de diagnóstico audiológico, adotadas no presente estudo (Apêndice 5), não diferiram estatisticamente entre os três genótipos para a mutação *35delG*, em ambas as orelhas, como mostram as Tabelas 20 e 21. As médias tonais da melhor orelha, obtidas nas frequências de 500, 1K e 2KHz, não foram estatisticamente diferentes entre os três genótipos para a mutação *35delG*, como mostra a Tabela 27.

Considerando os 39 deficientes auditivos, homozigotos e heterozigotos para a *35delG* (Tabela 26), 5,1% tiveram grau leve de perda auditiva; 10,3%, grau moderado; 23,1%, grau severo e 61,5% grau profundo. Dentre os 25 homozigotos *35delG*, o grau severo e profundo de perda auditiva foi 88,0%, concordando com os achados de GUALANDI et al. (2002) e HISMI et al. (2006).

Três homozigotos *35delG* apresentaram perda auditiva de grau moderado, sendo que dois deles tiveram em seu histórico, vários IRDA. O terceiro homozigoto tem genitores consangüíneos, além da recorrência da deficiência auditiva em outros consangüíneos mais distantes, pertencentes a outras gerações. Um quarto deficiente auditivo, também homozigoto *35delG*, apresentou curva audiométrica em forma de “U”, apesar do grau da perda auditiva ser severo. Esta pequena parcela da amostra de homozigotos *35delG*, do presente estudo, (16%; 4/25), reflete uma tendência da heterogeneidade fenotípica deste genótipo, também encontrada por DENOYELLE et al. (1999) e MURGIA et al. (1999). Acredita-se que variações no quadro clínico, entre indivíduos que possuem o mesmo genótipo, são freqüentemente encontradas, e poderiam estar relacionadas com o envolvimento de genes modificadores e fatores ambientais, ou até mesmo, alterações na região promotora do gene em questão.

O gráfico mostrado na Figura 14, ilustra a ausência de correlação entre o genótipo quanto à mutação *35delG* e as médias tonais, quando se consideram os 91 deficientes auditivos não consangüíneos. Entretanto, as médias tonais de irmãos afetados, pertencentes a oito famílias (Tabela 25), mostraram correlação positiva de 79% (Figura 15). Levando-se em conta que não houve correlação entre médias tonais, quando se analisaram 91 afetados não relacionados, sugere-se a influência de genes modificadores, levando à semelhança dessa característica entre irmãos.

Com relação a dados de correlação entre genótipo e fenótipo em deficientes auditivos não consangüíneos, alguns estudos sugerem uma correlação entre o tipo de mutação cosegregando com a mutação *35delG* nos heterozigotos e

a severidade da perda auditiva, quando comparada com os homozigotos *35de/G*. A patogenicidade destas mutações pode depender da natureza da substituição, bem como da posição da alteração resultante na proteína, o que comprovaria o fato de que certas classes de perda auditiva ocorreriam significativamente mais freqüentemente em associação com certos genótipos, sugerindo o envolvimento de fatores ambientais ou genes modificadores, ou ambos (JANECKE et al., 2002; CRYNS et al., 2004; SNOECKX et al., 2005).

No presente estudo, não foi encontrada diferença estatisticamente significativa, dos quatro tipos de configurações audiométricas (plana, descendente, ascendente e curva em “U”) entre os três genótipos para a mutação *35de/G* (Tabela 28). A distribuição de configuração audiométrica do presente estudo não diferiu estatisticamente ($\chi^2_{(3)} = 1,80$; $p = 0,70$) da encontrada no estudo de HISMI et al. (2006). Entretanto, diferiu significativamente da relatada por LIU et al. (2005), que encontraram a configuração descendente em 70,1% dos afetados, em comparação com 35,2% do presente estudo ($\chi^2_{(3)} = 41,7\%$; $p < 0,0001$).

A simetria da perda auditiva entre as orelhas analisadas no presente estudo foi encontrada em 87,9% (Tabela 29), concordando com os achados de SNOECKX et al. (2005), que encontraram 90,0%.

Poucos estudos relatam sobre o fenótipo da deficiência auditiva em heterozigotos compostos para os genes *GJB2* e *GJB6*. Quanto aos dois heterozigotos compostos para as deleções do gene *GJB6* do presente estudo, não foi possível fazer comparação pois o heterozigoto portador da deleção $\Delta(GJB6-D13S1830)$ realizou apenas a timpanometria e a pesquisa do PEATE, a qual

apresentou ausência de resposta bilateralmente, sugerindo deficiência auditiva neurossensorial de grau severo a profundo, o que pode revelar similaridade com os achados de BOLZ et al. (2004) e SNOECKX et al. (2005).

SNOECKX et al. (2005) encontraram grau de perda auditiva ainda mais profundo em heterozigotos compostos do que em homozigotos *35de/G*, sugerindo que, se o gene *GJB6* substitui parcialmente a função do gene *GJB2* na orelha interna, já que ambas as conexinas podem se unir para formar canais heterotípicos de junções *gap*, esta substituição seria, então, menos eficiente nesses casos.

O heterozigoto composto para a deleção $\Delta(GJB6-D13S1854)$ apresentou deficiência auditiva de grau profundo bilateralmente, com configuração levemente descendente. Não foi encontrado nenhum estudo sobre o fenótipo da deficiência para esta deleção, mas acredita-se que a hipótese do elemento regulatório também poderia ser considerada, a qual aboliria a expressão do gene *GJB2* e inativaria um alelo do gene *GJB6*.

Os 71 afetados não consangüíneos que realizaram a pesquisa de EOE apresentaram ausência de resposta bilateralmente. Destes, 24 são homozigotos e heterozigotos para *35de/G*. Estes achados comprovam a perda de funcionalidade das células ciliadas externas, muito provavelmente devido ao inadequado potencial endolinfático da orelha interna, em conseqüência da mutação na Cx26.

Dos 25 homozigotos *35de/G* que realizaram a pesquisa do PEATE, 22 têm ausência de resposta bilateralmente a 90dB. Uma freqüência similar à de homozigotos *35de/G* do presente estudo (12,0%; 3/25), que apresentaram

presença na pesquisa do PEATE, seja em uma orelha ou simetricamente, foi identificada no estudo de ENGEL-YEGER et al. (2003), cuja freqüência foi de 10,5% (2/19). Estes achados mostram evidências de não funcionalidade, tanto das células ciliadas externas como das internas e fibras do nervo auditivo (VIII par craniano).

Quanto aos heterozigotos para a mutação *35de/G* do presente estudo, somente dois, dos 17 que realizaram a pesquisa do PEATE, apresentaram presença de latências normais no PEATE, em pelo menos uma orelha, compatível com o grau severo da deficiência auditiva em ambos. ENGEL-YEGER et al (2003) relatam ter encontrado tanto presença de latências alteradas, como ausência de respostas do PEATE para heterozigotos *35de/G*, mas não foi possível comparar os achados.

6.7 COMENTÁRIOS FINAIS

Os achados do presente estudo confirmam que a mutação *35de/G* tem extrema importância relacionada à deficiência auditiva não-sindrômica autossômica recessiva. Este importante papel da Cx26 enfatiza a necessidade de melhor compreensão da relação genótipo-fenótipo em indivíduos afetados, o que favoreceria o aconselhamento genético desta população. FRANZÉ et al (2005) afirmam que seria importante ampliar o estudo da relação genótipo-fenótipo para indivíduos portadores da mutação *35de/G* com suposta audição normal, como os genitores dos deficientes auditivos homozigotos para a mutação. Os autores encontraram limiares auditivos alterados nas freqüências agudas, acima de

4000Hz, em portadores da mutação *35delG*, com diferença estatisticamente significativa ($p < 0,0001$), comparados aos limiares auditivos das mesmas frequências, em indivíduos sem a mutação.

Pode-se considerar que o objetivo do presente estudo foi conquistado, sendo possível identificar a causa genética em 34 homozigotos para *35delG* e em 2 heterozigotos compostos nos 156 afetados estudados (23,1%).

