

Ana Carla Batissoco

**Mutações nos Genes *GJB2* e *GJB6* em
Indivíduos com Deficiência Auditiva**

São Paulo

2006

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

Ana Carla Batisso

**Mutações nos Genes *GJB2* e *GJB6* em
Indivíduos com Deficiência Auditiva**

**Dissertação apresentada ao
Instituto de Biociências da
Universidade de São Paulo, para a
obtenção de Título de Mestre em
Ciências, na Área de
Biologia/Genética.**

**Orientadora: Profa. Dra. Regina
Célia Mingroni Netto**

São Paulo

2006

Batissoco, Ana Carla
Mutações nos Genes *GJB2* e *GJB6*
em Indivíduos com Deficiência Auditiva
103p.

Dissertação (Mestrado) - Instituto
de Biociências da Universidade de São
Paulo. Departamento de Genética e
Biologia Evolutiva

1. Deficiência Auditiva.
2. Conexinas. 3. *GJB2*. 4. *GJB6*.

Comissão Julgadora:

Prof(a). Dr(a).

Prof(a). Dr(a).

Profa. Dra. Regina Célia Mingroni Netto
Orientadora

*Para meu marido Alê Foresti,
A quem escolhi para compartilhar os meus sonhos e a minha vida.*

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora, Regina Célia Mingroni Netto, por te aberto as portas da genética e assim viabilizar a realização de um sonho, bem como pela paciência e orientação durante todo esse período.

Aos meus pais, Luiz e Zulmira, e meus irmãos, Miguel e Graça, aos quais devo tudo o que sou.

Aos pacientes, sem os quais esse trabalho não poderia ser realizado.

Aos amigos, Ronaldo e Karina, cujo apoio intelectual e científico foi essencial para a concretização desse projeto.

Ao Prof. Dr. Paulo Otto, por ter apresentado o Laboratório de Genética Humana e pelas opiniões valiosas.

À Dra. Maria Cristina Célia Braga, que realizou parte dos testes de triagem da mutação 35delG.

À fonoaudióloga Juliana pelo auxílio nas análises dos exames audiológicos e ao Dr. Valter Della Rosa, pelo encaminhamento dos pacientes.

Ao Dr. Mauro Spinelli (*in memoriam*) e de todos os colegas da DERDIC pelo encaminhamento e estudo clínico de pacientes.

Ao Dr. Sidney Batista dos Santos pela sugestão do protocolo para seqüenciamento do gene *GJB2*.

Ao Dr. Felipe Moreno pela sugestão do protocolo para triagem da del(*GJB6-D13S1830*) no gene *GJB6*.

Aos funcionários do Departamento de Genética e Biologia Evolutiva do IBUSP, Teresa, Maraisa, Ligia, Fátima, Mara e Paulo, pelas várias vezes que são vítimas de nossas lamúrias e que tantas vezes nos auxiliam com sua experiência.

Aos colegas de bancada e parceiros das “aventuras” e “desventuras” da pesquisa: Lílian, Claudia, Daniel, Andréa, Larissa, Juliana, Simone, Polyana, Rafaella, Jacaré, Luiz, Eliete e em especial a Jihane, a caçula da “família de surdos”.

À Vivi por sua amizade e personalidade singular.

Aos amigos, Carol, Elissa e Tarcísio, por terem sido o meu apoio nos momentos mais difíceis dessa jornada.

Ao Dr. João Targino de Araújo, por ter me iniciado na pesquisa científica.

Ao Depto. de Genética e Biologia Evolutiva do IBUSP, pelo uso das dependências.

Ao CNPq e a FAPESP pelo apoio financeiro.

ÍNDICE GERAL

Resumo	1
Abstract	3
I – Introdução	6
I.1 – A audição	6
I.2 – A deficiência auditiva	9
I.3 – A deficiência auditiva hereditária	11
I.4 – As conexinas e a surdez não-sindrômica de herança autossômica recessiva	12
I.4.1 – Estrutura e função das conexinas	13
I.4.2 – Os genes <i>GJB2</i> e <i>GJB6</i> (loco DFNB1)	16
I.5 – Os principais tipos de mutações nas conexinas encontradas em amostras de deficientes auditivos	21
I.6 – A frequência das mutações nos genes das conexinas 26 e 30 nas diferentes populações de ouvintes	24
II – Objetivos	31
III – Casuística e Métodos	33
III.1 – Pacientes	33
III.2 – Métodos	34
III.2.1 – Extração de DNA e estimativa de concentração	34
III.2.2 – Triagem da mutação 35delG no gene da conexina 26	34
III.2.3 – Triagem da mutação 167delT no gene da conexina 26	36
III.2.4 – Triagem da del(<i>GJB6</i> -D13S1830)	36
III.2.5 – Triagem da del(<i>GJB6</i> -D13S1854)	37
III.2.6 – Pesquisa de outras mutações no gene da conexina 26	38
III.2.7 – Seqüenciamento do gene <i>GJB2</i>	40
III.2.8 – Clonagem	41
III.2.9 – Estudos Complementares	41
IV – Resultados	43
IV.1 – Triagem das mutações 35delG e 167delT no gene <i>GJB2</i> e del(<i>GJB6</i> -D13S1830) e del(<i>GJB6</i> -D13S1854) no gene <i>GJB6</i>	43
IV.2 – Seqüenciamento para identificação da segunda mutação nos heterozigotos quanto à mutação 35delG	44
IV.3 – Análise de SSCP	51
V – Discussão	56

V.1 – Triagem das mutações 35delG e 167delT no gene <i>GJB2</i> e del(<i>GJB6</i> -D13S1830) e del(<i>GJB6</i> -D13S1854) no gene <i>GJB6</i>	56
V.2 - Análise de SSCP e seqüenciamento do gene <i>GJB2</i> (outras mutações no gene <i>GJB2</i>)	59
VI – Conclusões	69
VII – Referências Bibliográficas	71
VIII – Anexos	82
Anexo I – Ficha de anamnese genético-clínica	83
Anexo II – Quadro com o resumo da casuística total	87

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 – Esquema representando o aparelho auditivo humano	6
Figura 2 – Detalhe da orelha média e da orelha interna	7
Figura 3 – Secção transversal de um dos giros da cóclea, mostrando sua divisão em três compartimentos longitudinais	7
Figura 4 – Representação esquemática dos conexons	14
Figura 5 – Representação esquemática da organização das conexinas	14
Figura 6 – Representação esquemática da reciclagem dos íons de potássio na cóclea	16
Figura 7 – Representação esquemática do gene <i>GJB2</i>	17
Figura 8 – Representação esquemática da região do loco DFNB1 onde está contido o gene <i>GJB6</i> e das deleções del(<i>GJB6</i> -D13S1830) e del(<i>GJB6</i> -13S1854)	21
Figura 9 – Representação esquemática do gene <i>GJB6</i> , dos três diferentes clones identificados e seus respectivos exons	22
Figura 10 – Gel de agarose a 2% mostrando o resultado da PCR alelo-específica para a detecção da mutação 35delG	35
Figura 11 – Gel de poliacrilamida a 6% para identificação da mutação 167delT	36
Figura 12 – Gel de agarose a 2% com os produtos da PCR da del(<i>GJB6</i> -D13S1830)	37
Figura 13 – Gel de agarose a 2% com os produtos da PCR da del(<i>GJB6</i> -D13S1854)	38
Figura 14 – Resultado de SSCP do 1º fragmento do gene <i>GJB2</i>	39
Figura 15 – Resultado de SSCP do 2º fragmento do gene <i>GJB2</i>	40
Figura 16 – Resultado do seqüenciamento do DNA na região da 35delG	40
Figura 17 – Heredograma da família 16534	44
Figura 18 – Heredograma da família 15481 e resultado do seqüenciamento	45
Figura 19 – Heredograma da família 15513 e resultado do seqüenciamento	46
Figura 20 – Heredograma da família 16495 e resultado do seqüenciamento	47
Figura 21 – Heredograma da família 17241 e resultado do seqüenciamento	48
Figura 22 – Heredograma da família 15201	48
Figura 23 – Heredograma da família 14401 e resultado do seqüenciamento	49
Figura 24 – Heredograma da família 15115 e resultado do seqüenciamento	50
Figura 25 – Resultado de SSCP do 1º fragmento da amostra controle e das amostras com padrão de migração atípico	51
Figura 26 – Heredograma da família 14604	57

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela I – Resumo dos genes das conexinas, local de expressão e doenças genéticas humanas associadas	15
Tabela II – Resumo das variantes encontradas no gene da conexina 26 em diversos países	25
Tabela III – Frequência de portadores heterozigotos das mutações 167delT, 235delC e 35delG em várias populações de ouvintes	28
Tabela IV – <i>Primers</i> e condições de amplificação para estudo da 35delG	35
Tabela V – <i>Primers</i> utilizados para amplificação do gene <i>GJB2</i>	39
Tabela VI – Resultados parciais após os testes de triagem da 35delG e 167delT no gene <i>GJB2</i> e del(<i>GJB6</i> -D13S1830) e del(<i>GJB6</i> -D13S1854) no gene <i>GJB6</i>	43
Tabela VII – Resultado do seqüenciamento das 25 amostras com migração alterada no SSCP no primeiro e no segundo fragmento	52
Tabela VIII – Resultados obtidos após os testes de triagem das mutações específicas, da análise por SSCP e do seqüenciamento	53
Tabela IX - Prevalência dos portadores da alteração T101C (M34T) em populações normais e entre surdos em diversos países	64

RESUMO

Estudos prévios têm demonstrado que a surdez é o mais freqüente e heterogêneo defeito sensorial em seres humanos. A deficiência auditiva pré-lingual pode estar presente em cerca de 4 a cada 1000 nascimentos no Brasil. A herança autossômica recessiva é responsável por 80% dos casos genéticos de surdez, sendo o loco DFNB1, onde estão contidos os genes *GJB2* e *GJB6*, o mais importante loco e responsável por 50% dos casos de surdez de herança recessiva. Mais de 100 mutações responsáveis por surdez foram descritas no gene da conexina 26, sendo a mutação 35delG a mais comum e de maior prevalência. Já o gene da conexina 30 pode apresentar duas grandes deleções, del(*GJB6*-D13S1830) e del(*GJB6*-D13S1854), associadas à deficiência auditiva. A freqüência e o tipo das mutações no gene *GJB2* e *GJB6* parecem variar de acordo a origem da população estudada.

Com o objetivo de caracterizar os tipos e estimar a freqüência das mutações dos genes das conexinas 26 e 30 estudamos uma amostra de 300 indivíduos com distúrbios de audição sem diagnóstico de síndrome conhecida. Triamos as mutações 35delG e 167delT no gene *GJB2* e a del(*GJB6*-D13S1830) e del(*GJB6*-D13S1854) no gene *GJB6* por meio de técnicas específicas e rastreamos outras mutações no gene *GJB2* por meio da técnica de SSCP. Também realizamos o seqüenciamento da região codificadora do gene *GJB2* nas amostras com padrão alterado no SSCP e para confirmar a presença das mutações 35delG e 167delT.

A mutação 35delG no gene *GJB2* foi a mutação mais freqüentemente detectada (12,7% da amostra total), tendo sido identificada em 20,7% dos casos familiares e 6,7% dos casos isolados de surdez. Entre os casos de herança recessiva, a mutação 35delG estava presente em 48%. Já a deleção del(*GJB6*-D13S1830) no gene *GJB6* mostrou ser a segunda mutação mais freqüente na nossa casuística (1%). Não identificamos nenhum portador da del(*GJB6*-D13S1854) no gene *GJB6*.

Identificamos outras 18 alterações diferentes no gene *GJB2*, características de grupos populacionais diferentes. Nossos resultados, portanto, confirmam a heterogeneidade étnica da nossa população. Dentre essas alterações, 14 já foram previamente descritas e 4 são novas. Entre as alterações já descritas, 9 são sabidamente patogênicas: G71A (W24X), 176-191del16, 235delC, G109A (V37I), 167delT, G380A (R127H), T269C (L90P), 509insA e G551C (R184P) e 5 são consideradas polimorfismos sem efeito: - 15 T/C, G79A (V27I), A120C (A40A), G468A (G160S) e T101C (M34T). Dentre as alterações não descritas, G241C (L81V), A503G (K168R), A583G (M195V) e C/A 684, apenas a substituição A583G foi considerada como potencialmente patogênica com base na análise realizada pelo programa

Polyphen. Mais estudos são necessários para elucidar o possível papel patogênico dessa mutação.

Nossos resultados demonstraram provável etiologia genética da surdez em 35% da casuística. As estimativas anteriores no Brasil, até 1998, eram menores (16%). Essa mudança pode ser devida à introdução de testes moleculares de triagem para as mutações nos genes *GJB2* e *GJB6* e ao melhor controle de algumas possíveis causas de surdez ambiental.

Nossos estudos indicam a importância de um protocolo mínimo de triagem genética na deficiência auditiva que deve incluir os testes de triagem das mutações 35delG no gene *GJB2* e del(*GJB6*-D13S1830) e del(*GJB6*-D13S1854) no gene *GJB6*, juntamente com o teste de triagem da mutação mitocondrial A1555G. Já a triagem de outras mutações no gene *GJB2* por SSCP seguida do seqüenciamento revelou-se trabalhosa e com pouco retorno na identificação de variantes patogênicas.

ABSTRACT

Previous studies have demonstrated that deafness is the most frequent and heterogeneous sensory defects in humans. Prelingual hearing loss may be present in about 4 in 1000 births in Brazil. Autosomal recessive inheritance accounts for 80% of genetically caused deafness, with DFNB1, which harbors the genes *GJB2* and *GJB6*, being the most important locus and accounting for about 50% of AR cases. More than 100 mutations in the connexin 26 gene that lead to deafness have been described. Of these, the mutation 35delG is the most common one. In the connexin 30 gene, two large deletions, del(*GJB6*-D13S1830) and del(*GJB6*-D13S1854), associated to hearing impairment have been described. The frequency and type of mutations in the *GJB2* and *GJB6* genes seem to vary according to the population studied.

The aim of our study was to characterize types of mutations in the connexin 26 and 30 genes and estimate their frequencies in a sample of 300 probands with hearing loss, without known syndromes. We screened the 35delG and 167delT mutations in the *GJB2* gene and the del(*GJB6*-D13S1830) and del(*GJB6*-D13S1854) deletions in the *GJB6* gene through specific techniques. Other mutations in the *GJB2* gene were also screened using the SSCP technique. In addition, the coding region of *GJB2* gene was sequenced when abnormal patterns were found after SSCP analysis and also to confirm the presence of the 35delG and 167delT mutations.

The 35delG in the *GJB2* gene was the most frequently detected mutation (12,7% of the total sample), being identified in 20,7% of the familial cases and in 6,7% of the isolated cases of deafness. Among the recessive inherited cases, the frequency of the 35delG mutation was 48%. Further, the del(*GJB6*-D13S1830) in the *GJB6* gene was the second most frequent mutation found in the total sample (1%). No case with del(*GJB6*-D13S1854) in the *GJB6* gene was identified.

A further 18 different nucleotide changes were identified in the *GJB2* gene each one characteristic of different population groups confirming the ethnic heterogeneity of our sample. Of these alterations, 14 have previously been described and 4 were novel. Among the described alterations, 9 are pathogenic: G71A (W24X), 176-191del16, 235delC, G109A (V37I), 167delT, G380A (R127H), T269C (L90P), 509insA and G551C (R184P) and 5 were considered to be polymorphisms, without pathogenic effects: - 15 T/C, G79A (V27I), A120C (A40A), G468A (K168R) e T101C (M34T). Among the four novel alterations, G241C (L81V), A503G (K168R), C/A 684 e A583G (M195V). Only the A583G substitution was

regarded as potentially pathogenic after analysis with the program *Polyphen*. More studies are necessary to elucidate the potentially pathogenic effects of this mutation.

Our results indicate that genetic factors account for at least 35% of the etiology of deafness in our sample. Previous estimates performed in Brazil before 1998 showed a smaller contribution (16%). This difference is probably due to the more recent introduction of molecular screening for mutations in the *GJB2* and *GJB6* genes and a reduction in the contribution of environmental causes of deafness

Our studies indicate the importance of a minimum genetic screening protocol in hearing loss which includes the screening tests for the 35delG mutation in the *GJB2* gene and del(*GJB6*-D13S1830) and del(*GJB6*-D13S1854) deletions in *GJB6* gene, in addition to the screening test for the mitochondrial mutation A1555G. The screening for other mutations in the *GJB2* gene with SSCP and sequencing revealed itself as laborious and of little benefit to the identification of pathogenic variants.

I - INTRODUÇÃO

I - INTRODUÇÃO

I.1 - A Audição

Audição é o sentido responsável por captar as informações sonoras que nos rodeiam. Ela é essencial para o desenvolvimento da fala, da linguagem e da socialização. Sem a audição o indivíduo tende a se afastar do seu meio e pode apresentar distúrbios emocionais e de aprendizagem.

A orelha é o órgão que capta o som, transforma-o em estímulos nervosos que enviados ao nervo auditivo chegam ao cérebro. O aparelho auditivo humano está dividido em três compartimentos distintos: a orelha externa, a orelha média e a orelha interna (Figura 1).

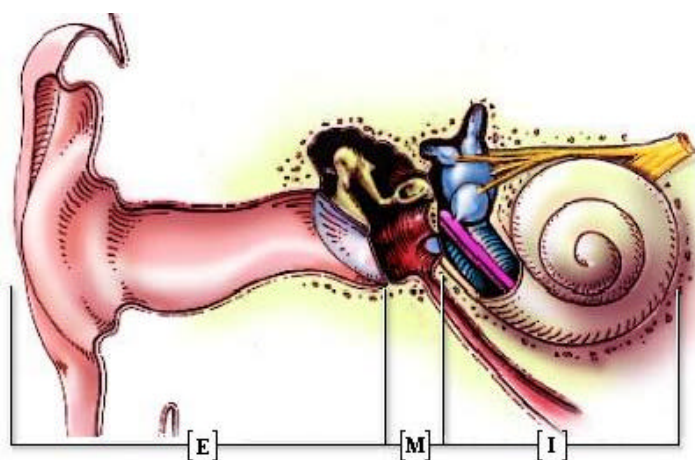


Figura 1 - Esquema representando o aparelho auditivo humano: orelha externa (E), orelha média (M) e orelha interna (I). Figura modificada da página *Promenade round the cochlea Home Page* (Pujol e col., 2006).