A disfunção coclear, marcadamente presente nos homozigotos da presente amostra, está em concordância com os achados de um estudo histopatológico sobre a patogênese da deficiência auditiva, o qual demonstra anormalidades nas células ciliadas externas, estria vascular e membrana tectorial, e preservação das células do gânglio espiral (JUN et al., 2000). Isto vem reforçar a alta taxa de sucesso, encontrada para os deficientes auditivos portadores da mutação *35delG*, com relação à adaptação de implantes cocleares (GREEN et al., 2002; DAHL et al., 2003). Estes estudos concluíram que o deficiente auditivo, com mutação *35delG*, apresenta melhor discriminação da fala comparada a de outros deficientes auditivos, cuja causa da deficiência não é genética, como a meningite e a ototoxicidade, que lesam a estrutura física da cóclea, impedindo a adaptação apropriada do implante.

Com a descoberta de tantas mutações no gene *GJB2*, segregando em diversas populações do mundo inteiro, médicos geneticistas precisam estar preparados para responder a possíveis diagnósticos pré-natais para a deficiência auditiva. Frente a uma postura ética deverão considerar, por um lado, a qualidade de vida que uma criança deficiente auditiva pode ter desde que tenha uma intervenção precoce adequada, com a utilização de aparelhos de amplificação

sonora ou implantes cocleares e, por outro lado, a severidade do problema auditivo. Enquanto isso, esforços estão sendo feitos, paralelamente, quanto à regeneração das células sensoriais da orelha interna (IZUMIKAWA et al., 2005).

Cabe aqui ressaltar que, o seguimento deste estudo terá como prioridade a realização do seqüenciamento direto do gene *GJB2*, nos heterozigotos para a mutação *35delG* e homozigotos selvagens com indicação de fatores genéticos e sem relato de fator de risco ambiental, com o propósito de melhor esclarecer a etiologia da deficiência auditiva, bem como a relação genótipo-fenótipo.

7. CONCLUSÃO

O presente estudo analisou 144 deficientes auditivos não consangüíneos, portadores de deficiência auditiva neurossensorial bilateral, pré-lingual, não-sindrômica. Dessa amostra, não foram excluídos aqueles com relato de fatores ambientais sugestivos quanto à etiologia da deficiência. A mutação *35delG* do gene *GJB2* foi detectada em 29 afetados homozigotos (20,1%) e em 21 heterozigotos (14,6%), sendo que essa mutação está distribuída em 18 casos familiares (45,0%; 18/40) e em 32 casos esporádicos (30,8%; 32/104).

A freqüência de consangüinidade entre os genitores dos deficientes auditivos homozigotos para *35delG* foi de 37,5% (3/8), sendo de 5,6% na amostra total.

Entre os 21 deficientes auditivos heterozigotos para a mutação *35delG*, foram encontrados dois heterozigotos compostos para os genes *GJB2* e *GJB6*, sendo um para a deleção $\Delta(GJB6- D13S1830)$ e o outro para a deleção $\Delta(GJB6- D13S1854)$, cada um deles com a freqüência de 4,8% (2/21).

Considerando-se a casuística de 156 deficientes auditivos, que inclui deficientes auditivos consangüíneos, foi possível identificar a causa genética em 34 homozigotos para *35delG* e em 2 heterozigotos compostos (23,1%). Para 11 desses 36 afetados (31%), não havia sido registrada nenhuma informação que levasse a supor a provável etiologia da deficiência, representando 7% da amostra total.

A presença de sinais extra-auditivos relacionados às displasias ectodérmicas, em uma pequena parcela da amostra de deficientes auditivos com a

mutação *35de/G* (7 homozigotos e um heterozigoto), sugere a necessidade de uma investigação clínica e genética mais criteriosa nesse grupo.

A relação entre genótipo e fenótipo da deficiência auditiva não revelou diferenças estatisticamente significativas com relação à severidade entre os três genótipos quanto à mutação *35de/G*. Os homozigotos *35de/G* apresentaram uma média tonal de 94 dBNA, que caracteriza perda auditiva de grau severo, quase profundo. Os heterozigotos *35de/G* apresentaram uma média tonal de 89 dBNA, também caracterizando um grau severo de perda auditiva.

O presente estudo confirmou a importância do papel da mutação *35de/G* para a deficiência auditiva não-sindrômica e ressalta a importância da utilização de protocolos de triagem genética, que incluam a mutação *35de/G* do gene *GJB2* e as deleções $\Delta(GJB6-D13S1830)$ e $\Delta(GJB6-D13S1854)$ do gene *GJB6*. A detecção precoce dessas mutações, em recém nascidos portadores de deficiência auditiva, auxilia na intervenção reabilitativa, uma vez que a deficiência auditiva provocada por conexinas alteradas pode ser compensada com a utilização de aparelhos de amplificação sonora ou de implantes cocleares, para o benefício da criança em seu desenvolvimento quanto à comunicação e cognição.

8. REFERENCIAS

ABE, S. et al. Prevalent connexin 26 (*GJB2*) mutations in Japanese. **J Med Genet.**, v. 37, p. 41-43, 2000.

AGOSTINI, J. M.; MEIRELLES-NASSER, C. Consanguineous marriages in the archdiocese of Florianópolis, South Brazil. **Rev Bras Genet**, v. 9, p. 479-486, 1986.

AMERICAN NATIONAL STANDARDS INSTITUTE. American National Standard Psychoacoustical Terminology. ANSI S3.20-1973 (R 1986), New York.

BAROCH, K. A. Universal newborn hearing screening: fine-tuning the process. **Curr Opin Otolaringol Head Neck Surg**, v. 11, p. 424-427, 2003.

BATISSOCO, A. C. **Mutações nos gene *GJB2* e *GJB6* em indivíduos com deficiência auditiva.** São Paulo, 2006. 103 f. Dissertação (Mestrado em Ciências-Área de Genética) – Instituto de Biociências-Departamento de Genética e Biologia Evolutiva da Universidade de São Paulo.

BESS, F. H.; HUMES, L. E. **Fundamentos de Audiologia.** 2. ed. Porto Alegre: Editora Artmed, 1998.

BOLZ, H. et al. Phenotypic variability of non-syndromic hearing loss in patients heterozygous for both c.35delG of *GJB2* and the 342-Kb deletion involving *GJB6*. **Hear Res**, v. 188, p. 42-46, 2004.

BRAGA, M. C. C. **Cálculo de riscos em doenças geneticamente heterogêneas: desenvolvimento de método a aplicação no caso da surdez congênita.** São Paulo, 1998. Dissertação (Mestrado em Biociências) - Instituto de Biociências, Departamento de Biologia, Universidade de São Paulo.

BROWN, K.A. et al. Linkage studies of non-syndromic recessive deafness (NSRD) in a family originating from the Mirpur region of Pakistan maps DFNB1 centromeric to D13S175. **Hum Mol Genet**, v. 5, n. 1, p. 169-73, 1996.

BRUZZONE R. et al. Loss-of-function and residual channel activity of connexin 26 mutations associated with non-syndromic deafness. **FEBS Lett.**, v. 533, p. 79-88, 2003.

BUDOWLE, B. et al. Analysis of the VNTR locus DIS80 by the PCR followed by high-resolution PAGE. **Am J Hum Genet**, v. 48, p. 137-144, 1991.

BUTUGAN, O. et al. Diagnóstico precoce da deficiência auditiva no primeiro ano de vida das crianças com alto risco através de audiometria de tronco cerebral. **Pediatria**, v. 22, n. 2, p. 115-122, 2000.

CALZOLARI, E.; SENSI, A. The diagnostic approach to syndromal hearing loss. In: MARTINI, A.; READ, A.; STEPHENS, D. **Genetics and Hearing Impairment**. London: Whurr Publishers Ltd, 1996. p. 117-129.

CALZOLARI, E.; SENSI, A.; GUALANDI, F. Protocol for syndromal disorders associated with hearing impairment. In: MARTINI, A.; MAZZOLI, M.; STEPHENS, D.; READ, A. **Definitions, Protocols and Guidelines in Genetic Hearing Impairment**. London: Whurr Publishers Ltd, 2001. p. 50-71.

CARRASQUILLO, M. M. et al. Two different connexin 26 mutations in an inbred kindred segregating non-syndromic recessive deafness: implications for genetics studies in isolated populations. **Hum Molec Genet**, v. 6, p. 2163-2172, 1997.

CASTRO JUNIOR, N. P.; FIGUEIREDO, M. S. Audiometria Eletrofisiológica. In: LOPES FILHO, O. C. **Tratado de Fonoaudiologia**. São Paulo: Editora Roca, 1997. p. 201-220.

CECATTO, S. B. et al. Análise das principais etiologias de deficiência auditiva em Escola Especial "Anne Sullivan". **Rev Bras Otorrinolaringol**, v. 69, n. 2, p. 235-240, 2003.

CHANG, E. H.; VAN CAMP, G.; SMITH, R. J. H. The role of connexins in human disease. **Ear Hear**, v. 24, n. 4, p. 314-323, 2003.

CHOUNG, Y. H.; MOON, S. K.; PARK, H. J. Functional study of *GJB2* in hereditary hearing loss. **Laryngoscope**, v. 112, n. 9, p. 1667-1671, 2002.

CRYNS K. et al. A genotype-phenotype correlation for *GJB2* (connexin26) deafness. **J Med Genet**, v. 41, p. 147-54, 2004.

DAHL, E. et al. Molecular cloning and functional expression of mouse connexin-30, a *gap* junction gene highly expressed in adult brain and skin. **J Biol Chem**, v. 271, p. 17903-17910, 1996.

DAHL, H. H. et al. Language and speech perception outcomes in hearing-impaired children with and without connexin 26 mutations. **Audiol Neurotol**, v. 8, p. 263-268, 2003.

DALAMÒN, V. et al. Prevalence of *GJB2* mutations and the del (*GJB6-D13S1830*) in Argentinean non-syndromic deaf patients. **Hear Res.**, v. 207, p.43-49, 2005.

DALE, P. et al. **Neuroscience**. 2nd ed. Sunderland, MA: Sinauer Associates, Inc., 2001. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>> Acesso em: 15 nov. 2005.

D'ANDREA P. et al. Hearing loss: frequency and functional studies of the most common connexin 26 alleles. **Biochem Biophys Res Commun.**, v. 296, p. 685-91, 2002.

DAVIS, A.; PARVING, A. Towards appropriate epidemiology data on childhood hearing disability: a comparative European study of birth-cohorts 1982-1988. **J. Audiol Medic**, v. 3, p. 35-47, 1994.

DE BASSI, R. A.; FREIRE-MAIA, N. Marriage age and inbreeding in Curitiba, Southern Brazil. **Rev Bras Genet**, v. 8, p. 199-203, 1985.

DEL CASTILLO I. et al. A deletion involving the connexin 30 gene in nonsyndromic hearing impairment. **N Engl J Med**, v. 346, n. 4, p. 243-49, 2002.

DEL CASTILLO I. et al. Prevalence and evolutionary origins of the (*GJB6-D13S1830*) mutation in the *DFNB1* locus in hearing-impaired subjects: a multicenter study. **Am J Hum Genet**, v. 73, p. 1452-58, 2003.

DEL CASTILLO F. J. et al. A novel deletion involving the connexin 30 gene, del (*GJB6-D13S1854*), found in trans with mutations in the *GJB2* gene (connexin 26) in subjects with *DFNB1* non-syndromic hearing impairment. **J Med Genet**, v. 42, p. 588-94, 2005.

DENOYELLE, F. et al. Prelingual deafness: high prevalence of a *30delG* mutation in the connexin 26 gene. **Hum Molec Genet**, v. 6, p. 2173-2177, 1997.

DENOYELLE, F. et al. Clinical features of the prevalent form of childhood deafness, *DFNB1*, due to a connexin 26 gene defect: implications for genetic counseling. **Lancet**, v. 17, n. 9161, p. 1298-1303, 1999.

DINIZ, E. M. A. Toxoplasmose Congênita. In: RUGOLO, L. M. S. S. **Manual de Neonatologia**. Rio de Janeiro: Editora Revinter, 2000. p. 254-260.

DUARTE, A. R.; SILVA, E. O. Causas de surdez pré-verbal em uma população institucionalizada, enfatizando a etiologia genética. **Jornal de Pediatria**, v. 73, n. 4, p. 239-243, 1997.

ENGEL-YEGGER, B. et al. Otoacoustic emissions and brainstem evoked potentials in compound carriers of connexin 26 mutations. **Hear Res**, v. 175, n. 1-2, p. 140-151, 2003.

ENTREZ search and retrieval system. Disponível em <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?db=Nucleotide> Acesso em novembro 2005.

ENTREZ search and retrieval system. Disponível em < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?CMD=search&DB=OMIM> > Acesso em fevereiro de 2007.

ERGOLE Informatique. **SPHINX LEXICA**. Le Sphinx Développement. Rio Grande do Sul, 1986-1996.

ESPERIDIÃO, S. Recém-nascido desnutrido intra-útero. In: RUGOLO, L. M. S. S. **Manual de Neonatologia**. Rio de Janeiro: Editora Revinter, 2000. p. 43-45.

ESTIVILL, X. et al. Connexin 26 mutations in sporadic and inherited sensorineural deafness. **Lancet**, v. 351, p. 394-398, 1998.

ESTIVILL, X.; GASPARINI, P.; LENCH, N. Connexin 26 (*GJB2*) deafness Homepage. Disponível em : <URL:<http://www.iro.es/cx26deaf.html>>. Acesso em: agosto de 2005.

FRANZÉ, A . et al. Audiometric evaluation of carriers of the connexin 26 mutation *35delG*. **Eur Arch Otorhinolaryngol**, v. 262, p.921-924, 2005.

FREI, K. et al. Connexin 26 mutations in cases of sensorineural deafness in eastern Áustria. **Eur J Hum Genet**, v. 10, p. 427-432, 2002.

FREI, K. et al. Screening for monogenetic *del(GJB6-D13S1830)* and digenic *del(GJB6-D13S1830)/GJB2* patterns of inheritance in deaf individuals from Eastern Austria. **Hear Res**, v. 196, p. 115-18, 2004.

FREI, K. et al. *GJB2* mutations in hearing impairment: identification of a broad clinical spectrum for improved genetic counseling. **Laryngoscope**, v. 115, p. 461-465, 2005.

FREIRE-MAIA, N. Ectodermal Dysplasias. **Hum Hered**, v. 21, p. 309-312, 1971.

FREIRE-MAIA, N.; PINHEIRO, M. **Displasias Ectodérmicas**: Manual para profissionais da área de saúde. Curitiba: Centro de Estudos de Displasia Ectodérmica (Universidade Federal do Paraná), 1984.

FRIEDMAN, T. et al. Modifier genes of hereditary hearing loss. **Curr Opin Neurobiol**, v. 10, p. 487-93, 2000.

FORGE, A. et al. Connexins and gap junctions in the inner ear. **Audiol Neurotol**, v. 7, p. 141-45, 2002.

GAMBA, L. H. Rubéola Congênita. In: RUGOLO, L. M. S. S. **Manual de Neonatologia**. Rio de Janeiro: Editora Revinter, 2000. p. 276-278.

GASPARINI, P. et al. Linkage of DFNB1 to non-syndromic neurosensory autosomal-recessive deafness in Mediterranean families. **Eur J Hum Genet**, v. 5, p. 83-88, 1997.

GASPARINI, P. et al. High frequency of the 35delG deafness mutation in European population. **Eur J Hum Genet**, v. 8, n. 1, p. 19-23, 2000.

GATANU. Grupo de Apoio à Triagem Auditiva Neonatal Universal. Disponível em < [http:// www.gatanu.org](http://www.gatanu.org) > Acesso em março de 2007.

GAZZAZ, B. et al. Autosomal recessive and sporadic deafness in Morocco: high frequency of the 35delG GJB2 mutation and absence of the 342Kb GJB6 variant. **Hear Res**, v. 210, p. 80-84, 2005.

GUALANDI, F. et al. Exploring the clinical and epidemiological complexity of GJB2-linked deafness. **Am J Med Genet**, v. 112, p. 38-45, 2002.