A orelha externa, formada pelo pavilhão auditivo e pelo conduto auditivo externo, coleta as ondas sonoras provenientes de uma grande área, concentrando-as no tímpano, que constitui a fronteira entre a orelha externa e a orelha média. A orelha média é uma cavidade cheia de ar escavada no osso temporal na qual residem os ossículos martelo, bigorna e estribo (Figura 2).

Devido ao acoplamento mecânico do tímpano e dos ossículos, a energia de vibração do tímpano em resposta às ondas sonoras é conduzida por eles até a orelha interna. A orelha interna corresponde a uma cavidade óssea onde estão o aparelho vestibular, responsável pelo equilíbrio, e a cóclea, que converte os estímulos sonoros em sinais nervosos ou elétricos (Petit, 1996). A cóclea (Figuras 2 e 3) é um canal ósseo-membranoso em forma de caracol, dividido em três dutos preenchidos por fluidos: a escala vestibular, a escala timpânica e a escala média ou duto coclear (Eckert, 1988; Carlson, 1998; Junqueira e Carneiro, 1999; Willems, 2000; Pujol e col., 2006). Se imaginarmos a cóclea desenrolada, sua base mais

alargada apresenta duas janelas: a oval e a redonda. Os três tubos cocleares dispostos paralelamente seriam, de cima para baixo: a escala vestibular, que se comunica com a orelha média pela janela oval, a escala média ou duto coclear que contém o órgão de Corti e a escala timpânica que se comunica com a orelha média por meio da janela redonda (Figura 3).

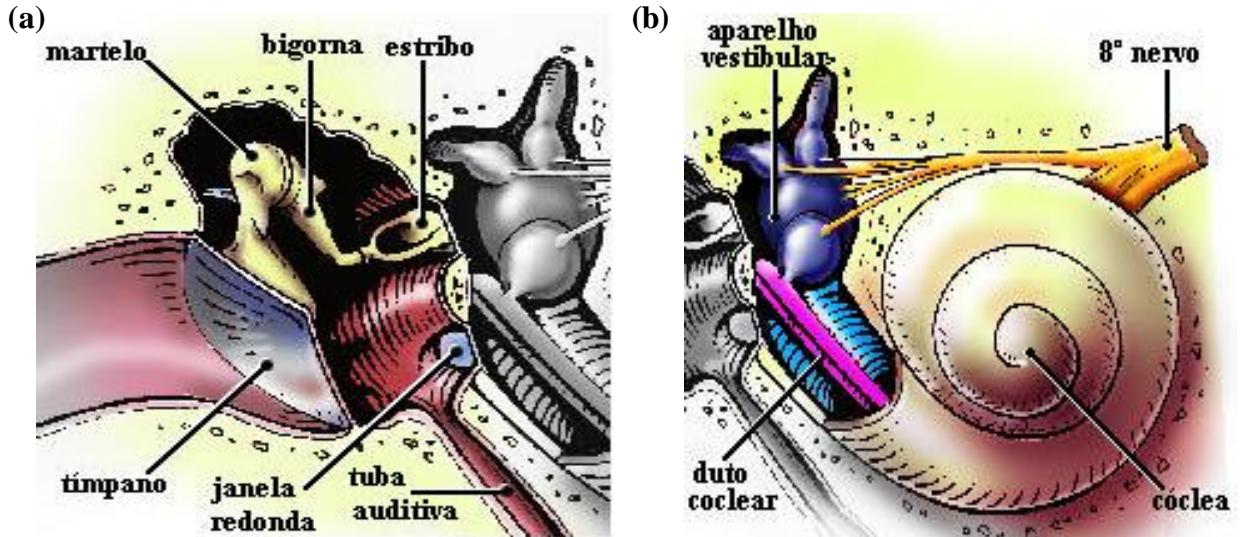


Figura 2 - Em (a) detalhe da orelha média, mostrando os ossículos (martelo, bigorna e estribo), o tímpano, a janela redonda e a tuba auditiva. Em (b) detalhe da orelha interna: vestibulo ou aparelho vestibular, oitavo nervo craniano, cóclea e duto coclear (em rosa), que abriga o órgão espiral de Corti. Figura modificada da página *Promenade round the cochlea Home Page* (Pujol e col., 2006).

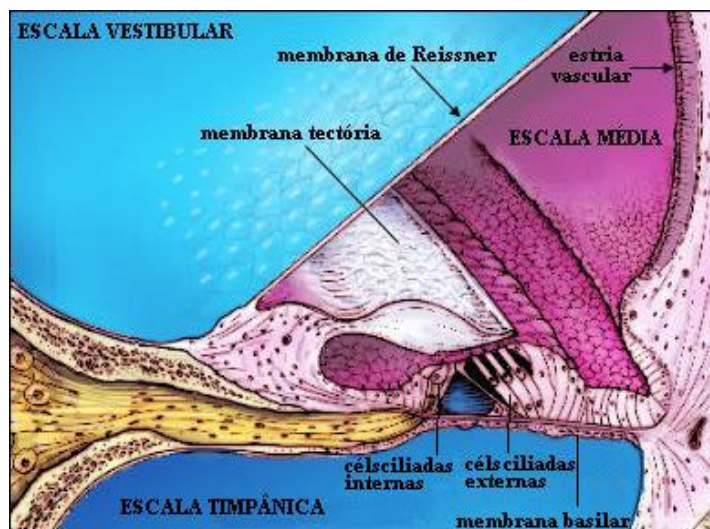


Figura 3 - Seção transversal de um dos giros da cóclea, mostrando sua divisão em três compartimentos longitudinais: em azul, a escala vestibular e a escala timpânica; em rosa, a escala média ou duto coclear. Figura modificada da página *Promenade round the cochlea Home Page* (Pujol e col., 2006).

A escala vestibular e a escala timpânica comunicam-se no ápice da cóclea e contêm fluido, com composição química semelhante à do plasma. Sua composição iônica caracteriza-se por uma alta concentração de Na^+ e baixa concentração de K^+ . Já a escala média ou duto

coclear (Figura 3) abriga o órgão de Corti e é preenchida pela endolinfa. A endolinfa é um fluido com alta concentração de K^+ e baixa de Na^+ ou seja, com composição iônica distinta da perilinfa e semelhante à do citossol. A escala vestibular está separada do duto coclear pela membrana de Reissner, enquanto a escala timpânica está separada do duto coclear pela membrana basilar, onde está situado o órgão de Corti. A diferença de composição iônica entre os diferentes compartimentos da cóclea gera o potencial endococlear, que é de fundamental importância para a transdução do som. A manutenção do potencial endococlear é realizada pela estria vascular (Figura 3), um epitélio multiestratificado que participa na reciclagem de potássio dentro do órgão de Corti, e que secreta a endolinfa (Petit, 1996; Junqueira e Carneiro, 1999; Pujol e col., 2006).

O órgão de Corti é formado por células de sustentação e por células ciliadas sensoriais (Figura 3). As células sensoriais são chamadas de ciliadas, pois apresentam em sua superfície apical dezenas dos chamados estereocílios, microvilosidades banhadas pela endolinfa e sustentadas por feixes de actina, dispostos em três fileiras. Os estereocílios estão conectados entre si formando uma unidade, havendo um filamento delgado, denominado *tip link* ou conexão de topo, conectando o topo de um estereocílio mais curto ao da fileira adjacente, mais longo.

As células ciliadas estão situadas sobre a membrana basilar em toda a sua extensão, e são divididas em dois tipos, as células ciliadas externas e as células ciliadas internas (Figura 3). Sobre as células ciliadas há uma membrana acelular, chamada de membrana tectória. Os estereocílios das células ciliadas externas ficam presos à membrana tectória, enquanto as células ciliadas internas apresentam seus estereocílios livres na endolinfa (Junqueira e Carneiro, 1999).

As células ciliadas externas estão dispostas em três fileiras sobre a membrana basilar, são banhadas pela endolinfa no pólo apical e pelas células de sustentação no pólo basal. Devido à sua característica de eletromotilidade, as células ciliadas externas contribuem para uma maior sensibilidade e discriminação das frequências através da amplificação do som. As células ciliadas externas provocam aumento na amplitude da vibração da membrana tectória, amplificando assim a energia sonora, o que aumenta a estimulação das células ciliadas internas.

As células ciliadas internas estão dispostas em uma fileira única na membrana basilar, fixadas às células de suporte e desempenham a função de transdução do som em sinais elétricos.

As células ciliadas internas e externas apresentam canais catiônicos, especialmente na porção apical dos estereocílios, que são abertos por ocasião da vibração da membrana basilar,

quando os estereocílios são inclinados ao contactar a membrana tectória. Isso causa deformação nos estereocílios, o que gera aumento da tensão nos *tip links* que os conectam. Esse aumento de tensão é o gatilho para a abertura de canais iônicos. Alguns autores supõem que esses canais estariam nas regiões basais dos estereocílios. Existe ainda uma teoria que sustenta que o movimento do tufo ciliar esticaria a membrana dos cílios, e isso seria o motivo da abertura dos canais catiônicos (Nudelmann e col., 1997).

Em resumo, o mecanismo de transdução do som em impulsos elétricos consiste em um processo de mecano-transdução. Na orelha interna, a primeira estrutura a receber o som é a janela oval, já que o estribo se encontra apoiado nela. A vibração da janela oval se transmite pela perilinfa fazendo variar as posições relativas entre a membrana basilar e a membrana tectória. A alta concentração de potássio da endolinfa gera gradientes de concentração e de potencial entre o exterior e o citoplasma das células ciliadas. A abertura dos canais permite a entrada de íons K^+ , causando despolarização da membrana das células ciliadas, que leva à abertura de canais de Ca^{++} dependentes de voltagem. O aumento de concentração desse íon no citoplasma provoca a liberação de neurotransmissores nas sinapses de fibras nervosas localizadas na base das células ciliadas internas e o padrão de potenciais de ação gerado é então conduzido até o cérebro (Petit, 1996; Kalatzis e Petit, 1998; Pujol e col., 2006).

I.2 - A deficiência auditiva

A surdez é o defeito sensorial que mais afeta a capacidade de comunicação e de maior incidência nos seres humanos, podendo ser causada por fatores ambientais, genéticos ou por uma combinação de ambos. A definição do termo surdez utilizada nesse estudo foi a de qualquer déficit ou comprometimento auditivo independente do tipo ou grau. Dessa, maneira, os termos perda ou deficiência auditiva e surdez serão usados como sinônimos, do mesmo modo que têm sido utilizados na maioria dos trabalhos de genética.

Dentre as anomalias congênitas, a surdez está presente numa frequência que varia, dependendo da amostra e da região estudada, de 1 a 7 em cada 1000 recém nascidos. Além disso, muitas outras crianças irão manifestar deficiência auditiva após o nascimento, mas antes de adquirirem a linguagem, e outras, apresentarão déficits progressivos até a segunda década de vida (Russo, 2000). Finalmente, mais de 60% das pessoas com mais de 70 anos apresentam perda auditiva em grau suficiente para que seja necessário algum tipo de intervenção para que continuem a se comunicar (Kalatzis e Petit, 1998). No Brasil, foi estimado que a cada mil nascimentos, cerca de quatro crianças apresentam perda auditiva de grave a profunda, frequência três a quatro vezes maior que nos países desenvolvidos, isso

provavelmente devido a uma maior contribuição dos fatores ambientais em nosso país (Braga, 1998).

O desenvolvimento do aparelho auditivo e seu funcionamento normal dependem da ação de vários genes. Fatores ambientais também atuam tanto no desenvolvimento do aparelho auditivo quanto no seu funcionamento. Agressões ambientais, como exposição excessiva a ruídos, patógenos, drogas, assim como mutações em genes, isoladamente ou em interação, podem levar à perda da audição. No Brasil foi estimado, na década de noventa, que as causas hereditárias contribuem com cerca de 16% dos casos de deficiência auditiva, valor que pode chegar a 60% em países desenvolvidos. Em nosso país, doenças como a rubéola materna e a meningite eram as mais frequentes causas de surdez (Braga, 1998).

Além de serem classificadas em função da etiologia, as perdas auditivas podem ser classificadas segundo a manifestação clínica, a lateralidade, a idade de manifestação, a origem do defeito, as frequências atingidas, a gravidade da perda e a evolução.

Quanto à manifestação clínica, a surdez pode ser classificada em *sindrômica* quando surge acompanhada por outras deficiências e sinais clínicos, e *não-sindrômica* quando aparece isoladamente. Quanto à lateralidade são denominadas de *bilaterais* as perdas que afetam as duas orelhas e *unilaterais* as que afetam apenas uma orelha.

Quanto à idade de manifestação, a surdez pode ser *pré-lingual* quando se manifesta antes ou durante o aprendizado da linguagem ou *pós-lingual* quando a deficiência ocorre depois que a pessoa domina a linguagem.

Apesar de certa divergência sobre como classificar as perdas auditivas quanto ao grau, a maioria dos autores utiliza a classificação sugerida por Davis e Silverman (1970). Essa classificação utiliza a média de limiares em dB obtidas em três frequências (500, 1000 e 2000Hz) para determinar o limiar da perda. Dessa maneira, a audição é considerada normal se o limiar for até 20dB. Ocorre perda auditiva leve entre 21 a 40 dB, perda auditiva moderada de 41 a 70dB, perda auditiva grave (severa) de 71 a 90 dB e perda auditiva profunda acima de 91dB.

Quanto à origem do defeito, a surdez pode ser classificada como *condutiva*, *neurossensorial* ou *mista*. Utiliza-se geralmente o termo *neurossensorial* em oposição ao termo *deficiência auditiva condutiva*, isto é, significando a ausência de problemas na captação e condução de som. Esse termo genérico pode incluir comprometimentos que resultam de problemas nas células ciliadas externas, das células ciliadas internas, do nervo auditivo e do tronco cerebral e cérebro.

Considerando-se sua evolução, a deficiência auditiva pode ser chamada de estacionária ou progressiva. Uma perda é estacionária quando ela não se altera com o tempo. Quando se apresenta primeiramente leve, tornando-se progressivamente mais grave e evolui para outras frequências, caracteriza-se então a surdez progressiva.

I.3 - A deficiência auditiva hereditária

A surdez é uma das doenças mais geneticamente heterogêneas que se tem conhecimento. Diferentes mutações no mesmo gene podem originar quadros clínicos distintos, alguns sindrômicos outros não, às vezes com diferentes padrões de herança. Além disso, perdas auditivas com características clínicas idênticas podem ser causadas por mutações em diferentes locos. Assim, torna-se difícil estabelecer correlações entre os achados clínicos e as mutações em locos específicos.

Apesar de existirem mais de 400 doenças ou síndromes que incluem a surdez como um de seus sinais clínicos, 70% dos casos de surdez hereditária são não-sindrômicos (Keats e Berlin, 1999; Lefebvre e Van de Water, 2000). Algumas das principais síndromes que apresentam surdez como um de seus sinais mais característicos são a síndrome de Waardenburg (defeitos de pigmentação e hipertelorismo), a síndrome de Treacher-Collins (com anormalidades craniofaciais), a síndrome de Usher (com retinite pigmentosa), a síndrome de Prented (com bócio), a síndrome de Alport (com problemas renais) e a síndrome brânquio-oto-renal (com defeitos craniofaciais e problemas renais).

Os diferentes locos ou regiões candidatas a conterem um ou mais genes responsáveis pelas formas de surdez não-sindrômica são chamados DFN (do inglês *DeaFNess*) e numerados segundo a ordem de descoberta. Os locos que provavelmente contêm genes de surdez autossômica dominante são denominados DFNA, os locos de surdez autossômica recessiva são chamados de DFNB e os locos que estão no cromossomo X são designados por DFN. Apenas dois locos até o momento foram identificados como modificadores e nomeados como DFNM1 e DFNM2. Já o único loco mapeado no cromossomo Y foi designado com a sigla DFNY (Van Camp e Smith, 2006).

Cerca de 80% dos casos de deficiências auditivas hereditárias não-sindrômicas apresentam herança autossômica recessiva (Van Camp e col., 1997; Zanchetta e col., 2000; Rabionet e col., 2000). Em sua maioria, as perdas auditivas de herança recessiva são neurosensoriais, estacionárias, de graves a profundas, de manifestação pré-lingual e geralmente atingem todas as frequências (Campbell e col., 1997; Keats e Berlin, 1999). Até o momento, já foram mapeados 48 locos autossômicos responsáveis por surdez recessiva e, desses, 21 tiveram os seus genes identificados (Van Camp e Smith, 2006). Apesar do grande

número de locos mapeados, o DFNB1 é sem dúvida o mais importante, já que mais de 50% dos casos de surdez não-sindrômica autossômica recessiva estão relacionados a ele (Gasparini e col., 1997).

Já as deficiências auditivas não-sindrômicas de herança autossômica dominante representam 10% a 20% dos casos de surdez. Na sua maioria elas se caracterizam por serem pós-linguais (manifestação geralmente na segunda a terceira década de vida), progressivas e neurosensoriais (Petit 1996; Van Camp e col., 1997; Van Laer e col., 1999 e Zanchetta e col., 2000). Quarenta e seis locos já foram mapeados, dos quais 24 genes já foram identificados (Van Camp e Smith, 2006). Até o momento não se observou um loco que esteja mais freqüentemente associado à surdez não-sindrômica de herança autossômica dominante, porém o loco com maior número de famílias descritas (19) é o DFNA9, onde se localiza o gene *COCH* (do inglês *coagulation factor C homology*) (Robertson e col., 1998; Fransen e col., 1999; Kok e col., 1999).

A deficiência auditiva ligada ao cromossomo X está presente em 2% a 3% dos casos de surdez (Van Camp e col., 1997; Berry e col., 2000; Lefebvre e Van de Water, 2000). São cinco os locos mapeados neste cromossomo e dois genes identificados, sendo que o loco mais freqüentemente associado aos casos de surdez ligada ao cromossomo X é o DFN3, onde reside o gene *POU3F4* que codifica um fator de transcrição (Willems e col., 2000; Van Camp e Smith, 2006).