GUÉRIOS, R. F. M. **Dicionário etimológico de nomes e sobrenomes**. 3. ed. São Paulo: Editora Ave Maria Ltda, 1981.

GREEN, G. E. et al. Carrier rates in the mid-western United States for GJB2 mutations causing inherited deafness. **J Am Med Ass**, v. 281, p. 2211-2216, 1999.

GREEN, G. E. et al. Performance of cochlear implant recipients with GJB2-related deafness. **Am J Med Genet**, v. 109, p. 167-170, 2002.

GRIFA A. et al. Mutation in GJB6 cause nonsyndromic autosomal dominant deafness at DFNA3 locus. **Nat Genet**, v. 23, p. 16-18, 1999.

GRUNDFAST, K.M.; ATWOOD, J.L.; CHOUNG, D. Genetics and molecular biology of deafness. **Otolaryngol Clin North Am**, Washington, DC, v. 32, n. 6, p. 1067-1088, 1999.

GUILFORD, P. et al. A non-syndromic form of neurosensory, recessive deafness maps to the pericentromeric region of chromosome 13q. **Nature Genet**, v. 6, p. 24-28, 1994.

HISMI, B. O. et al. Effects of GJB2 genotypes on the audiological phenotype: variability is present for all genotypes. **Int J Pediatr Otorhinolaryngol**, v. 70, n. 10, p. 1687-94, 2006.

HUTCHIN, T. et al. Assessment of the genetic causes of recessive childhood non-syndromic deafness in the UK – implications for genetic testing. **Clin Genet**, v. 68, p. 506-12, 2005.

IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Censo de 2000. Disponível em < <http://www.ibge.gov.br/censo/default.php> > Acesso em março 2007.

IZUMIKAWA, M. et al. Auditory hair cell replacement and hearing improvement by *Atoh1* gene therapy in deaf mammals. **Nat Med**, v. 11, n. 3, p. 271-276, 2005.

JANECKE A. R. et al. Progressive hearing loss, and recurrent sudden sensorineural hearing loss associated with *GJB2* mutations-phenotypic spectrum and frequencies of *GJB2* mutations in Austria. **Hum Genet**, v. 111, p. 145-153, 2002.

JOINT COMMITTEE ON INFANT HEARING. Year 2000 position statement. Principles and guidelines for early detection and intervention programs. **Am J Audiol**, v. 9, n. 1, p. 9-29, 2000.

JUN, A. I. et al. Temporal bone histopathology in Connexin 26-related hearing loss. **Laryngoscope**, v. 110, p. 269-275, 2000.

KALAY, E. et al. *GJB2* mutations in Turkish patients with ARNSHL: prevalence and two novel mutations. **Hear Res**, v. 203, p. 88-93, 2005.

KEATS, B. J. B.; BERLIN, C. I. Genomics and hearing impairment. **Genome Res**, v. 9, n. 1, p. 7-16, 1999.

KELLEY, P. M. et al. Novel mutations in the connexin 26 gene (*GJB2*) that cause autosomal recessive (DFNB1) hearing loss. **Am J Hum Genet**, v. 62, p. 792-799, 1998.

KELSELL, D. P. et al. Connexin 26 mutations in hereditary non-syndromic sensorineural deafness. **Nature**, v. 387, p. 80-83, 1997.

KELSELL, D. P.; DI, W. L.; HOUSEMAN, M. J. Connexin mutations in skin disease and hearing loss. **Am J Hum Genet**, v. 68, n. 3, p. 559-568, 2001.

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

KOKITSU-NAKATA, N. M.; GUION-ALMEIDA, M. L.; RICHIERI-COSTA, A. Clinical genetic study of 144 patients with nonsyndromic hearing loss. **Am J Audiol**, v. 13, p. 99-103, 2004.

KRAWCZAK, M.; COOPER, D.N. Gene deletions causing human genetic disease: mechanisms of mutagenesis and the role of the local DNA sequence environment. **Hum Genet**, v. 86, p. 425-441, 1991.

KRUTOVSKIKH, V.; YAMASAKI, H. Connexin gene mutations in human genetic diseases. **Mutat Res**, v. 462, p. 197-207, 2000.

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

LAMARTINE J. et al. Mutations in *GJB6* cause hidrotic ectodermal dysplasia. **Nature Genet**, v. 26, p. 142-144, 2000.

LANDAU, M. et al. Erythrokeratoderma variabilis with Erythema gyratum repens-like lesions. **Pediatr Dermatol**, v. 19, n. 4, p. 285-292, 2002.

LERER I. et al. Contribution of Connexin 26 mutations to nonsyndromic deafness in Ashkenazi patients and the variable phenotypic effect of the mutation *167delT*. **Am J Med Genet**, v. 95, p. 53-56, 2000.

LERER I. et al. A deletion mutation in *GJB6* cooperating with a *GJB2* mutation in *trans* in nonsyndromic deafness: a novel founder mutation in Ashkenazi Jews. **Hum Mutat**, v. 458, p. 1-10, 2001.

LIU, X.Z. et al. Mutations in connexin 31 underlie recessive as well as dominant non-syndromic hearing loss. **Hum Mol Genet**, v. 9, p. 63-67, 2000.

LIU, X.Z. et al. Mutations in *GJA1* (connexin 43) are associated with non-syndromic autosomal recessive deafness. **Hum Mol Genet**, v. 10, p. 2945-51, 2001.

LIU, X.Z. et al. The prevalence of connexin 26 (*GJB2*) mutations in the Chinese population. **Hum Genet**, v.111, p. 394-397, 2002.

LIU, X. Z. et al. Audiological features of *GJB2* (Connexin 26) deafness. **Ear Hear**, v. 26, p. 361-369, 2005.

LONGHITANO, S. B.; BRUNONI, D. Genetic hearing loss: a study of 228 Brazilian patients. **Genet Molec Biol**, v. 23, n. 1, p. 25-27, 2000.

LOPEZ-BIGAS, N. et al. Connexin 31 (*GJB3*) is expressed in the peripheral and auditory nerves and causes neuropathy and hearing impairment. **Hum Mol Genet**, v. 10, p. 947-952, 2001.

LUCOTTE, G.; BATHELIER, C.; CHAMPENOIS, T. PCR test for diagnosis of the common *GJB2* (connexin 26) *35delG* mutation on dried blood spots and determination of the carrier frequency in France. **Mol Cell Probes**, v. 15, p. 57-59, 2001.

MANFREDI, A. K. S.; SANTOS, C. B. Intervenção fonoaudiológica junto às mães ou responsáveis por recém-nascidos de risco para deficiência auditiva, precocemente detectada. **Medicina**, Ribeirão Preto, v. 35, p. 70-77, 2002.

MATHERS, C.; SMITH, A.; CONCHA, M. Global burden of hearing loss in the year 2000. **Global Burden of Disease (World Health Organization), 2000**. Disponível em <[http:// www.who.int/healthinfo/bodestimates/en/](http://www.who.int/healthinfo/bodestimates/en/)> Acesso em Janeiro 2007.

MATSUNAGA, T. et al. Clinical course of hearing and language development in GJB2 and non-GJB2 deafness following habilitation with hearing aids. **Audiol Neurotol**, v. 11, p. 59-68, 2006.

MAZZOLI, M. et al. Recommendations for the description of genetic and audiological data for families with nonsyndromic hereditary hearing impairment. **GENDEAF study group on genotype-phenotype correlations (2003)**. Disponível em Hereditary Hearing Loss Homepage <<http://webh01.ua.ac.be/hhh>> Acesso em janeiro de 2007.

MEDICA, I. et al. C.35delG/GJB2 and del (GJB6-D13S1830) mutations in Croatians with prelingual non-syndromic hearing impairment. **Ear Nose Throat Disord**, v. 5, n. 11, p. 1-4, 2005.

MÉGARBANÉ, A. et al. Craniosynostosis, telecanthus, scalp hair abnormalities and sensorineural deafness in two sibs. **Am J Med Genet**, v. 109, p. 323-27, 2002.

MEHL, A. L.; THOMSON, V. The Colorado newborn hearing screening project, 1992-1999; on the threshold of effective population-based universal newborn hearing screening. **Pediatrics**, v. 109, E7, 2002.

MEIRA, C. P. **Influência das alterações sensório-neurais na interpretação dos potenciais evocados auditivos do tronco encefálico**. Bauru (SP), 2002. Dissertação (Mestrado em Distúrbios da Comunicação) – Hospital de Reabilitação de Anomalias Craniofaciais, Universidade de São Paulo.

MINARIK, G. et al. GJB2 gene mutations in Slovak hearing-impaired patients of Caucasian origin: spectrum, frequencies and SNP analysis. **Clin Genet**, v. 68, p. 554-57, 2005.

MORTON, C. Genetics, genomics and gene discovery in the auditory system. **Hum Molec Genet**, v. 11, n. 10, p. 1229-1240, 2002.

MUELLER, R. Connexin 26 (GJB2) deafness homepage. In: MARTINI, A.; MAZZOLI, M.; STEPHENS, D.; READ, A. **Definitions, Protocols and Guidelines in Genetic Hearing Impairment**. London: Whurr Publishers Ltd, 2001. p. 176-180.

MURGIA, A. et al. Cx26 deafness mutation analysis and clinical variability. **J Med Genet**, v. 36, p. 829-832, 1999.

MUSTAPHA, M. et al. 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**, v.38, n. 10, p. e36, 2001.

NAJMABADI, H. et al. *GJB2* mutations in Iranians with autosomal recessive non-syndromic sensorineural hearing loss. **Hum Mutat**, v.19, p. 572-577, 2002.

NAJMABADI, H. et al. *GJB2* mutations: Passage through Iran. **Am J Med Genet**, v. 133A, p. 132-37, 2005.

NIEDZIELSKA, G.; KATSHA, E.; SZYMOLA, D. Hearing defects in children born of mothers suffering from rubella in the first trimester of pregnancy. **Int J Pediatr Otorhinolaryngol**, v. 54, p. 1-5, 2000.

OGUSHI, T. et al. Clinical features of patients with *GJB2* (connexin 26) mutations: severity of hearing loss is correlated with genotypes and protein expression patterns. **J Hum Genet**, v. 50, p. 76-83, 2005.

OLIVEIRA, C. A.; MACIEL-GUERRA, A. T.; SARTORATO, E. L. Deafness resulting from mutations in the *GJB2* (connexin 26) gene in Brazilian patients. **Clin Genet**, v. 61, p. 354-358, 2002.

OLIVEIRA, C. A. et al. Frequency of the *35delG* mutation in the *GJB2* gene in samples of European, Asian and African Brazilians. **Hum Biol**, v. 76, n. 2, p. 313-316, 2004.

ORZAN, E. et al. Connexin 26 preverbal hearing impairment: mutation prevalence and heterozygosity in a selected population. **Int J Audiol**, v. 41, p. 120-124, 2002.

PÁDUA, F. G. M. et al. Triagem Auditiva Neonatal. **Arq Otorrinolaringol**, v. 9, n. 3, p. 190-194, 2005.

PALLARES-RUIZ N. et al. A large deletion including most of *GJB6* in recessive non syndromic deafness: a digenic effect ? **Eur J Hum Genet**, v. 10, p. 72-76, 2002.

PAMPANOS, A. et al. Prevalence of *GJB2* mutations in prelingual deafness in the Greek population. **Int J Pediatr Otorhinolaryngol**, v. 65, p. 101-108, 2002.

PARVING, A. Epidemiology of genetic hearing impairment. In: MARTINI, A.; READ, A.; STEPHENS, D. **Genetics and Hearing Impairment**. London: Whurr Publishers Ltd, 1996. p. 73-81.

PARVING, A.; DAVIS, A. A. Protocol for epidemiological studies on genetic hearing impairment. In: MARTINI, A.; MAZZOLI, M.; STEPHENS, D.; READ, A. **Definitions, Protocols and Guidelines in Genetic Hearing Impairment**. London: Whurr Publishers Ltd, 2001. p. 40-43.

PETIT, C. Autosomal recessive non-syndromal hearing loss. In: MARTINI, A.; READ, A.; STEPHENS, D. **Genetics and Hearing Impairment**. London: Whurr Publishers Ltd, 1996. p. 197-212.

PFEILSTICKER, L. N. et al. A investigação genética na surdez hereditária não-sindrômica. **Rev Bras Otorrinolaringol**, v. 70, n. 2, p. 181-186, 2004.

PIATTO V.B.; MANIGLIA J.V.; Importância do Gene Conexina 26 na etiologia da deficiência auditiva sensorineural não-sindrômica. **Acta Awho.**, v. 20, n. 2, p. 106-112, 2001.

PIATTO, V. B. et al. Prevalence of the *GJB2* mutations and the del (*GJB6-D13S1830*) mutations in Brazilian patients with deafness. **Hear Res**, v. 196, p. 87-93, 2004.

PIATTO, V. B. et al. Genética molecular da deficiência auditiva não-sindrômica. **Rev Bras Otorrinolaringol**, v. 71, n. 2, p. 216-223, 2005.

POSUKH, O. et al. First molecular screening of deafness in the Altai Republic population. **BMC Med Genet**, v. 6, n. 12, p. 1-7, 2005.

PRIEVE, B. A. et al. Analysis of transient-evoked otoacoustic emissions in normal-hearing and hearing-impaired eras. **J Acoust Soc Am**, v. 93, n. 6, p. 3308-3319, 1993.

PROPST, E. J. et al. Ethnicity and mutations in *GJB2* (connexin26) and *GJB6* (connexin 30) in a multi-cultural Canadian paediatric Cochlear Implant Program. **Int J Pediatr Otorhinolaryngol**, v. 70, n. 3, p. 435-444, 2005.

RABIONET, R. et al. Molecular basis of childhood deafness resulting from mutations in the *GJB2* (connexin 26) gene. **Hum Genet**, v. 106, n. 1, p. 40-44, 2000.

RABIONET, R. et al. Connexin mutations in hearing loss, dermatological and neurological disorders. **Trends Molec Med**, v. 8, n. 5, p. 205-212, 2002.

RICHARD, G. et al. Missense mutations in *GJB2* encoding connexin 26 cause the ectodermal dysplasia Keratitis-Ichthyosis-Deafness syndrome. **Am J Hum Genet**, v. 70, n. 5, p. 1341-1348, 2002.

RICHARD, G. Connexin gene pathology. **Clin Exp Dermatol**, v. 28, p. 397-409, 2003.

ROTHROCK, C. R. et al. Connexin 26 *35delG* does not represent a mutational hotspot. **Hum Genet**, v. 113, n. 1, p. 18-23, 2003.

ROUAN, F. et al. Trans-dominant inhibition of connexin-43 by mutant connexin-26: implications for dominant connexin disorders affecting epidermal differentiation. **J Cell Sci**, v. 114, n. 11, p. 2105-2113, 2001.

SALERNO, R. et al. Deficiência auditiva na criança. **Rev Bras Otorrinolaringol**, v. 51, n. 2, p. 23-32, 1985.

SANTOS, R.L.P. et al. Low prevalence of Connexin 26 (*GJB2*) variants in Pakistani families with autosomal recessive non-syndromic hearing impairment. **Clin Genet**, v. 67, p. 61-68, 2005.

SARTORATO, E. L. et al. Determination of the frequency of *35delG* allele in Brazilian neonates. **Clin Genet**, v. 58, n. 1, p. 339-340, 2000.

SCOTT, D. A. et al. Identification of mutation on the connexin 26 gene that cause autosomal recessive nonsyndromic hearing loss. **Hum Mutat**, v. 11, n. 5, p. 387-394, 1998.

SEEMAN, P. et al. Double heterozygosity with mutations involving both the *GJB2* and *GJB6* genes is a possible, but very rare, cause of congenital deafness in the Czech population. **Ann Hum Genet**, v. 69, p. 9-14, 2005.

SHAHIN, H. et al. Genetics of congenital deafness in the Palestinian population: multiple connexin 26 alleles with shared origins in the Middle East. **Hum Genet**, v. 110, p. 284-289, 2002.