Mais raramente a deficiência auditiva também pode apresentar herança mitocondrial, podendo estar presente em cerca de 2% dos casos de surdez (McGuirt e Smith, 1999; Abreu-Silva e col., 2006). Até o momento dois genes e oito mutações já foram descritas no DNA mitocondrial (Van Camp e Smith, 2006). A surdez de herança mitocondrial, geralmente apresenta idade de manifestação variável e gravidade variável. Algumas das mutações mitocondriais principalmente a chamada A1555G, foram relacionadas com a susceptibilidade aumentada à ototoxicidade pelos aminoglicosídeos.

I.4 - As conexinas e a surdez não-sindrômica de herança autossômica recessiva

O primeiro loco descrito como responsável por surdez não-sindrômica de herança autossômica recessiva foi o DFNB1. Ele foi identificado por Guilford e col. em 1994 por meio de estudos de ligação em duas famílias consanguíneas da Tunísia, que apresentavam surdez profunda e pré-lingual.

O primeiro gene identificado no loco DFNB1 foi o *GJB2*, que codifica a conexina 26 e está localizado na região cromossômica 13q11-12 (Kelsell e col., 1997; Zelante e col., 1997; Kelley e col., 1998; Sundstrom e col., 1999). Além da conexina 26 (Cx26, gene *GJB2*), outro

gene associado à etiologia da surdez não-sindrômica autossômica recessiva foi localizado nessa mesma região cromossômica: o gene *GJB6* que codifica a conexina 30 (Grifa e col., 1999).

As conexinas fazem parte de uma família de proteínas dos chamados canais de junção do tipo *gap* também denominados de junções comunicantes intercelulares. Estão presentes no genoma humano os genes para mais de 20 tipos de conexinas, as quais são divididas em três subfamílias de acordo com a similaridade da seqüência dos nucleotídeos e aminoácidos: α , β e γ , sendo nomeadas com a sigla Cx e de acordo com o seu peso molecular, como por exemplo, Cx26, Cx30 e Cx31 (Krutovskikh e Yamasaki, 2000; Marziano e col., 2003).

I.4.1 - Estrutura e função das conexinas

As conexinas são proteínas transmembrânicas que se hexamerizam para formar os canais chamados de conexons. Os conexons, um de cada célula, se alinham no espaço extracelular entre duas células adjacentes, por meio de ligações dissulfídicas, para formar os canais de junção do tipo *gap*, responsáveis pela regulação da passagem de íons orgânicos e pequenos metabólitos entre as células da maioria dos tecidos animais. Cada conexon é formado por seis proteínas conexinas dispostas radialmente ao redor de um poro central e pode conter um único tipo de conexina se for homomérico, ou vários tipos de conexinas, se for heteromérico. Quando dois conexons idênticos, um de cada célula, se unem, eles formam um canal homotípico, enquanto que se o canal for formado por dois conexons diferentes é chamado de heterotípico (Figura 4). Os canais de junção do tipo *gap* heteroméricos ou heterotípicos fornecem às células e tecidos que os contêm um mecanismo sensível e eficiente para regulação e controle da comunicação intercelular, podendo aumentar ou limitar a passagem de uma diversidade de moléculas, íons e pequenos metabólitos (Cottrel e Burt, 2005). Desse modo, as propriedades do canal de junção do tipo *gap* resultante será definida pelos constituintes dos seus conexons (Bruzzone e col., 2003; Chang e col., 2003).

Independente do seu peso molecular, todas as conexinas possuem uma estrutura em comum devido à similaridade entre as suas seqüências primárias (Liu e col. 2000). As conexinas possuem quatro regiões hidrofóbicas que atravessam a membrana plasmática e que correspondem aos domínios transmembrânicos, ligados entre si por duas alças extracelulares e uma alça citoplasmática, com um grupo amino-terminal e outro carbóxi-terminal em suas extremidades (Figura 5) (Bruzzone e col., 1996). Os dois domínios extracelulares são importantes para a ancoragem que ocorre entre dois conexons bem como para a compatibilidade entre eles, pois possuem resíduos de cisteína conservados, que se ligam para formar as pontes dissulfídicas. Os domínios transmembrânicos formam os poros do canal *gap*,

sendo importantes para a permeabilidade do canal. Devido ao caráter anfipático do 3º domínio transmembrânico, acredita-se que ele contribua para o alinhamento do conexon durante a formação do canal. Mutações que afetam a regulação das conexinas são mais comuns nos domínios citoplasmáticos, uma vez que se tem observado que eles possuem papel fundamental na regulação da atividade do canal de junção do tipo *gap*. As seqüências de aminoácidos são idênticas entre os diferentes tipos de conexinas em 50 a 80%, com os domínios transmembrânicos sendo os mais conservados (Chang e col., 2003).

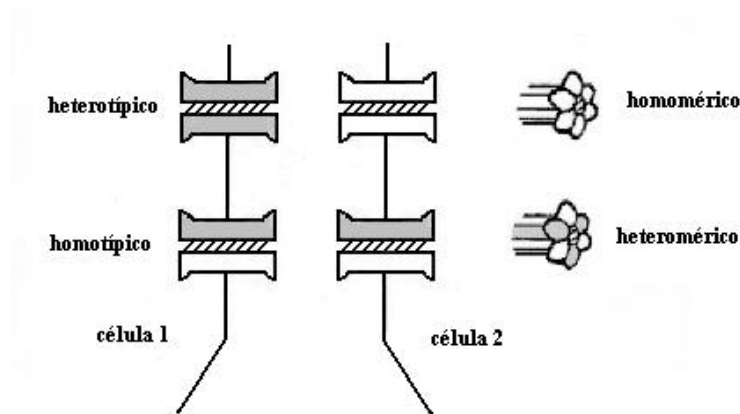


Figura 4 - Representação esquemática dos conexons. As conexinas se agregam em grupo de seis para formar os conexons, que podem ser homoméricos quando formado pelo mesmo tipo de conexina ou heteroméricos se formado por conexinas diferentes. O canal de junção do tipo *gap* se for formado por dois conexons idênticos é chamado homotípico; se for formado por dois conexons diferentes é heterotípico (Figura modificada da página http://www.nature.com/.../v20/n4/thumbs/ng1298_319.gif).

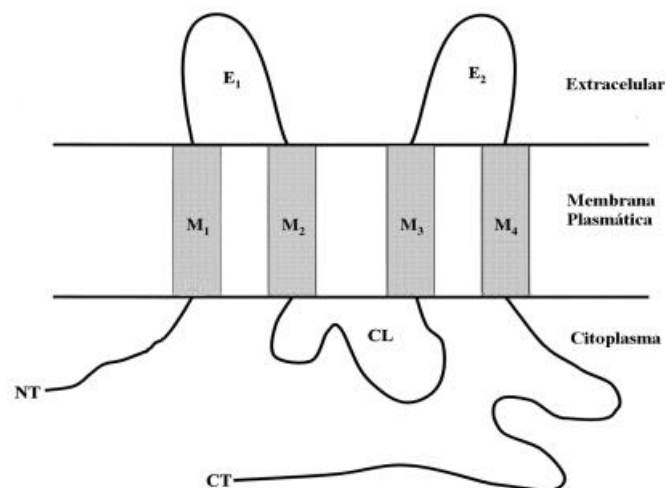


Figura 5 - Representação esquemática da organização das conexinas: M1, M2, M3, e M4 - domínios transmembrânicos; E1 e E2 - alças extracelulares; CL - alça citoplasmática; NT - domínio amino-terminal e CT - domínio carbóxi-terminal. (Figura modificada de Jun e col., 2000).

O papel específico das conexinas na homeostasia dos diferentes órgãos foi revelado pela associação das mutações nos diversos tipos de conexinas a uma variedade de doenças

genéticas (Tabela I). Diversos estudos evidenciaram a presença das proteínas conexas 26 e 30, codificadas pelos genes *GJB2* e *GJB6* respectivamente, na orelha interna, mais especificamente na cóclea (Kelsell e col., 1997; Grifa e col., 1999, Lautermann e col., 1999).

Tabela I– Resumo dos genes das conexas, local de expressão e doenças genéticas humanas associadas (Tabela modificada de Gerido e col., 2004).

Gene	Local de expressão	Doenças genéticas (humanas) associadas	OMIM
<i>GJB7</i> (Cx25)	?	?	-
<i>GJB2</i> (Cx26)	cóclea, pele, fígado, placenta, glândulas mamárias	surdez (DFNB1) surdez DFNA3 surdez com queratopauquidermia (KIDS)	220290 601544 124500 602540
<i>GJB6</i> (Cx30)	Cóclea, pele e cérebro	surdez (DFNB1) surdez (DFNA3)	220290 601544
<i>GJB4</i> (Cx30.3)	pele	eritroqueratodermia <i>variabilis</i>	133200
<i>GJB3</i> (Cx31)	placenta, pele	surdez (DFNA2) eritroqueratodermia <i>variabilis</i>	600101 133200
<i>GJB5</i> (Cx31.1)	pele	?	-
<i>GJE1</i> (Cx31.3)	?	?	-
<i>GJC1</i> (Cx31.9)	?	?	-
<i>GJB1</i> (Cx32)	fígado, oligodentrócitos, células de Schwann	Doença de <i>Charcot-Marie-Tooth</i>	302800
CX32.4	?	?	-
Cx36	neurônios	?	-
<i>GJA4</i> (Cx37)	endotélio	?	-
<i>GJA5</i> (Cx40)	coração, endotélio	?	-
Cx40.1	?	?	-
<i>GJA1</i> (Cx43)	coração, olhos, cérebro, glândula adrenal, etc	Displasia oculodentodigital (ODDD)	164200
<i>GJA7</i> (Cx45)	coração, músculo liso, neurônios	?	-
<i>GJA3</i> (Cx46)	olhos	Catarata (CZP3)	601885
<i>GJA12</i> (Cx47)	Medula espinhal, cérebro	?	-
<i>GJA8</i> (Cx50)	olhos	Catarata (CZP1)	116200
<i>GJA10</i> (Cx59)	?	?	-
Cx62	ovários	?	-

Uma das funções dos canais de junção *gap* na cóclea é de regular o transporte dos íons, principalmente dos íons potássio na endolinfa. Os canais fornecem um sistema único de separação, transferência e reciclagem dos íons, sendo responsáveis pela manutenção dos altos níveis de potássio na endolinfa, e, por conseguinte, do seu potencial endolinfático, necessário para a transdução do som de impulsos sonoros para impulsos elétricos. Os estímulos sonoros movimentam a membrana basilar e promovem a deflexão dos estereocílios permitindo um influxo dos íons potássio da endolinfa para as células ciliadas. Dessa forma, as células ciliadas ficam despolarizadas, com alta concentração de potássio intracelular. Para que nova excitação da célula seja possível, o potássio tem que ser removido. Assim, os íons potássio saem das células ciliadas em direção aos locais onde seus níveis estejam diminuídos. Uma vez que as conexas são expressas nas células de suporte, nos fibrócitos do ligamento espiral e no limbo

espiral, acredita-se que os canais de junção do tipo *gap* sejam os responsáveis pela transferência dos íons potássio em toda essa região (Figura 6) (Engel-Yeger e col., 2002).

O estudo das mutações na conexina 26 nas diferentes formas de surdez tem levado à reavaliação do papel das junções do tipo *gap* na orelha interna, onde elas estão sendo associadas a vários aspectos da transmissão do som (Rabionet e col., 2000; Bruzzone e col., 2003). Bruzzone e col., (2003) demonstraram que as principais e mais frequentes mutações da conexina 26 resultam em uma completa perda de função por parte da proteína, o que levaria à perda de capacidade de formação dos canais intercelulares, no caso os conexons. Lefebvre e Van de Water (2000) afirmaram que a perda da conexina 26 nas junções *gap* levaria à interrupção da reciclagem do potássio nas células ciliadas e à concentração elevada de potássio na endolinfa dos dutos cocleares, o que resultaria na intoxicação do órgão de Corti pelo potássio, conduzindo à perda da audição.

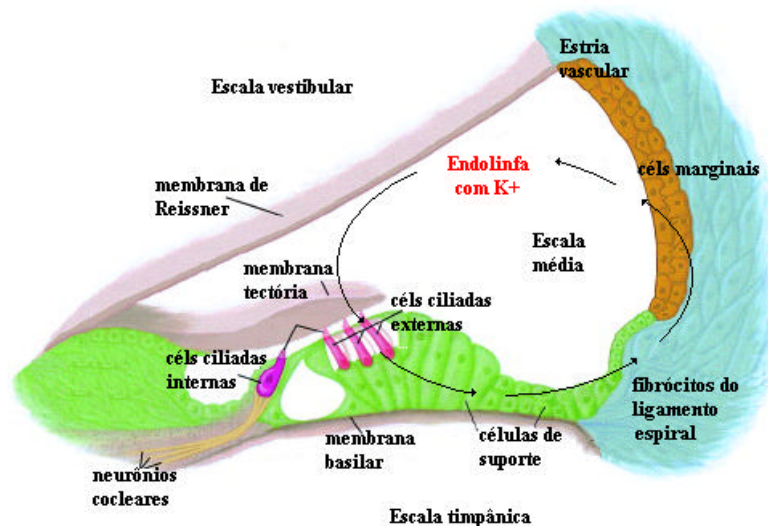


Figura 6 - Representação esquemática da reciclagem dos íons potássio na cóclea. O movimento da membrana basilar promove a abertura dos canais de junção do tipo *gap*. Os íons de potássio saem das células ciliadas em direção ao espaço extracelular no interior do órgão de Corti, para serem liberados nos espaços onde estejam com seus níveis diminuídos (Figura modificada da página <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/disease/GIFS/connexin.gif>).

I. 4. 2 - Os genes *GJB2* e *GJB6* (loco *DFNB1*)

A proteína conexina 26 codificada pelo gene *GJB2* possui 226 aminoácidos e peso molecular aproximado de 26kDa. O gene possui dois exons, sendo que o exon 1 não é codificador e apresenta uma região promotora altamente conservada entre as diferentes espécies (Figura 7) (Kiang e col., 1997).

O gene *GJB2* é pequeno, sendo que até agora mais de 100 mutações diferentes localizadas na região de código já foram descritas (Estivill e Gaparini, 2006). De todas as mutações descritas, uma única mutação, c.35delG ou 35delG, é responsável pela maioria dos

casos de surdez, com uma frequência similar às mutações mais frequentes associadas à fibrose cística (Kelley e col., 2000; Bruzzone e col., 2003). A 35delG se caracteriza pela deleção de uma base guanina (G) em uma sequência de seis guaninas, que resulta em uma mutação de quadro de leitura e leva à formação de uma proteína truncada com apenas treze aminoácidos.

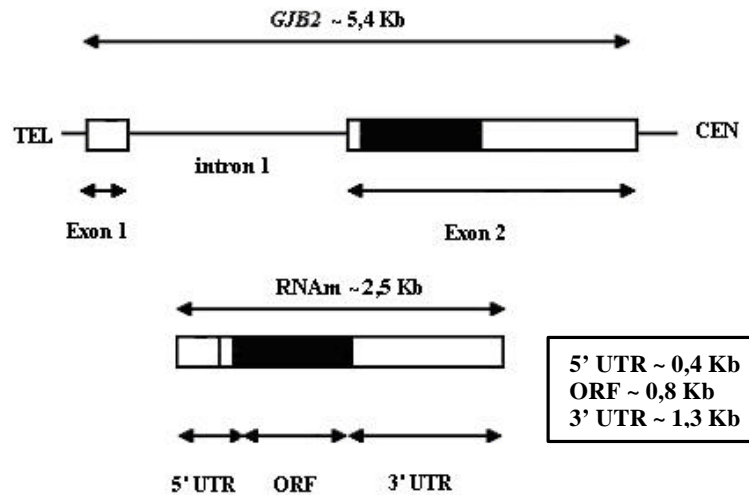


Figura 7 - Representação esquemática do gene *GJB2* (Genbank BC017048). Na figura podemos observar os dois exons, a região 5' não codificadora que inclui o exon 1, a região codificadora (em preto), o intron 1 e a região 3' UTR.

É interessante notar que a mutação 35delG resulta apenas em surdez não-sindrômica e parece não afetar outros tecidos. É possível que outras conexinas possam substituir a Cx26 nos outros tecidos e assim compensar a sua perda (Rothrock e col., 2003).

Kenneson e col. (2002), em uma revisão dos principais tipos de mutações no gene *GJB2*, indicaram que os diferentes tipos de alelos recessivos para a surdez não sindrômica têm efeitos variáveis. Em um estudo sobre a correlação entre genótipo e fenótipo nas mutações no gene da conexina 26, Cryns e col. (2004) tentaram delinear um quadro clínico, relacionando o tipo de mutação à gravidade da surdez, por meio das avaliações audiológicas dos afetados. A conclusão que chegaram é a de que a gravidade da surdez é muito variável, mesmo entre indivíduos com as mesmas mutações. Mesmo entre indivíduos homocigotos quanto à 35delG há considerável variação na gravidade e na progressão da perda auditiva (Cryns e col., 2004; Marlin e col., 2005). Além disso, acredita-se que a expressividade variável da surdez causada por mutações no gene *GJB2* resulta da participação de fatores ambientais e de outros fatores genéticos (Rabionet e col., 2000; Park e col., 2000).

Várias mutações detectadas no gene *GJB2* da conexina 26 parecem ser características de certos grupos populacionais, como a 35delG, comumente encontrada na população caucasiana, principalmente da Europa e dos EUA, a 167delT (ou c.167delT) nos judeus

askhenazi, a 235delC (ou c.235delC) nos asiáticos e a T427C (R143W) nos africanos (Broddy e col., 1998; Lerer e col., 2000; Abe e col., 2000 e Liu e col., 2002).

A maioria dos alelos mutantes até agora descritos no gene *GJB2* se comportam como recessivos na surdez pré-lingual (Kenneson e col., 2002), no entanto, algumas mutações na conexina 26 têm sido descritas como causa de surdez de herança dominante, caracterizando o loco DFNA3.

A mutação dominante C223T (ou R75W) do gene *GJB2* está localizada na junção entre o primeiro e o segundo domínio transmembrânico. Esses dois domínios possuem seqüências altamente conservadas entre as diferentes conexinas. Uma vez que a arginina está sempre presente nesse resíduo, isso leva à hipótese de que essa posição deve possuir uma importância funcional na conexina (White, 2000). Outro exemplo de mutação dominante que causa surdez não-sindrômica é a G132C (ou W44C). Isso porque a cisteína substituinte irá interferir com a formação das pontes de dissulfeto entre as conexinas adjacentes, resultando em um efeito dominante negativo (Denoyelle e col., 1998). Outras mutações como G131C (W44S), G428A (R143Q) e G605T (C202F) também já foram descritas como sendo dominantes e diversas pesquisas têm sido realizadas com o intuito de se verificar o mecanismo de ação das mesmas.

A mutação T101C (ou M34T) foi primeiramente considerada como dominante, devido ao fato de ter sido detectada em heterozigose em dois indivíduos pertencentes de uma mesma família que apresentava queratoderma palmoplantar e surdez de grau variado (Kelsell e col., 1997). Posteriormente, White e col., (1998) por meio de experimentos funcionais *in vitro* demonstraram que a proteína mutada exerce um efeito dominante negativo na conexina 26 selvagem quando são co-expressas em oócitos de *Xenopus laevis*. No entanto, a existência de indivíduos com audição normal, mas portadores da alteração M34T em heterozigose indicam que essa mutação não deve funcionar como dominante no gene *GJB2 in vivo* (Kelley e col., 1998). Posteriormente, Griffith e col. (2000) relataram uma família em que a surdez profunda (DFNB1) co-segregava com o alelo 167delT do gene *GJB2*. No entanto, a surdez não segregava com o genótipo heterozigoto composto M34T/167delT que ocorria nos indivíduos dessa família. Feldmann e col. (2004), em um estudo com 7 casos familiares franceses, relataram que essa mutação não segregava com surdez em 6 dos 7 casos. Além disso, nas famílias que possuíam membros com audiometrias normais, 8 eram heterozigotos para a M34T e 5 heterozigotos compostos para a M34T e outra mutação do gene *GJB2*, o que levou os autores a sugerirem que essa variante não é fenotipicamente significativa para os humanos e que a mesma é um polimorfismo sem efeito, freqüente na França. No entanto, Houseman e col. (2001) ao estudarem um caso de surdez de freqüências médias e altas, encontraram o

genótipo M34T/M34T associado à uma deleção em homozigose de 10pb na região 5'UTR. Em uma população controle composta por 630 indivíduos, eles identificaram 25 heterozigotos para a mutação M34T, mas nenhum homozigoto. Dos alelos M34T detectados pertencentes a esse grupo, 88% estavam em *cis* em relação a essa deleção. Nesse trabalho eles levantaram a hipótese de que a mutação M34T agiria como um alelo recessivo causando surdez em homozigose, se acompanhada em *cis* por essa deleção de 10pb.

Dentre os indivíduos com deficiência auditiva associada ao loco DFNB1, 10% a 50% apresentam somente uma única mutação recessiva no gene da Cx26 (*GJB2*), frequência essa muito superior à esperada com base somente na frequência dos heterozigotos na população geral. O alto número de afetados portadores da mutação 35delG em heterozigose entre surdos sugeria que o gene *GJB2* poderia interagir com outros genes. Em um estudo realizado com famílias de ascendência judaica ashkenazi, que possuíam uma única mutação no gene *GJB2* (35delG ou 167delT), foi encontrada também uma deleção de pelo menos 140kb a 5' do gene *GJB2*, que compreende parte do gene vizinho *GJB6* e que se encontrava em *trans* em relação às mutações no *GJB2* (Lerer e col., 2001). Os genes *GJB2* e *GJB6* estão localizados na mesma região cromossômica, DFNB1, distantes cerca de 35kb um do outro, e codificam proteínas que apresentam 77% de identidade de seqüência (Pallares-Ruiz e col., 2002). Deleções semelhantes a 5' do gene *GJB2* e que comprometem parte do gene *GJB6* foram relatadas por Pallares-Ruiz e col. (2002) e Del Castillo e col. (2002), em indivíduos afetados por surdez congênita e profunda e também portadores de apenas uma mutação no *GJB2*. Pallares-Ruiz e col. (2002) descreveram uma deleção em homozigose de pelo menos 150Kb em um indivíduo afetado por surdez profunda e congênita e em quatro famílias, nas quais os afetados eram heterozigotos para 35delG ou outra mutação de ponto. Logo, essa grande deleção era provavelmente a segunda mutação. Del Castillo e col. (2002) conseguiram identificar e caracterizar melhor essa deleção de 342Kb[Δ (*GJB6*-D13S1830)] presente em 22 dentre 33 indivíduos com apenas uma mutação no gene *GJB2*. Essa deleção foi chamada de del(*GJB6*-D13S1830) e revelou-se como a mutação mais freqüente entre afetados por surdez pré-lingual na população espanhola, depois da mutação 35delG. Mais recentemente o isolamento e o seqüenciamento do ponto de quebra da junção dessa deleção revelou que o segmento de DNA deletado tem 309kb e não 342kb, como havia sido descrito anteriormente (Del Castillo e col., 2003). Ainda não foi elucidado se as deleções descritas por esses três grupos de pesquisadores são exatamente a mesma mutação.

Recentemente Del Castillo e col. (2005) caracterizaram uma outra grande deleção de 232kb presente no gene *GJB6*, nomeada del(*GJB6*-D13S1854). Essa deleção foi identificada em *trans* em indivíduos surdos da população espanhola que já haviam sido caracterizados

previamente como portadores de uma única mutação patogênica no gene *GJB2*. O estudo do ponto de quebra dessa deleção sugere que a sua origem é devida a uma recombinação homóloga desigual entre duas seqüências *Alu*, uma proximal situada no intron 2 do gene *GJB6* e outra distal situada no intron 4 do gene *CRYL1* (Figura 8). O gene *CRYL1* codifica uma proteína denominada de cristalina, que é expressa no cristalino de mamíferos. Na del(*GJB6*-D13S1830), esse gene é totalmente deletado (Figura 8).

Esses trabalhos sugerem que o DFNB1 é um loco complexo, já que contêm dois genes, o *GJB2* e o *GJB6*, ambos associados à deficiência auditiva. A presença de duas mutações em genes diferentes levando à deficiência auditiva sugere que os produtos desses genes de conexinas interagem entre si, formando conexons heteroméricos e/ou heterotípicos, como foi sugerido pelo trabalho de Marziano e col. (2003) que demonstraram a co-localização celular dessas duas proteínas. Uma outra hipótese é a existência em *cis* de um elemento regulatório responsável pela ativação da expressão do gene *GJB2* na orelha interna. Na presença dessas deleções esse elemento seria removido e a sua ausência levaria a alterações na expressão do gene *GJB2* (Common e col., 2005; Del Castillo e col., 2005).

O gene *GJB6* da conexina 30 que codifica uma proteína com 261 aminoácidos foi clonado pela primeira vez por Grifa e col. (1999). Diferentes bancos de dados (*Genbank*, *Ensembl*, *UniGene*) e a maioria dos estudos genéticos relacionados as alterações no gene *GJB6* que causam surdez não-sindrômica de herança autossômica recessiva utilizam como referência o cDNA obtido de cérebro humano, onde a forma expressa do gene *GJB6* contêm 3 exons, sendo apenas o último exon codificante. Na figura 8, podemos observar um esquema da estrutura do gene *GJB6*, bem como a posição relativa das mutações del(*GJB6*-D13S1830) e del(*GJB6*-D13S1854). Ao contrário do gene *GJB2*, até o momento nenhuma mutação de ponto no gene *GJB6* foi associada à surdez recessiva não-sindrômica.

Estudos diversos já demonstraram a expressão da proteína conexina 30 na cóclea de camundongos, sendo que a conexina do camundongo e a conexina humana possuem 93% de homologia (Grifa e col., 1999, Lautermann e col., 1999). Recentemente, Essensfelder e col. (2005), por meio da análise em diferentes bancos de dados, identificaram três clones diferentes do gene *GJB6* da conexina 30, dois provenientes de cDNA de cérebro humano (BC038934 e AJ005585) e um proveniente de cDNA de glândula tireóide (AK075247). As análises desses três clones demonstraram que esse gene pode possuir até 6 exons, sendo que apenas o exon 6 é codificante (Figura 9). A presença dos outros 5 exons não codificantes vai depender de onde as suas isoformas serão expressas. Nesse mesmo estudo foi realizada a análise da expressão da conexina 30 nos queratinócitos humanos, mais especificamente em bulbos capilares, sendo constatada a presença de três transcritos diferentes. Esses resultados

demonstram que a estrutura do gene *GJB6* é mais complexa do que a de outras conexinas já descritas e que mais estudos de expressão são necessários para esclarecer o panorama completo de *splicing* do gene *GJB6* que parece estar também relacionado ao uso de promotores alternativos.

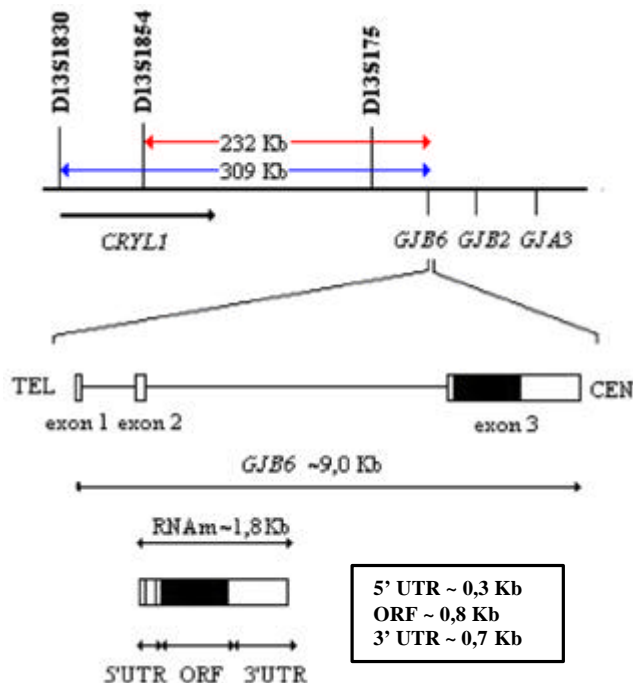


Figura 8 – Representação esquemática da região do loco DFNB1 onde está contido o gene *GJB6*. A posição dos marcadores genéticos D13S1830, D13S1854 e D13S175 estão indicados nas barras verticais, a extensão das duas deleções estão identificadas pelas barras horizontais; em azul temos a *del(GJB6-D13S1830)* e em vermelho, a *del(GJB6-D13S1854)*. É possível observar a estrutura do gene *GJB6* (*Genbank* BC038934), a região 3'UTR que contém os dois exons não codificantes, a região codificadora (em preto) e a região 3'UTR (Figura modificada de Del Castillo e col., 2005).

I. 5 - Os principais tipos de mutações nas conexinas encontradas em amostras de deficientes auditivos

A 35delG, de todas as mutações que têm sido descritas no gene *GJB2* da conexina 26, é a mais frequentemente associada a surdez de herança autossômica recessiva. Essa mutação foi encontrada em 70% dos casos de surdez decorrentes de mutações no loco DFNB1, quando os afetados são caucasianos, principalmente dos Estados Unidos e da região mediterrânea da Europa (Gasparini e col., 2000) e é aparentemente mais rara nas populações de origem asiática e africana.

A mutação 35delG foi primeiramente identificada por Zelante e col. em 1997, em pacientes afetados por surdez autossômica recessiva não sindrômica pertencentes a famílias da Espanha, Itália e Israel. Carrasquillo e col. (1997) detectaram a mutação 35delG como

sendo a segunda mutação presente em dois pacientes surdos não sindrômicos de um vilarejo da região da Baixa Galiléia. Já Denoyelle e col., também em 1997, em um estudo com famílias caucasianas com surdez, verificaram a presença da mutação 35delG em 62 alelos mutantes pertencentes a 39 famílias das 65 estudadas.

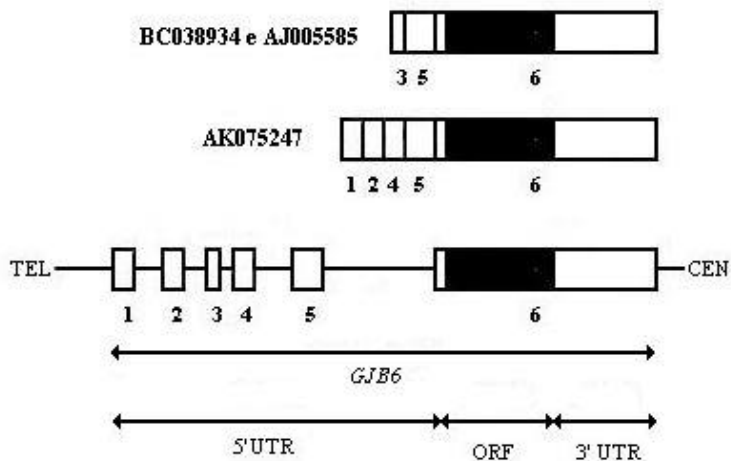


Figura 9 - Representação esquemática dos três diferentes clones identificados e seus respectivos exons e do gene *GJB6*. Na estrutura do gene *GJB6* podemos observar a região 5' não codificadora formada pelos cinco primeiros exons e seus respectivos introns e parte do exon 6, a região codificadora formada pelo exon 6 e a região 3' UTR (Figura modificada de Essenfelder e col., 2005). A presença dos exons de 1 a 5 depende do local de expressão.

Rabionet e col. (2000) estudando o gene *GJB2* em 576 casos de surdez familiares e esporádicos da Itália e da Espanha, relataram uma frequência da mutação 35delG em 88% dos alelos mutados do gene *GJB2* nos pacientes italianos e em 55% dos casos espanhóis.

Na Turquia, Tekin e col. (2001) em um estudo com 11 grandes famílias de afetados por surdez, encontrou que em 7 delas (64%) a causa era a mutação 35delG. Na população surda iraniana, as mutações no gene *GJB2* foram responsáveis pela surdez em 11% dos casos familiares, sendo a mutação 35delG identificada em homozigose em 44% dos propósitos e em 33,3% em heterozigose associada a outras mutações (Najmabadi e col., 2002). Em outras populações, como as da República Theca e da Hungria, essa mutação foi responsável por 82,8% e 52%, dos casos de surdez familiares, respectivamente (Toth e col., 2004).

Em uma amostra composta por 183 indivíduos com surdez no Sudão a mutação 35delG apareceu em homozigose em apenas 5 afetados, enquanto que nesse mesmo estudo, mas com uma amostra formada por 406 afetados por surdez do Quênia, ela não foi identificada (Gasmelssed e col., 2004). Esses dados sugerem que a frequência da mutação 35delG nas populações africanas é menor do que nas caucasianas.

Oliveira e col. (2002) realizaram um estudo com 62 pacientes brasileiros surdos da região de Campinas. Caracterizaram a mutação 35delG como a responsável pela surdez em 10 casos (16,1%).

Alvarez e col. (2003) descreveram dois casos de surdez em indivíduos homocigotos para a 35delG, cujos pais biológicos não eram portadores da mutação. Um estudo de segregação de marcadores genéticos polimórficos mostrou dissomia uniparental materna (UPD) do cromossomo 13, causando homocigose para essa mutação. Esses dois pacientes representam a primeira descrição de UPD do cromossomo 13 com um fenótipo anormal e o primeiro caso de UPD resultando em surdez não síndrômica. Já Shalev e Hujirat (2004) descreveram o primeiro caso de uma mutação “de novo” no gene *GJB2* da conexina 26 levando à surdez. O paciente era portador das mutações 35delG e C551G (R184P), sendo seu pai portador da mutação 35delG e a mãe não era portadora de nenhuma das duas mutações em questão. A análise de segregação com marcadores polimórficos confirmou a presença da contribuição biparental.

A mutação 167delT, comumente identificada na população judia askhenazi, foi responsável por 70% dos casos de surdez estudados na população de Israel (Lerer e col., 2000). Sobe e col. (2000) seqüenciando a região de código do gene *GJB2* em 75 pacientes surdos de Israel, encontraram que 39% desses casos eram devidos a mutações no gene *GJB2*, sendo a maioria devidos às mutações 35delG e 167delT.

A mutação 235delC também parece ser específica para um grupo populacional, nesse caso para os orientais, não tendo sido detectada em outras populações. Abe e col. (2000) caracterizaram a mutação 235delC como sendo responsável por 73% dos casos de surdez recessiva na população japonesa, enquanto que na população chinesa ela foi identificada por Liu e col. (2002) em 81% dos casos de surdez familiar. A mutação 35delG não foi detectada em nenhum desses pacientes.

Brobbly e col. (1998), em um estudo realizado com 21 indivíduos afetados por surdez pertencentes a 11 famílias de um vilarejo da República de Ghana (África), identificaram a mutação R143W (ou T427C) em homocigose. Posteriormente, Hamelmann e col. (2001), em uma amostra composta por 365 indivíduos surdos, caracterizaram essa mesma mutação como sendo a mais freqüente na República de Ghana. Encontraram a proporção de 90% da mutação R143W entre todas as mutações no gene *GJB2*, tendo ela sido detectada em homocigose em 51 propósitos.

Na tabela II podemos observar um resumo das diferentes variantes no gene *GJB2* encontradas em indivíduos surdos de diversos países. Uma lista de todas as variantes do gene da conexina 26, patogênicas ou não, podem ser encontradas na página *The Connexin-deafness Homepage* (Estivill e Gasparini, 2006).

Assim como as mutações no gene *GJB2*, as freqüências das mutações del(*GJB6*-D13S1830) e del(*GJB6*-D13S1854) do gene *GJB6* parece variar nos diferentes grupos

populacionais. Alguns trabalhos têm sido realizados a fim de verificar as suas frequências em grupos étnicos distintos.