SHAM, P. C.; CURTIS, D. Monte Carlo tests for association between disease and alleles at highly polymorphic loci. **Ann Hum Genet**, v. 59, p. 97-105, 1995.

SHI, G. et al. *GJB2* gene mutations in newborns with non-syndromic hearing impairment in Northern China. **Hear Res**, v. 197, p. 19-23, 2004.

SIMSEK, M. et al. Absence of deafness-associated Connexin-26 (*GJB2*) gene mutations in the Omani population. **Hum Mutat**, v. 460, p. 1-4, 2001.

SNOECKX, R.L. et al. *GJB2* mutations and degree of hearing loss: a multicenter study. **Am J Hum Genet**, v. 77, p. 945-57, 2005.

SOBE, T. et al. The prevalence and expression of inherited connexin 26 mutations associated with non-syndromic hearing loss in the Israeli population. **Hum Genet**, v. 106, p. 50-57, 2000.

STATSOFT, Inc. **STATISTICA**. For Windows (Computer program manual). Tulsa, 1996. 1cd.

STEEL, K. P. Perspectives: biomedicine. The benefits of recycling. **Science**, v. 285, n. 5432, p. 1363-4, 1999

STEVENSON, V.A.; ITO, M.; MILUNSKY, J.M. Connexin 30 deletion analysis in connexin 26 heterozygotes. **Genet Test**, v. 7, p. 151-54, 2003.

SZYMKO-BENNETT, Y. M. et al. Auditory manifestations of Keratitis-Ichthyosis-Deafness (KID) syndrome. **Laryngoscope**, v. 112, n. 2, p. 272-280, Feb 2002.

TAVARES-NETO, J.; AZÊVEDO, E. S. Racial origin and historical aspects of family names in Bahia, Brazil. **Hum Biol**, v. 49, p. 287-299, 1977.

TEKIN, M. et al. Connexin 26 (*GJB2*) mutations in the Turkish population: implications for the origin and high frequency of the *35delG* mutation in Caucasians. **Hum Genet**, v. 108, p. 385-389, 2001.

TEKIN, M. et al. Spectrum of *GJB2* mutations in Turkey comprises both Caucasian and oriental variants: roles of parental consanguinity and assortative mating. **Hum Mutat**, v. 21, n. 5, p. 552-559, 2003.

UYGUNER, O. et al. Frequencies of gap- and tight-junction mutations in Turkish families with autosomal-recessive non-syndromic hearing loss. **Clin Genet**, v. 64, p. 65-69, 2003.

VAN CAMP, G.; COUCKE, P.; WILLEMS, P. J. Autosomal dominant non-syndromal hearing loss. In: MARTINI, A.; READ, A.; STEPHENS, D. **Genetics and Hearing Impairment**. London: Whurr Publishers Ltd, 1996. p. 213-220.

VAN CAMP, G.; SMITH, R. Hereditary Hearing Loss Homepage. Disponível em <: <http://webhost.ua.ac.be/hhh> > Acesso em julho de 2006

VAN GEEL, M. et al. HID and KID syndromes are associated with the same connexin 26 mutation. **Br J Dermatol**, v. 146, n. 6, p. 938-942, jun 2002.

VAN LAER, L. et al. A common founder for the *35delG GJB2* gene mutation in connexin 26 hearing impairment. **J Med Genet**, v. 38, n. 8, p. 515-518, 2001.

WILCOX, S. A. et al. High frequency hearing loss correlated with mutations in the *GJB2* gene. **Hum Genet** V. 106, n. 4, p. 399-405, Apr 2000.

YOSHINAGA-ITANO, C. et al. Language of early- and later-identified children with hearing loss. **Pediatrics**, v. 102, p. 1161-1171, 1998.

ZAKZOUK, S. M.; AL-ANAZY, F. Sensorineural hearing impaired children with unknown causes: a comprehensive etiological study. **Int J Pediatr Otorhinolaryngol**, v. 64, p. 17-21, 2002.

ZELANTE, L. et al. Connexin 26 mutations associated in the most common form of non-syndromic neurosensory autosomal recessive deafness (DFNB1) in Mediterraneans. **Hum Molec Genet**, v. 6, p. 1605-1609, 1997.

APÊNDICE 1**ANAMNESE****DADOS PESSOAIS:**

Data:..... Caso nº:

Nome:.....

D.N.:..... Idade:..... Sexo: F() M()

Natural:..... Ocupação:.....

Escolaridade:.....

Pai:.....

Idade:..... Natural:.....

Ocupação:..... Escolaridade:.....

Mãe:.....

Idade:..... Natural:.....

Ocupação:..... Escolaridade:.....

HISTORICO FAMILIAL:

Consangüinidade entre os pais: sim () não()

Grau:.....

Outros casos de surdez na família: sim () não()

.....

.....

Casos de doenças genéticas/malformações na família: sim() não()

.....

.....

Abortos: sim () não ()

.....

.....

CARACTERIZAÇÃO DO TIPO DE SURDEZ:

Bilateral () Unilateral ()

Estacionaria () Progressiva ()

Leve () Moderada () Severa () Profunda ()

Condutiva () Neurosensorial () Mista ()

Etiologia: Congênita () Pós-natal () Idade de início:

Época em que percebeu o problema:.....

.....

Época em que foi feito o diagnóstico de surdez:.....

.....

SINAIS EXTRA-AUDITIVOS

Displasias ectodérmicas ()

Distúrbios: Dentes () Unhas () Pêlos () Cabelo () Sudorese ()

Obs:.....

GESTACÃO:

Pré-natal: sim () não () A partir de:.....

Sem intercorrências () Com intercorrências ()

Infecções maternas: sim () não ()
 CMV () rubéola () toxoplasmose () sífilis () herpes () outras ()

Uso de drogas pela mãe: sim () não () quais:.....

Raio X na gestação: sim () não ()

Obs:.....

PERÍODO PERINATAL

Sem Intercorrências () Com intercorrências ()

Parto: normal () cesárea () fórceps ()

Sofrimento fetal: sim () não ()

Cronologia: termo () pré-termo () pós-termo ()

Anoxia () Icterícia () Incompatibilidade Rh () Malformação ()

Baixo Peso () Uso de medicamentos ()

Quais:.....

DESENVOLVIMENTO NEUROPSICOMOTOR

Normal () com atraso ()

Sustentação de pescoço:.....

Sentou:.....Engatinhou:.....Andou:.....Balbucio:.....

Primeiras palavras:.....

Uso de medicamentos: sim () não () Quais:.....

.....

Internações: sim () não () Cirurgias: sim () não ()

Infecções de ouvido: sim () não ()

Meningite () Sarampo () Caxumba () IVAS ()

Exposição a ruído:.....

Observações:.....

Acompanhamento

especializado:.....

Exames complementares realizados:.....

HEREDOGRAMA:

APÊNDICE 2**CONSENTIMENTO INFORMADO
(coleta de material para análise laboratorial)**

Eu,

autorizo a coleta de sangue de meu(minha)
filho(a) _____

para que sejam feitos estudos sobre a etiologia da perda auditiva não-sindrômica.

Declaro ter sido esclarecido(a) sobre o procedimento de coleta, com utilização de material descartável, sobre a ausência de risco de contaminação, bem como sobre os objetivos e importância deste estudo.

Declaro, também, ter sido esclarecido(a) sobre a privacidade dos meus dados pessoais e autorizo o uso dos resultados obtidos para divulgação no meio científico.

_____, _____ de _____ de 200_.

(local)

(dia)

(mês)

(ano)

(assinatura)

(averiguador)

APÊNDICE 3

CONSENTIMENTO INFORMADO (avaliação auditiva)

Eu,

autorizo a realização da avaliação auditiva de _____

para que sejam feitos estudos sobre a etiologia das perdas auditivas não-sindrômicas.

Declaro ter sido esclarecido(a) sobre as etapas desta avaliação para a pesquisa da caracterização da perda auditiva, bem como dos procedimentos a serem executados em cada teste.

Declaro, também, ter sido esclarecido(a) sobre a privacidade dos resultados obtidos e autorizo o uso deste material para outras pesquisas sobre deficiência auditiva.