Del Castillo e col. (2003), em um estudo multicêntrico, determinaram que a frequência da mutação del(*GJB6*-D13S1830) entre indivíduos heterozigotos com uma única mutação detectada no gene *GJB2* (provenientes da Espanha, França, Bélgica, Reino Unido, Israel, EUA, Brasil e Austrália) variou de 7% a 71%. No Brasil, a del(*GJB6*-D13S1830) foi encontrada em apenas um indivíduo dos nove pacientes surdos previamente caracterizados como portadores de um alelo recessivo para o gene *GJB2* (Del Castillo e col., 2003). Em um estudo recente na República Tcheca, com 13 afetados por surdez inespecífica, Seeman e col. (2005) identificaram apenas um heterozigoto para a del(*GJB6*-D13S1830) do gene *GJB6* em combinação com a mutação 35delG. Outros estudos têm demonstrado que a del(*GJB6*-D13S1830) não é frequente nas populações austríaca, chinesa, turca, iraniana, siberiana e italiana (Uyguner e col., 2003; Roux e col., 2004; Najmabadi e col., 2005).

Já a del(*GJB6*-D13S1854) se mostrou até o momento restrita a poucas populações, se comparada à del(*GJB6*-D13S1830). Em um estudo com indivíduos afetados heterozigotos para mutações no gene *GJB2* foi verificada a frequência para a mutação del(*GJB6*-D13S1854) de 25,5% na Espanha, 22,2% no Reino Unido e 1,9% no norte da Itália. No Brasil, nesse mesmo estudo, foi detectada uma frequência de 6,3% para a del(*GJB6*-D13S1854), mas os estudos sobre essa deleção são poucos, uma vez que ela foi descrita em julho de 2005 (Del Castillo e col., 2005).

I. 6 - A frequência das mutações nos genes das conexinas 26 e 30 nas diferentes populações de ouvintes

O tipo e a frequência das mutações do gene *GJB2* que codifica a conexina 26 parece variar em função da composição étnica da população estudada. Nas diversas populações normais européias pesquisadas, foi encontrada uma alta frequência de portadores heterozigotos em relação à mutação 35delG, enquanto que em populações de origem oriental, como a japonesa, a chinesa e a taiwanesa, não foi encontrada essa mutação com uma frequência significativa (Kudo e col., 2000; Liu e col., 2002, Wang e col., 2002).

Na população brasileira, a frequência de heterozigotos para a mutação 35delG foi estimada em 1% em uma amostra de recém nascidos da região de Campinas composta predominantemente de indivíduos brancos (Sartorato e col., 2000). Recentemente Oliveira e col. (2004), em um estudo com a população brasileira, observaram uma frequência de 2% de heterozigotos em uma amostra composta por 100 indivíduos brancos normais, tendo encontrado apenas um portador da 35delG na amostra formada por 100 afro-brasileiros

provenientes da cidade de Salvador, Bahia. Nesse mesmo estudo eles não detectaram nenhum portador da mutação 35delG dentre 107 brasileiros descendentes de japoneses.

Tabela II - Resumo das variantes presentes na conexina 26 em diversos países. Variantes marcadas com (*) são consideradas não patogênicas e as demais consideradas patogênicas. As variantes marcadas com o sinal (†) são aquelas que ainda não foram compiladas na página: *The Connexin-deafness Homepage* (Estivill e Gasparini, 2006).

PAÍS	VARIANTES PRESENTES NO GENE DA CONEXINA 26	REFERÊNCIAS
Austrália	35delG, W24X, M34T*, I35S, V37I, 167delT, C53R ⁺ , W77R, L90P, 333-334delAA, T123N ⁺ , R127C ⁺ , R143W, R184W	Dahl e col. (2001)
	delE118, R184P	Denoyelle e col. (1997)
Áustria	35delG, W24X, A88S, L90P, delE120, V153I*	Frei e col. (2002)
	IVS1+1G→A, 35delG, I20T, M34T* 167delT, R75W ⁺ , V84L, L90P, 314del14, R143Q, G160S*, M163V ⁺ ,	Janecke e col. (2002)
Bélgica (com Itália e Espanha)	IVS1+1G→A, 35delG, W24X, V37I, 167delT, W77R, L90P, V95M, 313del14 ⁺ , delE120, R143W, E147K, R184P,	Cryns e col. (2002)
Brasil	35delG, V27I*, V37I, V95M, delE120	Oliveira e col. (2002)
Coreia	35delG, 176-191del16, S85P, 299-300del2 ⁺ , R143W, I203T*	Park e col. (2000)
China	35delG, V37I, 235delC, 299-300delAT,	Liu e col. (2002)
Eslováquia	35delG, W24X, V37I, L90P, R127H, V153I*	Minarik e col. (2003)
Espanha (e Itália)	M1V, G12V, 35delG, 35insG, S19T, W24X, M34T*, V37I, E47X, 167delT, Y65X, W77R, F83L*, L90P, 312del14, 333-334delAA, E114X ⁺ , delE120, R127H, R143W, A149T, P173R, R184	Rabionet e col. (2000)
Estados Unidos	Branços IVS1+1G→A, L10P ⁺ , 31del14, 35delG, K15T, R32C, M34T*, W44C, E47X, 167delT, P70A ⁺ , P70S ⁺ , 182M, V84A ⁺ , V84M ⁺ , L90P, 269insT, V95M, H100Y, 299-300delAT, 312del14, V27I+E114G, delE120, R143W, E147K, R184Q ⁺ , K224Q	Pandya e col. (2003)
	Hispânicos 35delG, R32C, V37I, E47X, K122I, R143W, Y152X ⁺ , N206S	
	Negros 35delG, R143W	
	Asiáticos 35delG, V37I, 235delC, V27I+E114G, 408insA ⁺	
	Judeus-Ashkenazi 35delG, 167delT	Morell e col. (1998)
Finlândia	35delG, M34T*, V37I	Lopponen e col. (2003)
França	35delG, W24X, R32H, V37I, A40E, E47X, 167delT, Q57X, W77R, 235delC, L90P, 269insT, V95M, 313del14 ⁺ , 333-334delAA, delE120, S139N, R184P, C211X ⁺	Feldmann e col. (2004)
	IVS1+1G→A, 35delG, W24X, W44X, E47X, Q57X, C64X, 312del14, delE120, R143W, R184P, N206S	Roux e col. (2004)
França	-3170G→A, 35delG, 312del14, 333-334delAA, 509insA, P175T	Denoyelle e col. (1998)
França (Corsega)	35delG	Lucotte e col. (2001)
Ghana	35insG, L79P, R143W, V178A, R184Q, A197S, I203K, L214P,	Hamelmann e col. (2001)
Grécia	35delG, R127H, R184P, K224Q ⁺	Antoniadi e col. (2000)

PAÍS	VARIANTES PRESENTES NO GENE DA CONEXINA 26	REFERÊNCIAS
Hungria	31del14, 35delG, S17Y ⁺ , S19T, W24X, R32C, M34T*, V37I, E47X, 167delT, G59V ⁺ , 235delC, L90P, 313del14, R127H, A149T ⁺	Toth e col. (2004)
Índia	35delG, W24X, R143W	Maheshwari e col. (2003)
Itália (Sicília)	35delG, 167delT	Salvinelli e col. (2003)
Itália	IVS1+1G→A, 31del14, 35delG, M34T, Q47X, 167delT, L90P delE118, R184P	Orzan e col. (1999)
	35delG, E47X, 167delT, L90P, 314del14, delE120, R184R,	Murgia e col (1999)
	35delG, I20T, E47X, 167delT, L90P, V95M, 284ins/dup ⁺ , D159V ⁺ , R184P, delE120	Gualandi e col. (2002)
	IVS1+1G→A, 35delG, 167delT, L90P, R184P	Mesolella e col. (2004)
Irã	35delG, W24X	Najmabadi e col. (2002)
Irã (Curdos)	IVS1+1G→A, 35delG, R32H, delE120, R127H, R184P,	Mahdieh e col. (2004)
Israel (Judeus)	35delG, 51del12insA, 167delT,	Sobe e col. (2000)
Japão	V37I, G45E, 176-191del16, 235delC, Y136X, , T86R ⁺ , 299-300delAT, R143W, 605ins46	Ohtsuka e col. (2003) Yan e col. (2003)
Jordânia	35delG	Medlej-Hashim e col. (2002)
Libano	35delG	Denoyelle e col. (1997)
Marrocos	35delG	Lench e col. (1998)
Nova Zelândia	31del38, 35delG	Denoyelle e col. (1997)
Palestina	35delG, 167delT, T229C ⁺ , 235delC	Shahin e col. (2002)
Polônia	IVS1+1G→A, 35delG, M34T*, Q47X, 313del14, R184P	Wiszniewsk e col. (2001)
Quênia	3426G→A ⁺	Gasmelseed e col. (2003)
Reino Unido	35delG, 167delT	Parker e col. (2000)
Rússia	35delG	Zinchenko e col. (2003)
Sudão	35delG, 3318-34C→T ⁺ , 3697G→A ⁺	Gasmelseed e col. (2003)
Suíça	35delG, M34T, V37I, 167delT, 313del14 ⁺ , delE120,	Gurtler e col. (2003)
Taiwan	235delC, 299-300delAT, R184Q	Wang e col. (2002)
Tailândia	W24X, M34L*, 235delC	Kudo e col. (2001)
Tunísia	35delG, E47X	Ben Arab e col. (2000)
Turquia	35delG, W24X, 235delC, Q80R, delE120, R127H,	Uyguner e col. (2003)

Identificada pela primeira vez por Zelante e col. (1997), a frequência da mutação 167delT em heterozigose entre judeus ashkenazi normais encontrada nesse estudo foi de 4%. Em outras populações a mutação 167delT é rara e não tem sido detectada (Morell e col., 1998; Sobe e col., 1999; Sobe e col., 2000). Em um estudo com a população branca normal de

Nova Iorque, Fitzgerald e col. (2004) detectaram uma frequência de 0,24% de heterozigotos para a mutação 167delT.

Já a mutação 235delC, até o momento, só foi identificada em populações asiáticas, especialmente entre japoneses, chineses e coreanos, com uma frequência de portadores estimada em 1% (Yan e col., 2003; Li e col., 2003).

Na Tabela III podemos observar as frequências das mutações 35delG, 167delT e 235delC encontradas em diversas populações de indivíduos ouvintes.

Diferentes estudos têm tentado explicar a alta frequência das principais mutações no gene *GJB2* e mais especificamente da mutação 35delG nas diversas populações com as hipóteses de *hot spot* mutacional ou de efeito de um ancestral fundador em comum. Como essas mutações parecem características de certos grupos populacionais e não são frequentes em todas as populações, a hipótese de um fundador é mais plausível do que a de um *hot spot* mutacional (Bruzzone e col., 2003; Yan e col., 2003; Snoeckx e col., 2005a). Nance e col. (2000) sugeriram que a alta frequência das mutações no loco DFNB1 estaria relacionada com o casamento preferencial entre surdos, uma vez que esses grupos se segregaram durante os séculos XVIII e XIX devido à aquisição da linguagem dos sinais e a introdução de centros educacionais específicos para a população surda.

Além disso, a alta frequência de portadores das mutações recessivas do gene *GJB2* na população sugere que possa existir uma vantagem seletiva dos heterozigotos, que compensaria um possível efeito da surdez no valor adaptativo dos afetados. Ao estudar uma família de surdos, na qual a mutação T427C (R143W) foi identificada em homozigose entre os afetados, Meyer e col. (2002) verificaram que a epiderme era significativamente mais espessa entre os indivíduos heterozigotos ou homozigotos para essa mutação em relação aos indivíduos da mesma família que não a possuíam. Eles também observaram que, embora o volume de suor fosse similar entre esses indivíduos, as concentrações de sódio e cloro presentes eram maiores entre os homozigotos para essa mutação do que nos outros grupos. É importante lembrar que a conexina 26 é expressa não somente na orelha interna, mas também na epiderme embrionária, palmoplantar, nas glândulas sudoríparas e outros tecidos. Foi sugerido que essa alteração, R143W, era compatível com a produção de um meio osmoticamente desfavorável para a colonização de microorganismos e que estaria associado a um mecanismo de proteção da pele contra a invasão de patógenos, traumas e picadas de insetos. Dois outros estudos sugerem a vantagem seletiva dos portadores heterozigotos das mutações recessivas do gene *GJB2*. Em um desses trabalhos, realizado por Tran Van Nhieu e col. (2003), foi avaliada a eficiência da disseminação da bactéria *Shigella flexneri*, por meio de estudos funcionais *in vitro*, em culturas de células HeLa que expressavam a conexina 26

selvagem e a conexina 26 com mutações recessivas responsáveis por surdez. Após multiplicação dessa bactéria nas culturas e posterior incubação, eles observaram que o número de células infectadas nas culturas HeLa que expressavam a conexina 26 associada a mutações recessivas era significativamente menor em relação ao número de células infectadas nas culturas HeLa que expressavam a conexina 26 selvagem. Eles também observaram que o número de células infectadas era reduzido se fossem adicionados bloqueadores das junções *gap* nas culturas que expressavam a conexina 26 selvagem. Esses resultados sugeriram a evidência de que a *Shigella flexneri* induz a abertura dos canais de junção do tipo *gap*, por meio de uma série de eventos sinalizadores, para facilitar a sua invasão na célula e conseqüentemente a sua disseminação. Já no estudo de Commom e col. (2004) foi estudada a viabilidade *in vitro* de linhagens celulares de queratinócitos e fibroblastos humanos com mutações que causam surdez não-sindrômica nos genes *GJB2* e *GJB6*. Nesse trabalho foi verificado o número de células mortas em culturas de células que expressavam tanto as conexinas 26 e 30 selvagens, quanto as conexinas 26 e 30 associadas às mutações responsáveis por surdez não-sindrômica. Após 48 horas de incubação, foi verificado que o número de células mortas nas culturas que expressavam as conexinas selvagens era significativamente maior em relação às culturas que expressavam as conexinas 26 e 30 mutadas. Desse modo, os heterozigotos para as mutações recessivas nos genes das conexinas 26 e 30 poderiam ter uma vantagem seletiva em relação aos portadores das conexinas 26 e 30 selvagens, relacionada com a maior sobrevivência celular.

Tabela III - Frequência de portadores heterozigotos das mutações 167delT, 235delC e 35delG em várias populações de ouvintes (Tabela modificada de Van Laer e col., 2001).

População	nº de indivíduos	167delT	235delC	35delG	Referências
EUROPA					
Áustria	110	-	-	0,9%	Janecke e col. (2002)
Áustria/oriental	120	-	-	1,7%	Frei e col. (2002)
Áustria/ocidental	672	-	-	0,9%	Loffler e col. (2001)
Austria/oeste	672	-	-	0,9%	Loffler e col. (2001)
Alemanha	71	-	-	4,2%	Zoll e col. (2003)
Alemanha	200	-	-	2%	Gasparini e col. (2000)
Bélgica	190	-	-	0,5%	Gasparini e col. (2000)
Bélgica	360	-	-	2,5%	Storm e col. (1999)
Bulgária	157	-	-	0,64%	Gasparini e col. (2000)
Dinamarca	95	-	-	2,1%	Gasparini e col. (2000)
Estônia	113	-	-	4,4%	Gasparini e col. (2000)
Eslovênia	182	-	-	0,5%	Gasparini e col. (2000)
Espanha	200	-	-	2,5%	Gasparini e col. (2000)
Espanha	130	-	-	2,3%	Estivill e col. (1998)
Finlândia/norte	313	-	-	1,3%	Lopponen e col. (2003)
França	6293	-	-	1,53%	Roux e col. (2004)
França/Ilha de Córsega	328	-	-	3,35%	Lucotte e Pinna (2003)
França	512	-	-	2,73%	Lucotte e col. (2001)
França/Paris	200	-	-	0,5%	Gasparini e col. (2000)
França Bretanha	96	-	-	2,5%	Gasparini e col. (2000)
França	68	0%	0%	0%	Denoyelle e col. (1997)
Grécia	400	-	-	3%	Gasparini e col. (2000)

População	nº de indivíduos	167deIT	235deIC	35deIG	Referências
Grécia/Atenas	395	-	-	3,5%	Antoniadi e col. (1999)
Hungria/nordeste	500	-	-	2,7%	Toth e col. (2004)
Holanda	89	-	-	0%	Gasparini e col. (2000)
Itália/Sardenha	116	-	-	3,4%	Gasparini e col. (2000)
Itália	255	-	-	3,1%	Gasparini e col. (2000)
Itália/Milão	150	-	-	4,0%	Estivill e col. (1998)
Malta	144	-	-	2,8%	Gasparini e col. (2000)
Noruega	190	-	-	0,5%	Gasparini e col. (2000)
Polónia	150	-	-	3%	Wiszniewski e col. (2001)
Polónia/judeus-ashkenazi)	551	-	-	1,4%	Morel e col. (1998)
Portugal/Lisboa	179	-	-	2,2%	Gasparini e col. (2000)
República Tcheca	296	-	-	3,4%	Seeman e col. (2004)
República Tcheca/ Praga	195	-	-	2,05%	Gasparini e col. (2000)
Reino Unido/ Manchester	119	-	-	0%	Gasparini e col. (2000)
Turquia	429	-	-	1,17%	Uyguner e col. (2003)
Turquia	674	0%	-	1,78%	Tekin e col. (2001)
Turquia/Istambul	150	-	-	2,7%	Gasparini e col. (2000)
Países Turcos	136	-	-	0%	Tekin e col. (2003)
ÁSIA					
Arábia	58	-	-	1,7%	Gasparini e col. (2000)
Azerbaijão	75	-	-	0%	Tekin e col. (2001)
China	100	-	0,5%	-	Xiao e col.(2004)
China	150	-	1,3%	-	Liu e col. (2002)
Coreia/Norte e Sul	100	-	1%	0%	Park e col. (2000)
Índia	60	-	-	0%	RamShankar e col. (2003)
Irã	83	-	-	1,2%	Najmabadi e col. (2002)
Israel (judeus ashkenazi)	467	24,2%	0%	0,2%	Sobe e col. (1999)
Iraque (judeus)	115	-	-	0,9%	Gasparini e col. (2000)
Japão	96	0%	2,1%	0%	Abe e col. (2000)
Japão	50	0%	0%	0%	Fuse e col. (1999)
Japão	63	0%	0,9%	0%	Kudo e col. (2000)
Kazaquistão	50	-	-	0%	Tekin e col. (2001)
Líbano	300	-	-	2,3%	Mustapha e col. (2001)
Oman	280	0%	-	0%	Simsek e col. (2001)
Palestina	400	0,25%	0%	0%	Shahin e col. (2002)
República do Iêmen (judeus)	13	-	-	0%	Gasparini e col. (2000)
República de Altai	130	-	4,6%	0%	Posukh e col. (2005)
Tailândia	205	-	-	0%	Wattanasirichaigoon e col. (2004)
ÁFRICA					
Egito	95	-	-	0%	Gasparini e col. (2000)
Egito	129	-	-	4,1%	Tekin e col. (2001)
Tunísia	236	-	-	1,3%	Onay e col. (1998)
AUSTRÁLIA					
Austrália	1000	-	-	1%	Dahl e col.(2001)
AMÉRICA					
Judeus ashkenazi Nova Iorque/EUA	1012	3,96%	-	0,69%	Dong e col. (2001)
EUA (oeste)	314	-	-	8,6%	Lim e col. (2003)
Branços/EUA	173	-	-	0,6%	Morell e col. (1998)
Branços/EUA	100	-	-	1%	Scott e col. (1998)
Branços/EUA	96	-	-	2%	Kelley e col. (1998)
Branços/EUA	560	-	-	2,5%	Green e col. (1999)
Negros/EUA	173	-	-	0%	Morell e col. (1998)
Negros/EUA	190	-	-	0%	Gasparini e col. (2000)
Asiáticos/indianos, japoneses e coreanos	52	-	-	0%	Morell e col. (1998)
Judeus ashkenazi/EUA	551	-	-	0,7%	Morell e col. (1998)
Brasil	620(neonatos)	-	-	0,97%	Sartorato e col. (2000)
Brasil - Brancos	100	-	-	2%	Oliveira e col. (2004)
Brasil - Negros	100	-	-	1%	
Brasil - Asiáticos	107	-	-	0%	

II - OBJETIVOS

II - OBJETIVOS

O objetivo desse estudo foi caracterizar os tipos e estimar a frequência das mutações dos genes das conexinas 26 e 30 em uma casuística de 300 indivíduos com distúrbios de audição da população brasileira.

Com esse estudo pretendemos avaliar a importância das mutações dos genes das conexinas 26 e 30 como causa de deficiência auditiva na nossa população e verificar a validade de se adotarem testes moleculares para sua detecção entre os indivíduos com surdez como uma prática rotineira. Com isso, pretendemos estabelecer os mais eficazes critérios de seleção de pacientes para a aplicação dos testes moleculares.

III - CASUÍSTICA E MÉTODOS

III - CASUÍSTICA E MÉTODOS

III.1 - Pacientes

Nossa amostra foi constituída por 300 propósitos portadores de distúrbios auditivos que procuraram aconselhamento genético no Laboratório de Genética Humana do Departamento de Genética e Biologia Evolutiva do Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo (LGH – IBUSP). Os pacientes foram encaminhados principalmente pela instituição DERDIC – Divisão de Educação e Reabilitação de Distúrbios da Comunicação da Pontifícia Universidade Católica de São Paulo. Esta instituição compreende uma divisão de ensino, uma divisão clínica e um conjunto de pessoas associadas ao Programa de Orientação Ocupacional e Ensino - POOE. Parte dos indivíduos encaminhados pela DERDIC foram examinados na sede dessa instituição. Outros pacientes foram encaminhados pelo Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, pelo CEPRO – Centro de Ensino Profissionalizante Rotary do Colégio Rio Branco e pelo Departamento de Biologia Celular Genética da Universidade Estadual de Maringá do estado do Paraná. Foram excluídos dessa casuística somente os indivíduos diagnosticados como portadores de síndromes conhecidas que incluem surdez como sinal.

Todas as pessoas portadoras de distúrbios de audição que compareceram para aconselhamento genético, tanto no LGH – IBUSP quanto na DERDIC, foram entrevistadas e preencheram o termo de consentimento formal para o exame e a utilização dos dados para pesquisa. Na entrevista foi investigada a existência de fatores ambientais que poderiam ser responsáveis pelo quadro, como contato com medicamentos ototóxicos, problemas na gestação ou no parto e causas infecciosas. Cópia da ficha de anamnese está apresentada no Anexo I.

O resumo das informações genéticas e clínicas sobre os propósitos estudados encontra-se no Anexo II.

Por falta de informações clínicas ou genealógicas, nem sempre foi possível caracterizar o tipo de surdez nos indivíduos da casuística. Dos caracterizados, 59,7% dos casos foram classificados como isolados e os 40,3% restantes, familiares. Dentre os indivíduos em que foi possível obter a idade de manifestação da deficiência auditiva, 75,3% dos propósitos apresentavam surdez pré-lingual e 24,7% apresentavam surdez pós-lingual. Apenas 2% dos indivíduos apresentaram surdez unilateral, enquanto que o restante apresentou surdez bilateral. Nos casos em que foi possível avaliar se a perda auditiva evoluiu, foi observado que 59,8% dos propósitos tinham surdez estacionária e 40,2% apresentavam surdez progressiva. Quanto ao limiar de audição, os critérios utilizados para classificar a perda auditiva foram os

de Davis e Silverman (1970). Desse modo, 58,8% dos casos foram classificados como apresentando perda profunda, 19,3% como perda grave, 18,9% como perda moderada e em 3,0% dos casos a perda era leve. Observamos também que 72,3% dos casos eram de deficiência auditiva neurossensorial, 2,7% dos casos eram de perda mista e em 1% a perda foi condutiva. Nos casos restantes, cerca de 24% da amostra, não foi esclarecida com certeza a localização do comprometimento auditivo.

Dentre os pacientes nos quais foi possível classificar o grupo étnico por meio do fenótipo (66% do total), 61,9% foram caracterizados como brancos, 32,1% como pardos, 4,8% como negros e 1,2% como orientais. No restante da amostra não foi possível caracterizar os pacientes devido à falta dessa informação nas fichas de avaliação mais antigas.

Estudamos também uma amostra controle constituída por 100 indivíduos ouvintes. Essa amostra foi formada por colegas do Instituto de Biociências, moradores do Conjunto Residencial da Universidade de São Paulo – CRUSP e doadores de sangue da Fundação Pró-Sangue Hemocentro de São Paulo. Todos os que concordaram em participar do estudo foram entrevistados quanto à existência de deficientes auditivos na família e também assinaram o termo de esclarecimento livre e esclarecido. Os indivíduos foram classificados como brancos, pardos e negros, o que permitiu a divisão posterior da amostra em um grupo constituído por 50 indivíduos classificados como brancos e um grupo constituído por 50 indivíduos classificados como pardos ou negros.

III.2 - Métodos

III.2.1 - Extração de DNA e estimativa de concentração

A maior parte das amostras de DNA foi obtida a partir de linfócitos de sangue periférico, seguindo a rotina do Laboratório de Genética Humana, utilizando-se da técnica de extração de DNA de fenol/clorofórmio. Em algumas amostras, o DNA foi extraído por meio do *GFX Genomic Blood DNA Purification Kit (Amersham)*. Após a quantificação do DNA, feita em espectrofotômetro *HITACHI – U-2000 SPECTROPHOTOMETER*, foi preparada uma diluição em água de cerca de 60 ng/μl de DNA. A concentração após a diluição foi estimada por meio de eletroforese em gel de agarose a 0,8% por comparação à massa das bandas do padrão de peso molecular ? DNA/*HindIII (Invitrogen)*.

III.2.2 - Triagem da mutação 35delG no gene da conexina 26

A detecção da mutação 35delG foi realizada por meio de reações de PCR alelo-específicas. Foram utilizados dois pares de *primers*, um que amplifica o alelo normal e outro

que amplifica somente o alelo mutado. As reações de PCR seguem o protocolo descrito por Scott e col. (1998) (Tabela IV). Os produtos da PCR obtidos foram visualizados em gel de agarose 2% após coloração com brometo de etídeo. Foram utilizadas como controle amostras de DNA de indivíduos já previamente identificados como heterozigotos quanto à mutação 35delG. Um indivíduo que tem seu DNA amplificado somente na reação *NOR* é considerado normal. Indivíduos heterozigotos quanto à mutação 35delG têm o DNA amplificado em ambas as reações. Indivíduos que têm o DNA amplificado somente na reação *MUT* são homozigotos para a mutação 35delG (Figura 10). Esse teste de triagem já havia sido realizado na maior parte da amostra pelos colegas Dra. Maria Cristina Célia Braga e o doutorando Ronaldo Serafim Abreu-Silva.

Tabela IV - *Primers* alelo-específicos e comum com as condições de amplificação para pesquisa da mutação 35delG.

	primers alelo-específicos e comum	nº de ciclos	Temperatura de hibridação
Reação <i>NOR</i>	NOR 5' TTGGGGCACGCTGCAGACGATCCTGGGGAG 3' COM 5' GAAGTAGTGATCGTAGCACACGTTCTTGCA 3'	30	60°
Reação <i>MUT</i>	MUT 5' TTGGGGCACGCTGCAGACGATCCTGGGGAT 3' COM 5' GAAGTAGTGATCGTAGCACACGTTCTTGCA 3'	30	60°

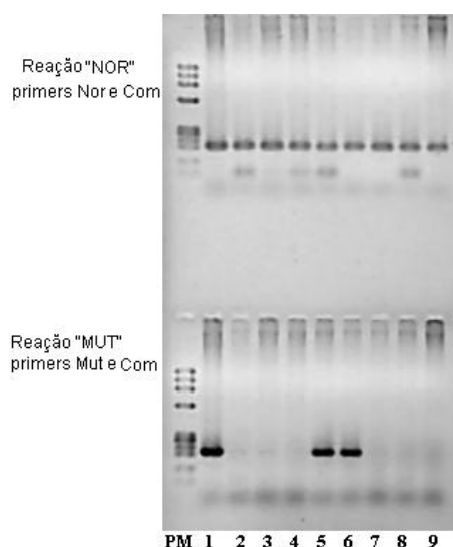


Figura 10 - Gel de agarose a 2% mostrando o resultado da PCR alelo-específica para a detecção da mutação 35delG. Nos poços da linha superior, estão os produtos da PCR dos alelos normais; nos poços da linha inferior estão os produtos da PCR dos alelos mutados. O padrão de peso molecular utilizado foi o DNA do fago FX174 digerido com a enzima *HaeIII* (*Invitrogen*). No poço 1 temos o controle heterozigoto com a mutação 35delG; nos poços de 2 a 4 e 7 a 9 temos os produtos de indivíduos homozigotos com alelo normal do gene *GJB2*, enquanto que nos poços 5 e 6 temos os produtos de indivíduos heterozigotos com a mutação 35delG (15481 e 15863).

III.2.3 - Triagem da mutação 167delT no gene da conexina 26

Para a detecção da mutação 167delT foram utilizados os *primers* 1F e 3R (Tabela V, p.39) que amplificam um fragmento de 425 pb que contém a mutação 167delT. Para a realização da PCR, em um volume final de reação de 50µL, contendo 100ng de DNA total, foram utilizados 10 pmoles dos *primers* 1F e 3R, 1U de Taq polimerase, 1,5mM de MgCl₂, 20mM TRIS pH = 8.4, 50mM KCl e 30mM de cada dNTP. As condições da amplificação foram as seguintes: desnaturação inicial 95°C por 1 min, 35 ciclos de desnaturação a 94°C por 1 min, hibridação a 60°C por 1 min, extensão a 72°C por 1min e 30s e extensão final a 72°C por 5 min. A digestão enzimática com *Pst*I, do produto obtido da PCR, foi realizada com 10 unidades da enzima e o produto foi submetido a eletroforese em gel de poliacrilamida a 6% e visualizado após coloração por impregnação com nitrato de prata, conforme descrito por Santos e col. (1993). A digestão com essa enzima origina quatro fragmentos de restrição (150pb, 138pb, 69pb e 68pb) em material de indivíduos que não apresentam a mutação e três fragmentos (219pb, 138pb e 68pb) no caso dos que apresentam a mutação em homozigose, uma vez que essa deleção faz com que se perca um sítio de restrição (Zelante e col., 1997). Heterozigotos com esta mutação irão apresentar fragmentos de 219pb, 150pb, 138pb, 69pb e 68pb (Figura 11).

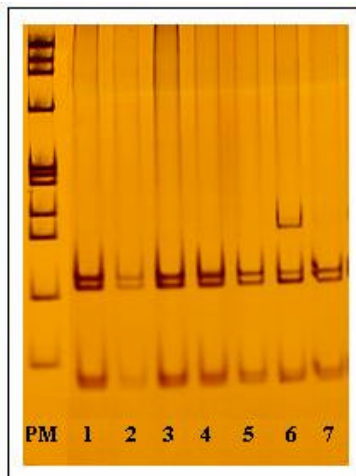


Figura 11 - Gel de poliacrilamida a 6% com os produtos da PCR digeridos com a enzima de restrição *Pst*I (para identificação da mutação 167delT) e corado com nitrato de prata. O padrão de peso molecular utilizado foi o DNA do fago FX174 digerido com a enzima *Hae*III (*Invitrogen*). Nos poços de 1 a 5 e 7 temos as bandas de 68pb, 69pb, 150 pb e 138pb, características dos normais. Já no poço 6 (15080) é possível visualizar as bandas de 68pb, 69pb, 150 pb, 138pb e 219pb que indicam que esse indivíduo possui a mutação 167delT em heterozigose.

III.2.4 - Triagem da del(*GJB6-D13S1830*)

Para a detecção da deleção de 309Kb do *GJB6* foi utilizado um protocolo sugerido pelo Dr. Filipe Moreno, que faz parte da equipe que descreveu esta deleção (Del Castillo e

col., 2002). Foram utilizados dois pares de *primers*, um par que amplifica uma região do gene da β -globina como banda controle para verificar se a PCR está funcionando (*primers sense* 5' – TGC CCA CCC CCC AAG TAG AG – 3' e *anti-sense* 5' – TTT CGG TTT CAT TCA TTT TCC CTA TT- 3') e um outro par que amplifica apenas o DNA na região de junção dos pontos de quebra da deleção (*primers sense* 5' – TTT AGG GCA TGA TTG GGG TGA TTT – 3' e *anti-sense* 5' – CAC CAT TGC GTA GCC TTA ACC ATT TT – 3'). Para um volume final de reação de 15 μ L, contendo 60ng de DNA total, foram utilizados 1 pmol de cada *primer*, 0,5U de Taq polimerase, 1,5mM de MgCl₂, 20mM TRIS pH = 8,4, 50mM KCl e 0,3mM de cada dNTP. As condições da amplificação foram as seguintes: um ciclo de desnaturação a 95°C por 5 min, 5 ciclos *touchdown* de desnaturação a 96°C por 15s, hibridação a 68°C por 15s para o primeiro ciclo com redução de 1°C por ciclo e extensão a 72°C por 30s, 25 ciclos de desnaturação a 96°C por 15s, hibridação a 62°C por 15s, extensão a 72°C por 30s e extensão final a 72°C por 10 min. Os produtos da PCR obtidos foram visualizados em gel de agarose a 2% após coloração com brometo de etídeo. Foram utilizadas como controle amostras de DNA de indivíduos já previamente identificados como heterozigotos quanto à del(*GJB6*-D13S1830). Heterozigotos ou homozigotos quanto à deleção terão duas bandas amplificadas, uma delas é a controle e a outra é referente à amplificação da região de junção dos pontos de quebra da deleção (460pb). Já indivíduos homozigotos sem a deleção terão apenas a banda controle amplificada (360pb) (Figura 12).

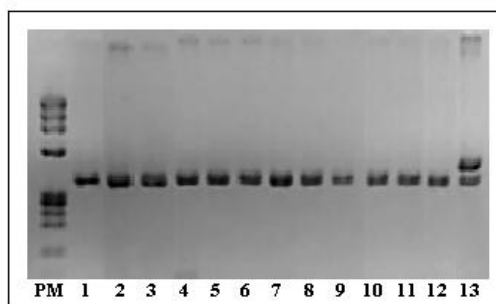


Figura 12 - Gel de agarose a 2% com os produtos da PCR do teste da deleção del(*GJB6*-D13S1830). O padrão de peso molecular utilizado foi o DNA do fago FX174 digerido com a enzima *Hae*III (*Invitrogen*). Nos poços de 1 a 12 pode ser visualizada apenas a banda controle de amplificação (360pb) de indivíduos que não são portadores da deleção. Já no poço 13 é possível visualizar duas bandas, a banda controle e a banda correspondente à amplificação da região do ponto de quebra da deleção (indivíduo 16000).

III.2.5 - Triagem da del(*GJB6*-D13S1854)

A detecção da deleção de 232Kb do gene *GJB6* foi realizada por meio de um protocolo modificado do trabalho de Del Castillo e col., 2005. Foram utilizados dois pares de *primers*, um par que amplifica a região do exon 1 do gene *GJB6* como banda controle para

verificar se a PCR está funcionando (*primers sense* 5' – CGT CTT TGG GGG TGT TGC TT – 3' e *anti-sense* 5' – CAT GAA GAG GGC GTA CAA GTT AGA A – 3'), e um outro par que amplifica apenas o DNA na região de junção dos pontos de quebra da deleção (*primers sense* 5' – TCA TAG TGA AGA ACT CGA TGC TGT TT – 3' e *anti-sense* 5' – CAG CGG CTA CCC TAG TTG TGG T – 3'). Para um volume final de reação de 25µL, contendo 60ng de DNA total, foram utilizados 0,3 pmoles de cada *primer*, 0,5U de Taq polimerase, 1,5mM de MgCl₂, 20mM TRIS pH = 8,4, 50mM KCl e 0,3mM de cada dNTP. As condições da amplificação foram as seguintes: um ciclo de desnaturação a 94°C por 4 min, 14 ciclos *touchdown* de desnaturação a 94°C por 30s, hibridação a 69°C por 40s para o primeiro ciclo com redução de 0,5°C por ciclo e extensão a 72°C por 1min, 25 ciclos de desnaturação a 94°C por 30s, hibridação a 62°C por 40s, extensão a 72°C por 1min e extensão final a 72°C por 10 min. Os produtos da PCR obtidos foram visualizados em gel de agarose 2% após coloração com brometo de etídeo. Foram utilizadas como controle amostras de DNA de indivíduos já previamente identificados como heterozigotos quanto à del(*GJB6-D13S1854*), enviadas pelo Dr. Felipe Moreno. Indivíduos heterozigotos com a deleção terão duas bandas amplificadas, uma delas é a controle de 333pb e a outra corresponde à amplificação da região contendo os pontos de quebra da deleção (564pb). Homozigotos para a deleção terão apenas a banda correspondente à região dos pontos de quebra da del(*GJB6-D13S1854*). Já indivíduos homozigotos sem a deleção terão apenas a banda controle do exon 1 do gene *GJB6* (Figura 13).