_____, _____ de _____ de 200_.

(local) (dia) (mês) (ano)

(assinatura)

(averiguador)

APÊNDICE 4

Codificação das respostas obtidas na anamnese quanto aos fatores ambientais do histórico de cada probando.

FATORES AMBIENTAIS		
Pré-natais	Peri-natais	Pós-natais
1. suspeita de rubéola	1. anóxia	1. suspeita de meningite
2. rubéola confirmada	2. baixo peso	2. meningite
3. toxoplasmose	3. prematuridade	3. convulsão
4. outras (anemia, epilepsia)	4. icterícia	4. desidratação
	5. malformação	5. anemia
	6. incompatibilidade Rh	6. medicação ototóxica (pneumonia / broncopneumonia)
	7. transfusão de sangue	7. otites
	8. infecções (hospitalar, generalizada e sepsia neonatal)	8. viroses sem diagnóstico
	9. outras (anemia, parada cardíaca, parada respiratória)	9. outras (infecção intestinal, bronquite, hepatite.

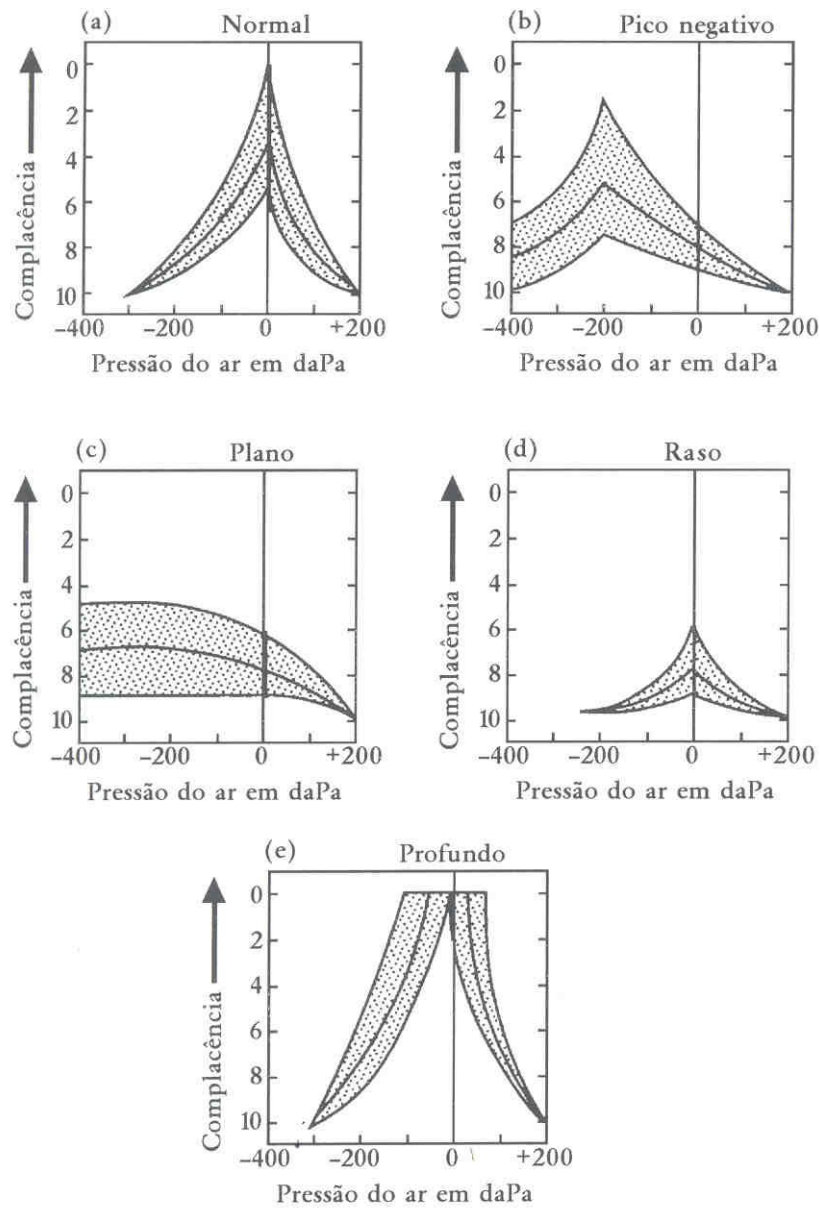
APÊNDICE 5

Categorização do diagnóstico audiológico com relação a: 1) configuração da curva audiométrica e grau de perda auditiva, obtidos na audiometria tonal liminar (ATL) e 2) presença ou ausência, bem como normalidade ou não dos valores das latências absolutas e de interpicos, obtidos na pesquisa do potencial evocado auditivo do tronco cerebral (PEATE).

1) ATL	2) PEATE
1. grau leve e configuração plana	0. Ondas I, III e V ausentes
2. grau leve e configuração descendente	1. Ondas I, III e IV presentes e latências normais
3. grau leve e configuração ascendente	2. Onda I presente com latência normal
4. grau moderado e configuração plana	3. Onda I presente com latência alterada
5. grau moderado e configuração levemente descendente	4. Onda III presente com latência normal
6. grau moderado e configuração fortemente descendente	5. Onda III presente com latência alterada
7. grau severo e configuração plana	6. Onda V presente com latência normal
8. grau severo e configuração fortemente descendente	7. Onda V presente com latência alterada
9. grau severo e configuração levemente descendente	8. Onda I, III e V presente e latências alteradas
10. grau profundo e configuração plana	
11. grau profundo e configuração levemente descendente	
12. configuração em forma de “U”	

APÊNDICE 6

Configurações timpanométricas vistas em orelhas normais e patológicas

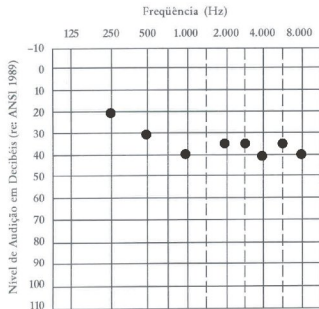


Fonte: BESS; HUMES, 1998

APÊNDICE 7

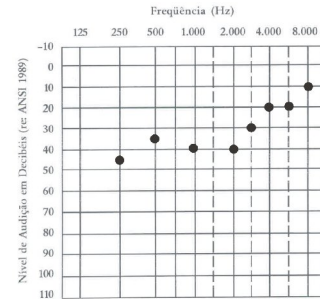
Ilustração de audiogramas conforme o grau e a configuração da perda auditiva.

Configuração plana

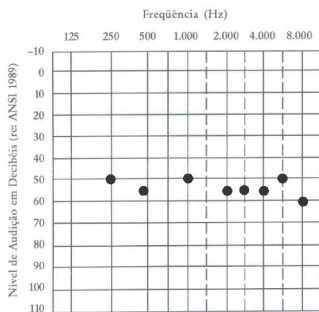


Grau leve

Configuração ascendente

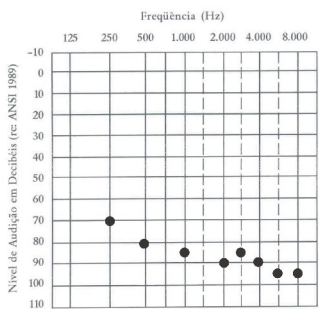
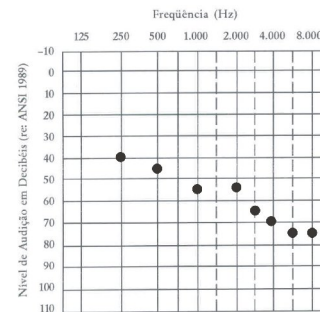


Configuração plana

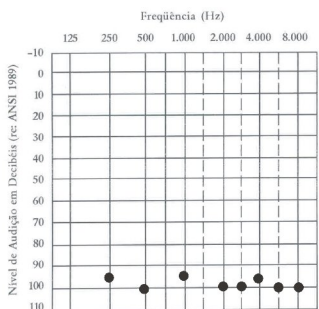
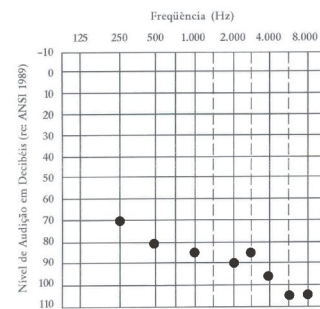