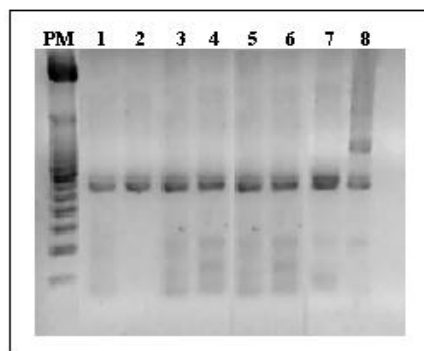


Figura 13 - Gel de agarose a 2% com os produtos da PCR da deleção del(*GJB6-D13S1854*). O padrão de peso molecular utilizado foi o de 50pb (*Invitrogen*). Nos poços de 1 a 7 pode ser visualizada apenas a banda controle (333pb), logo esses indivíduos não são portadores da deleção. Já no poço 8 é possível visualizar duas bandas, a banda de controle de 333pb e a banda correspondente à amplificação da região do ponto de quebra da deleção indicando que esse indivíduo é heterozigoto.

III.2.6 - Pesquisa de outras mutações no gene da conexina 26

A triagem das demais mutações no gene *GJB2* foi realizada por SSCP (*Single Strand Conformational Polymorphism*) também conhecida como SSCA (*Single Strand*

Conformational Analysis). O protocolo utilizado para a amplificação do gene *GJB2* foi sugerido pelo Prof. Dr. Sidney Batista dos Santos da Universidade Federal do Pará. Foram utilizados os *primers* 1F e 2R para amplificar um fragmento de 780 pb que abrange toda a região de código do gene da conexina 26. Em seguida foi realizado um segundo PCR a partir desse produto amplificado para dar origem a dois fragmentos: um de 425pb com os *primers* 1F e 3R e um segundo fragmento de 422pb com os *primers*; 4F e 2R (Tabela V). Para um volume final de reação de 50µL, contendo 100ng de DNA total, foram utilizados 10 pmoles de cada *primer*, 1U de Taq polimerase, 1,5mM de MgCl₂, 20mM TRIS pH = 8.4, 50mM KCl e 30mM de cada dNTP. As condições da amplificação dos dois fragmentos foram as mesmas descritas para a triagem da mutação 167delT. Os produtos obtidos foram analisados em eletroforese vertical em gel MDETM (*Bio Whittaker Molecular Applications*) na concentração de 27,5%, preparado de acordo com instruções do fabricante. A corrida de eletroforese foi realizada por um período de 20 horas em uma potência de 7 WATTS. Após a eletroforese os resultados foram visualizados por meio de coloração dos géis com nitrato de prata (Bassam e col., 1991) e fotografados com filme *Typopaque TR-DO 18 (Typon)* (Figuras 14 e 15).

Os 100 indivíduos pertencentes à amostra controle também tiveram seus produtos de PCR analisados por meio da técnica de SSCP.

Tabela V - *Primers* utilizados para a amplificação do gene *GJB2*. Os *primers* 1F e 2R foram utilizados para amplificar um fragmento de 780pb. Em seguida, foi realizada uma segunda reação de PCR para amplificar dois fragmentos, o primeiro com 425pb com os *primers* 1F e 3R e o segundo, de 422pb, com os *primers* 4F e 2R.

<i>Primers</i>	
Fragmento de 780 pb	1F – 5' GTG TTG TGT GCA TTC GTC TTT TC- 3' 2R – 5' CCT CAT CCC TCT CAT GCT GTC TA 3'
1º Fragmento (425pb)	1F – 5' GTG TTG TGT GCA TTC GTC TTT TC- 3' 3R – 5' ACC TTC TGG GTT TTG ATC TCC TC 3'
2º Fragmento (422pb)	4F – 5' GGA AGT TCA TCA AGG GGG AGA TA 3' 2R – 5' CCT CAT CCC TCT CAT GCT GTC TA 3'

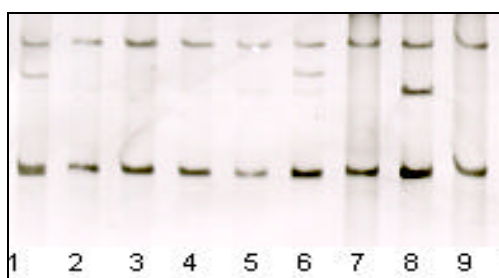


Figura 14 - Resultado de SSCP do 1º fragmento do gene *GJB2*: gel vertical de MDE após coloração com nitrato de prata. As amostras 2 a 5, 7 e 9 apresentam padrão normal, enquanto que as amostras 1, 6 e 8 apresentam padrões alterados.

Os fragmentos que exibiram padrões alterados identificados por meio de SSCP foram submetidos ao seqüenciamento do DNA para a identificação da mutação.

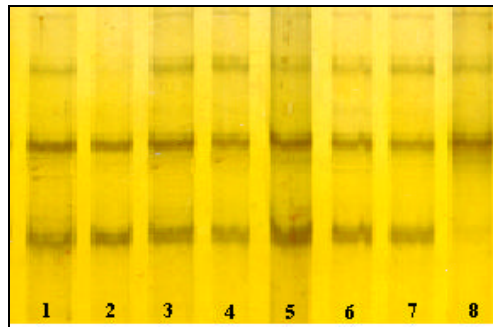


Figura 15 - Resultado de SSCP do 2º fragmento do gene *GJB2*: gel vertical de MDE após coloração com nitrato de prata. As amostras de 1 a 7 apresentam padrão normal, enquanto que a amostra 8 apresenta padrão alterado de migração.

III.2.7 - Seqüenciamento do gene *GJB2*

O seqüenciamento do DNA foi utilizado para confirmar a presença das mutações 167delT e 35delG em homozigose ou heterozigose detectadas nos testes de triagem e identificar as outras possíveis mutações nos fragmentos amplificados que apresentaram migração alterada no SSCP (Figura 16).

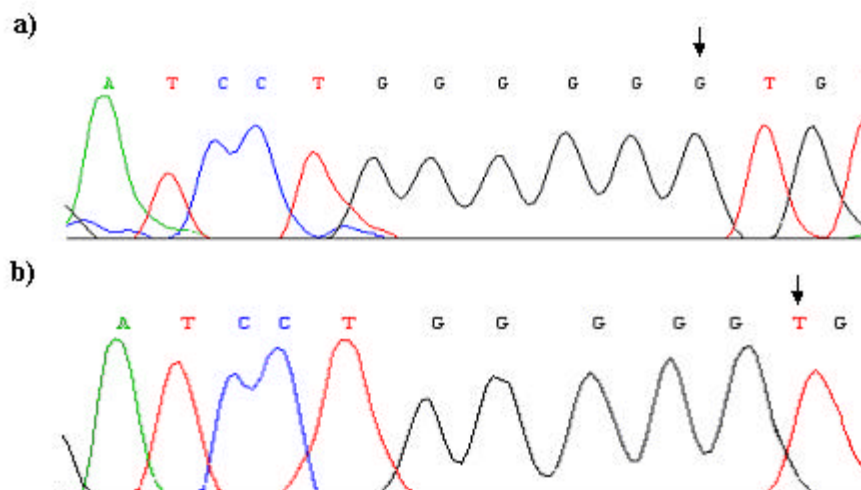


Figura 16 - Resultado do seqüenciamento de uma fita com sentido do DNA na região da mutação 35delG. Em (a) temos seqüência de um indivíduo normal, que não apresenta a mutação 35delG e (b) seqüência de um indivíduo que apresenta a mutação 35delG em homozigose. A seta indica a posição da mutação 35delG.

A amplificação da região de código do gene *GJB2* foi realizada de acordo com o descrito no item III.2.6. Após amplificação, o produto da PCR foi purificado utilizando o *Kit in Concert (Gibco-BRL)* e quantificado em gel de agarose 2%, utilizando como padrão o *low DNA mass ladder (Invitrogen)*. Foram utilizados 60-100 ng de DNA e o *Kit DYEnamic Et terminator reagent premix* para o seqüenciamento no *MegaBace 1000 (Amersham)*.

Nos indivíduos heterozigotos com a mutação 35delG tentou-se identificar a segunda mutação seqüenciando-se o material de familiares que não apresentavam a 35delG. Quando não havia familiares disponíveis para estudo, foi realizada a clonagem para a separação das seqüências oriundas do dois alelos.

Cada alteração encontrada foi visualizada em pelo menos duas seqüências: fitas com sentido e antisenso do mesmo indivíduo ou uma fita em pelo menos dois indivíduos da mesma família.

III.2.8 - Clonagem

Nos indivíduos com a mutação 35delG em heterozigose nos quais não foi possível identificar a segunda mutação por meio do seqüenciamento direto do DNA, foi realizada a clonagem dos produtos da PCR do fragmento de 425pb obtidos com os *primers* 1F e 3R (Tabela V) em plasmídeos. A clonagem foi realizada por meio dos kits: *TOPO TA Cloning (Invitrogen)* e *pGEM-T Easy Vectors Systems I (Promega)*, de acordo a metodologia especificada pelos fabricantes. Após obtenção das colônias de bactérias transformadas com os plasmídeos recombinantes, elas foram submetidas a uma reação de PCR com os *primers* 1F e 3R para o primeiro fragmento ou com os *primers* 4F e 2R para obtenção do segundo fragmento (Tabela V). As condições da PCR foram as mesmas descritas para o seqüenciamento do gene *GJB2*. O produto obtido da PCR foi então purificado e submetido ao seqüenciamento.

III.2.9 - Estudos Complementares

Seguindo a rotina do Laboratório de Genética Humana, todos os propósitos também foram testados quanto à presença da mutação A1555G no gene 12SrRNA do DNA mitocondrial. Esse estudo foi realizado pelo aluno de doutorado Ronaldo Serafim Abreu Silva e parte das amostras fez parte da sua dissertação de mestrado: “Pesquisa de mutações mitocondriais associadas à deficiência auditiva” apresentada ao Programa de Pós-Graduação do Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo em 2003.

O programa computacional *Polyphen* (<http://www.polyphen.com>) foi utilizado para avaliar o potencial efeito das mutações encontradas no gene *GJB2*.

IV - RESULTADOS

IV - RESULTADOS

IV.1 - Triagem das mutações 35delG e 167delT no gene *GJB2* e del(*GJB6-D13S1830*) e del(*GJB6-D13S1854*) no gene *GJB6*

O resumo dos resultados dos testes de detecção das mutações 35delG e 167delT no gene *GJB2* e del(*GJB6-D13S1830*) e del(*GJB6-D13S1854*) no gene *GJB6* encontra-se na Tabela VI.

Apenas em 28 casos, dentre os 38 identificados para essas mutações, foi possível classificar o grupo étnico dos pacientes. Desses 28 casos, 22 eram brancos, 5 eram pardos e 1 era oriental, mas o pai era descendente de europeu. Um desses propósitos (16748) era albino e foi identificado como portador homozigoto da mutação c.1121delT no gene *MATP* relacionado ao albinismo óculo-cutâneo (Lezirovitz e col., 2005). No entanto, os demais membros da família desse propósito foram caracterizados como pardos.

Tabela VI - Resultados parciais obtidos após os testes de triagem das mutações 35delG e 167delT no gene *GJB2* e das deleções del(*GJB6-D13S1830*) e del(*GJB6-D13S1854*) no gene *GJB6*. ? significa que a segunda mutação não foi identificada por esses métodos.

Mutações identificadas	n° de propósitos identificados/casuística total	n° de propósitos identificados/n° total de propósitos identificados com alterações
35delG/35delG	22/300 (7,5%)	22/38 (57,9%)
35delG/?	11/300 (3,6%)	11/38 (28,9%)
35delG/del(<i>GJB6-D13S1830</i>)	3/300 (1,0%)	3/38 (7,8%)
35delG/167delT	1/300 (0,3%)	1/38 (2,7%)
167delT/?	1/300 (0,3%)	1/38 (2,7%)
del(<i>GJB6-D13S1854</i>)	0/300	0/38
Total	38/300 (12,7%)	38

Dentre os 22 homozigotos com a mutação 35delG, cinco eram casos isolados, sendo os demais 17 casos familiares de surdez. Entre os 15 indivíduos heterozigotos com a mutação 35delG, 8 casos eram familiares e 7 casos eram isolados. Assim, dentre o total de 37 propósitos identificados com essa mutação, 25 (ou 67,6%) foram caracterizados como casos familiares e 12 (ou 32,4%) como isolados.

A mutação 167delT do gene *GJB2* foi identificada em dois indivíduos. Em um dos casos, a mutação 167delT foi identificada em uma propósito (16354) com a mutação 35delG. Esse caso era familiar e os resultados dos estudos realizados com outros membros da família podem ser visualizados na Figura 17.

No segundo caso (15080) a mutação 167delT também foi encontrada em heterozigose. Esse caso era isolado. Foi realizada a clonagem seguida do seqüenciamento do exon 2 do gene *GJB2* para análise do outro alelo. Após seqüenciamento do produto clonado não foi

identificada nenhuma alteração nessa propósita. Nesse caso, não se pode afirmar com segurança que a surdez é mesmo devida a essa mutação. Além disso, a propósita é filha de primos em primeiro grau, o que nos faria supor que a mutação que causasse surdez estaria em homozigose.

Nos dois casos identificados de portadores da mutação 167delT, os indivíduos foram caracterizados como brancos, tendo sido relatado em ambos a origem judaica.

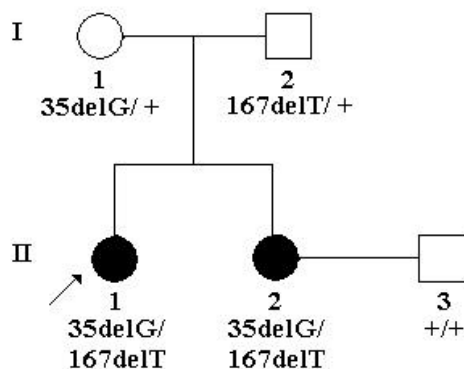


Figura 17 - Heredograma da família 16354 com as mutações detectadas. A seta indica o propósito. O sinal “+” significa que o seqüenciamento revelou resultado normal.

A deleção del(*GJB6*-D13S1830) foi identificada em 3 dos 300 propósitos estudados, o que corresponde a 1% da casuística total. Esses três indivíduos (15362V, 16000 e 16728M) identificados pertencem ao grupo dos 15 heterozigotos com a mutação 35delG. Desses, apenas um caso é familiar (15362V), sendo os outros dois casos isolados (16000 e 16728M). Nesses dois casos os propósitos foram identificados como brancos.

A del(*GJB6*-D13S1854) de 232Kb, descrita recentemente por Del Castillo e col. (2005) foi triada no material dos 300 propósitos da nossa casuística (exceto no propósito 17036, em que a del(*GJB6*-D13S1854) foi triada em seus pais, dado que havia acabado o material). A del(*GJB6*-D13S1854) não foi identificada em nenhum dos indivíduos da casuística.

Em resumo, os testes genéticos de triagem para detecção de mutações 35delG e 167delT no gene *GJB2* e del(*GJB6*-D13S1830) e del(*GJB6*-D13S1854) no gene *GJB6* permitiram o diagnóstico molecular em 12,7% de toda a casuística estudada.

IV.2 - Seqüenciamento para identificação da segunda mutação nos heterozigotos quanto à mutação 35delG

Uma vez que dentre os 15 heterozigotos com 35delG, três têm a mutação del(*GJB6*-D13S1830) e um tem a 167delT, restou-nos identificar a segunda mutação em 11 casos. Em alguns desses 11 heterozigotos, foi possível a pesquisa da segunda mutação recessiva em seu

outro alelo por meio do seqüenciamento da região de código do exon 2 do gene *GJB2* do paciente ou de seus familiares em seis casos: 15481, 15513, 16495, 17241, 15201 e 15863.

IV.2.1 - Família 15481 (Figura 18)

No caso 15481, o seqüenciamento do exon 2 do gene *GJB2* da conexina 26 do propósito e de seus familiares revelou a mutação patogênica T269C (L90P) (Figura 18). A mutação T269C foi detectada em heterozigose no propósito (IV-6) e nos indivíduos IV-2 e IV-7. A surdez decorre, portanto, da presença das mutações 35delG e T269C, que confirmam o mecanismo de herança autossômico recessivo. Os familiares estudados bem como os genótipos identificados podem ser visualizados no heredograma da Figura 18.