Grau moderado

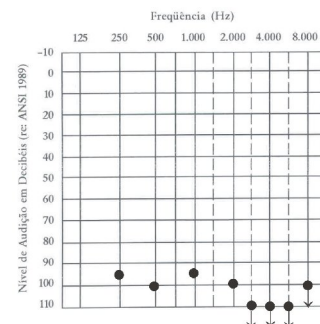
Configuração descendente



Grau severo

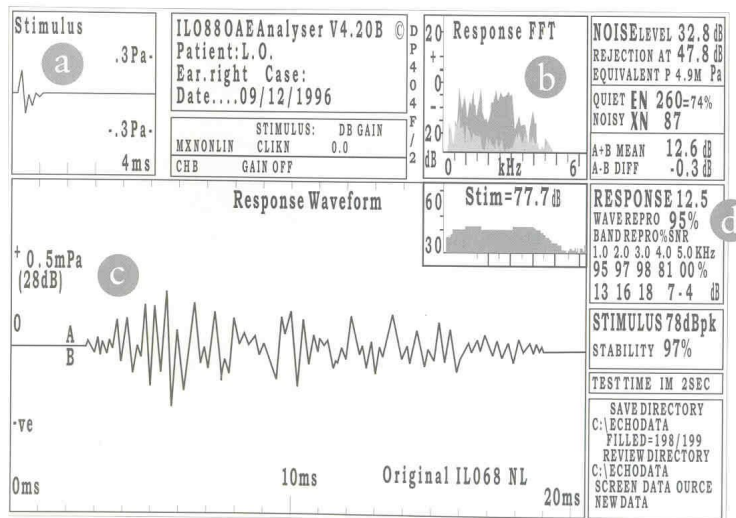


Grau profundo

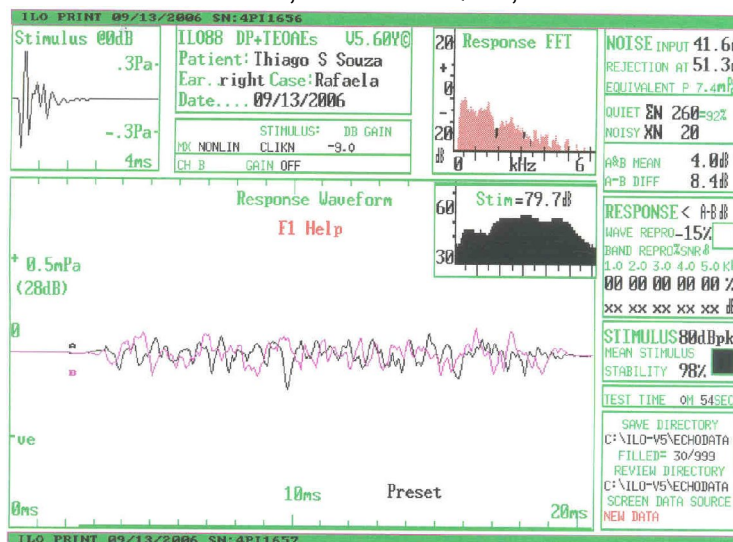


APÊNDICE 8

Representação da tela do monitor de vídeo com a informação do registro das Emissões Otoacústicas Evocadas Transientes (EOET) mostrando presença de resposta no quadro superior (porção mais escura na letra b) e ausência de resposta no quadro inferior (de trás da cor vermelha). A letra d representa o valor da reprodutibilidade do sinal das EOE captado nas unidades A e B da sonda analisadora, o qual no quadro superior é de 95%, mesmo com a presença de ruído de fundo, e no quadro inferior alcança valores negativos, de -15%,.



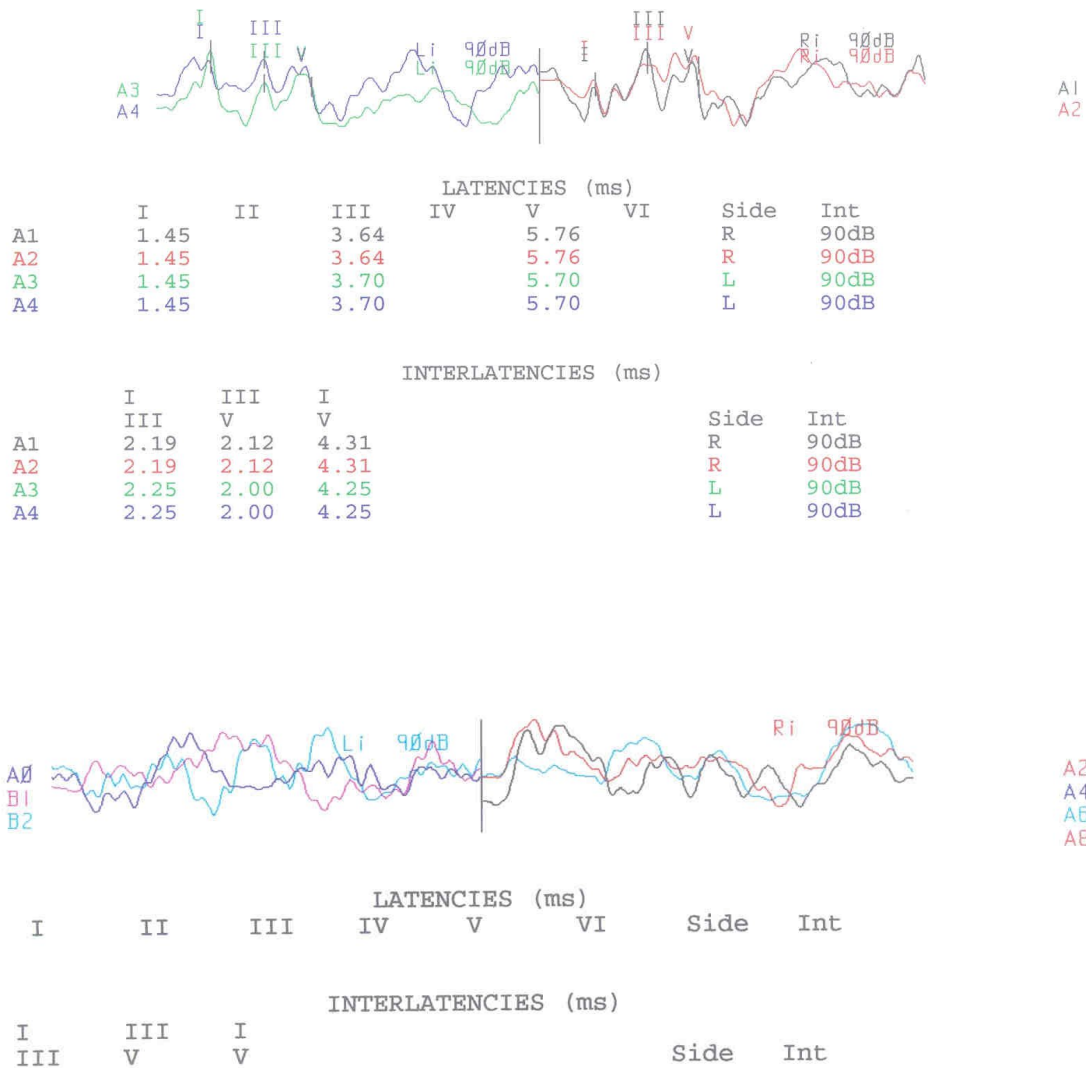
Fonte: FERRARI; BEVILACQUA, 1998



Fonte: PRESENTE ESTUDO

APÊNDICE 9

Representação da tela do monitor de vídeo com a informação do registro do potencial evocado auditivo do tronco encefálico (PEATE) mostrando presença de latências absolutas e interpicos dentro da normalidade bilateralmente para a intensidade de 90dB (quadro superior) e ausência de respostas bilateralmente (quadro inferior).



Fonte: PRESENTE ESTUDO