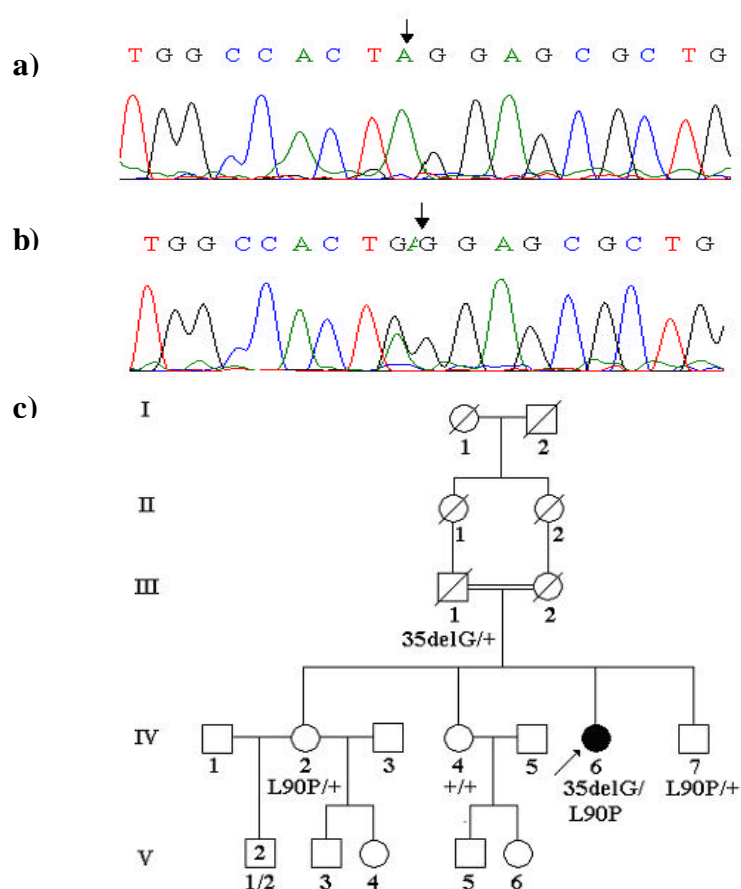


Figura 18 - a) resultado do seqüenciamento de uma fita antissentido do DNA de um indivíduo normal, que não apresenta a mutação T269C. b) resultado do seqüenciamento de uma fita antissentido na irmã do propósito 15481 (IV-2) que apresenta a mutação T269C em heterozigose. A seta indica a posição da mutação T269C. c) heredograma da família 15481. A seta indica o propósito. Por meio do seqüenciamento foi verificado o genótipo de alguns dos familiares desse propósito. O sinal “+” significa que o seqüenciamento revelou resultado normal.

IV.2.2 - Família 15513 (Figura 19)

No propósito 15513C, o seqüenciamento do gene *GJB2* identificou as mutações T101C (M34T) e 509insA em *trans* em relação à mutação 35delG. Essa duas mutações T101C e 509insA estão provavelmente em *cis*. Detectamos que essas três mutações também

estão presentes no indivíduo II-1, que também apresenta deficiência auditiva. Nenhuma dessas mutações foi detectada no indivíduo II-2, enquanto que no indivíduo II-3 foram detectadas em heterozigose as mutações T101C e 509insA. A mutação 509insA é com certeza patogênica, enquanto que o efeito da mutação T101C é muito discutido na literatura. No entanto, podemos concluir que a surdez apresentada pelos indivíduos II-1 e II-4 é devida à presença das mutações 35delG e 509insA e o mecanismo de herança, portanto, é autossômico recessivo. O resultado do seqüenciamento, bem como os familiares estudados e os genótipos identificados podem ser visualizados na Figura 19.

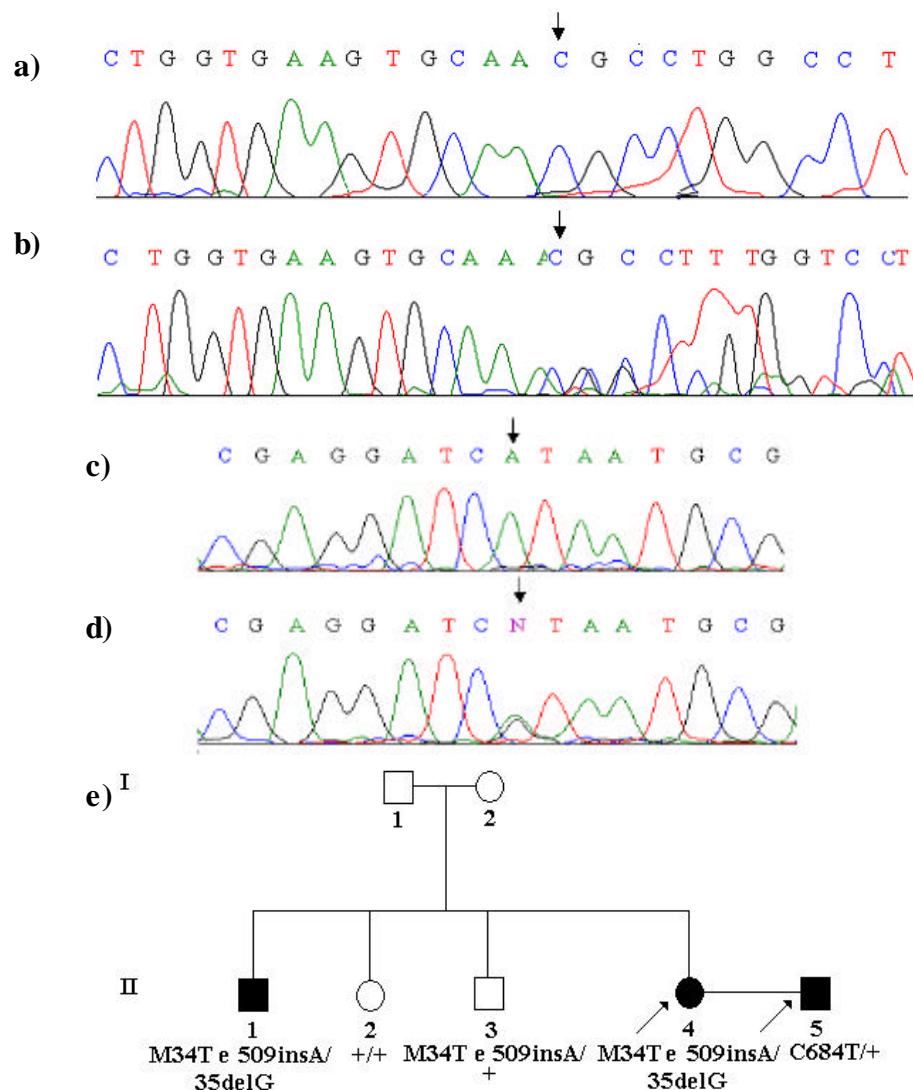


Figura 19 - a) resultado do seqüenciamento de uma fita com sentido do DNA de um indivíduo normal, que não apresenta a mutação 509insA. b) resultado seqüenciamento de uma fita com sentido do propósito 15513C que apresenta a mutação 509insA em heterozigose. c) resultado do seqüenciamento de uma fita antisenrido do DNA de um indivíduo normal, que não apresenta a mutação T101C (M34T). d) resultado do seqüenciamento de uma fita antisenrido do propósito 15513C que apresenta a mutação T101C em heterozigose. As setas indicam a posição das mutações. A mutação 509insA e T101C estão em *cis* e essas duas mutações estão em *trans* em relação à mutação 35delG. e) heredograma da família 15513. A seta indica o propósito. O sinal “+” significa que o seqüenciamento revelou resultado normal.

IV.2.3 - Família 16495 (Figura 20)

Para identificar a segunda mutação no propósito 16495, seqüenciamos o exon 2 do gene da conexina 26 nos seus pais. O seqüenciamento do DNA do pai do propósito (I-1) detectou a mutação G71A (W24X) em heterozigose, sabidamente patogênica, enquanto que em sua mãe (II-2) o seqüenciamento confirmou a presença em heterozigose da mutação 35delG. Desse modo, podemos concluir que o quadro clínico de surdez resulta das mutações 35delG e G71A e o mecanismo de herança fica confirmado como autossômico recessivo (Figura 20). Esse era um caso isolado de surdez.

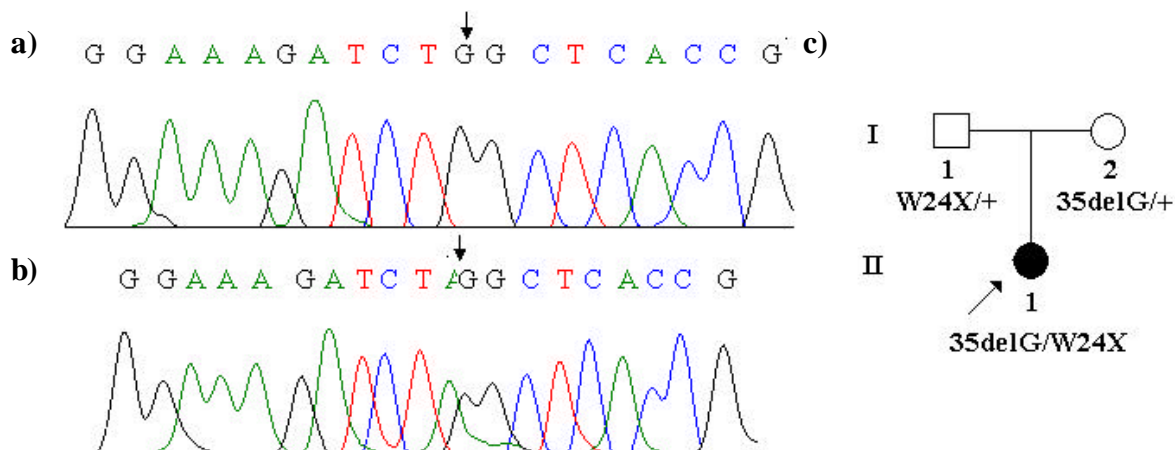


Figura 20 - a) resultado do seqüenciamento de uma fita com sentido do DNA de um indivíduo normal, que não apresenta a mutação G71A. b) resultado do seqüenciamento de uma fita com sentido do pai (I-1) que apresenta a mutação G71A em heterozigose. A seta indica a posição da mutação G71A c) heredograma da família 16495. A seta indica o propósito. O sinal “+” significa que o seqüenciamento revelou resultado normal.

IV.2.4 - Família 17241 (Figura 21)

Seqüenciamos o exon 2 do gene *GJB2* nos pais do propósito 17241. O propósito era caso isolado. O seqüenciamento do DNA da mãe (I-2) confirmou a presença da mutação 35delG em heterozigose. Já o seqüenciamento do DNA do seu pai (I-1) revelou a mutação G109A (V37I), patogênica, em heterozigose (Figura 21). Portanto, podemos concluir que a surdez presente nesse indivíduo decorre da presença dessas duas mutações, 35delG e V37I, herdadas de sua mãe e de seu pai, respectivamente.

IV.2.5 - Família 15201 (Figura 22)

O seqüenciamento do exon 2 do gene *GJB2* da conexina 26 do pai do propósito 15201 não revelou nenhuma alteração. Os familiares estudados bem como os genótipos identificados podem ser visualizados no heredograma da Figura 22. Desse modo, não se pode afirmar com segurança se a surdez apresentada por esse propósito é devida à presença da mutação 35delG. Nesse caso, a surdez era familiar.

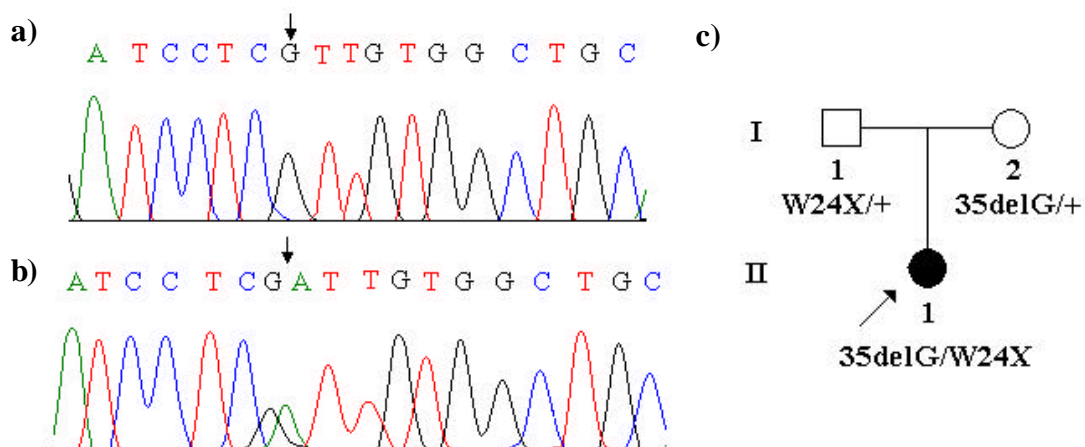


Figura 21 - a) resultado do seqüenciamento de uma fita com sentido do DNA de um indivíduo normal, que não apresenta a mutação G109A. b) resultado do seqüenciamento de uma fita com sentido do pai (II-1) que apresenta a mutação G109A em heterozigose. A seta indica a posição da mutação G109A. c) heredograma da família 17241. A seta indica o propósito. O sinal “+” significa que o seqüenciamento revelou resultado normal.

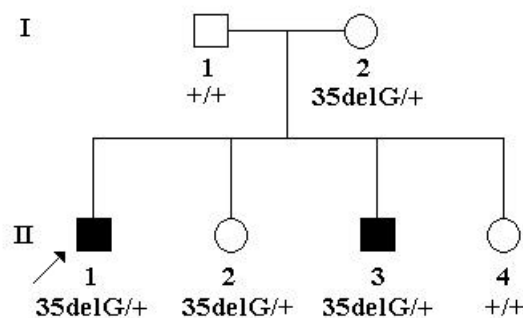


Figura 22 - Heredograma da família 15201. A seta indica o propósito. Por meio do seqüenciamento do exon 2 do gene *GJB2* da conexina 26 foi verificado o genótipo dos demais familiares desse propósito. O sinal “+” significa que o seqüenciamento revelou resultado normal.

IV.2.6 - Família 15863

A análise do seqüenciamento do DNA do pai do propósito (15863W) não detectou nenhuma alteração nessa região do gene *GJB2*, enquanto que na sua mãe (15863M) o seqüenciamento confirmou a presença em heterozigose da mutação 35delG. O propósito era caso isolado. Como o seqüenciamento do DNA dos pais desse propósito não identificou nenhuma outra alteração nessa região, além da mutação 35delG, não podemos concluir se essa mutação é responsável pelo quadro clínico de surdez.

Nos cinco casos seguintes (14401, 15115, 16140, 16941 e 17229), as mutações foram estudadas por meio da clonagem seguida do seqüenciamento.

IV.2.7 - Família 14401 (Figura 23)

A clonagem seguida do seqüenciamento do exon 2 do gene da conexina 26 do propósito 14401R identificou a mutação 235delC como sendo a segunda mutação presente nesse

indivíduo, o que leva à conclusão que a surdez é devida à presença dessas duas mutações no gene *GJB2* e o mecanismo de herança fica confirmado como autossômico recessivo. A surdez era familiar. O resultado do seqüenciamento do DNA, após a clonagem, evidenciando a mutação 235delC pode ser visualizado na Figura 23.

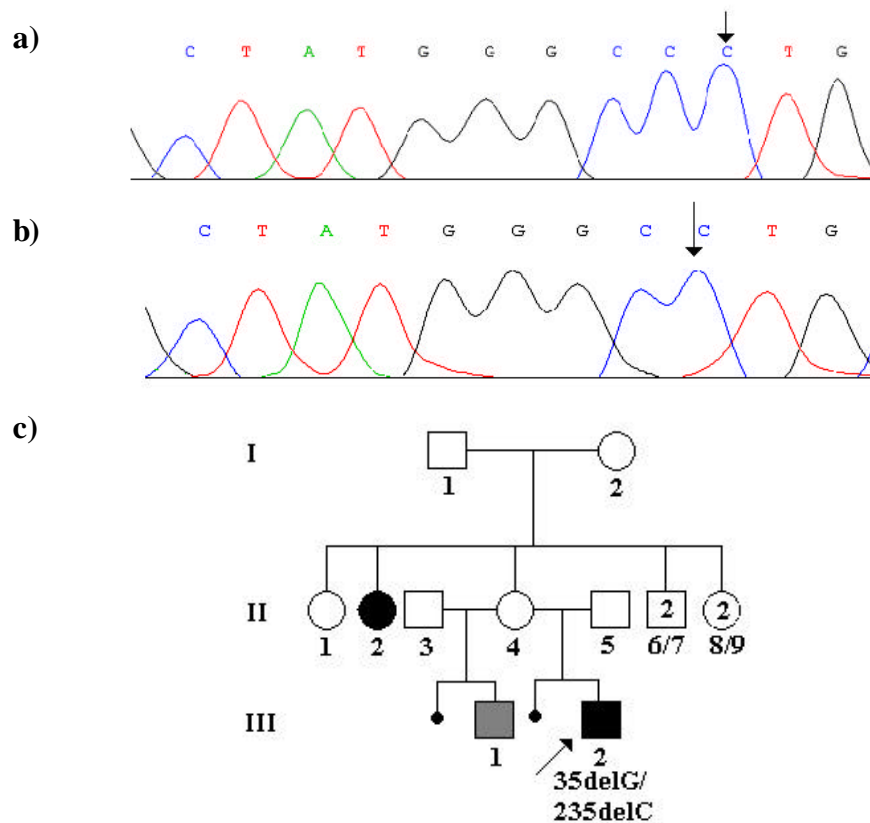


Figura 23 - a) resultado do seqüenciamento de uma fita com sentido do DNA de um indivíduo normal, que não apresenta a mutação 235delC. b) resultado do seqüenciamento de uma fita com sentido de um dos alelos do propósito 14401R, após a clonagem do primeiro fragmento, com a mutação 235delC. A seta indica a posição da mutação. c) Heredograma da família 14401. A seta indica o propósito. O indivíduo III-1 tem retardo mental, mas não surdez.

IV.2.8 - Família 15115 (Figura 24)

A clonagem seguida do seqüenciamento do exon 2 do gene *GJB2* revelou no propósito 15115V uma deleção de 16 pb denominada de 176-191del16 (Figura 24). A análise do material genético de alguns indivíduos da família desse propósito (Figura 24c) indicou que a mutação 176-191del16 estava também presente em heterozigose na sua avó não afetada (II-3), na sua mãe (III-4) e na sua tia (III-6). O propósito herdou a mutação 35delG do seu pai (III-3), que a apresenta em homozigose.

Por meio da clonagem seguida de seqüenciamento do DNA foi encontrada na mãe do propósito, além da mutação 176-191del16, uma segunda mutação denominada 235delC. Tanto a mutação 176-191del16, quanto a 235delC são patogênicas e comuns em populações

asiáticas e essa família têm origem japonesa. Em resumo, a análise dos indivíduos dessa família indicou a presença de 3 mutações distintas, 35delG, 176-191del16 e 235delC.

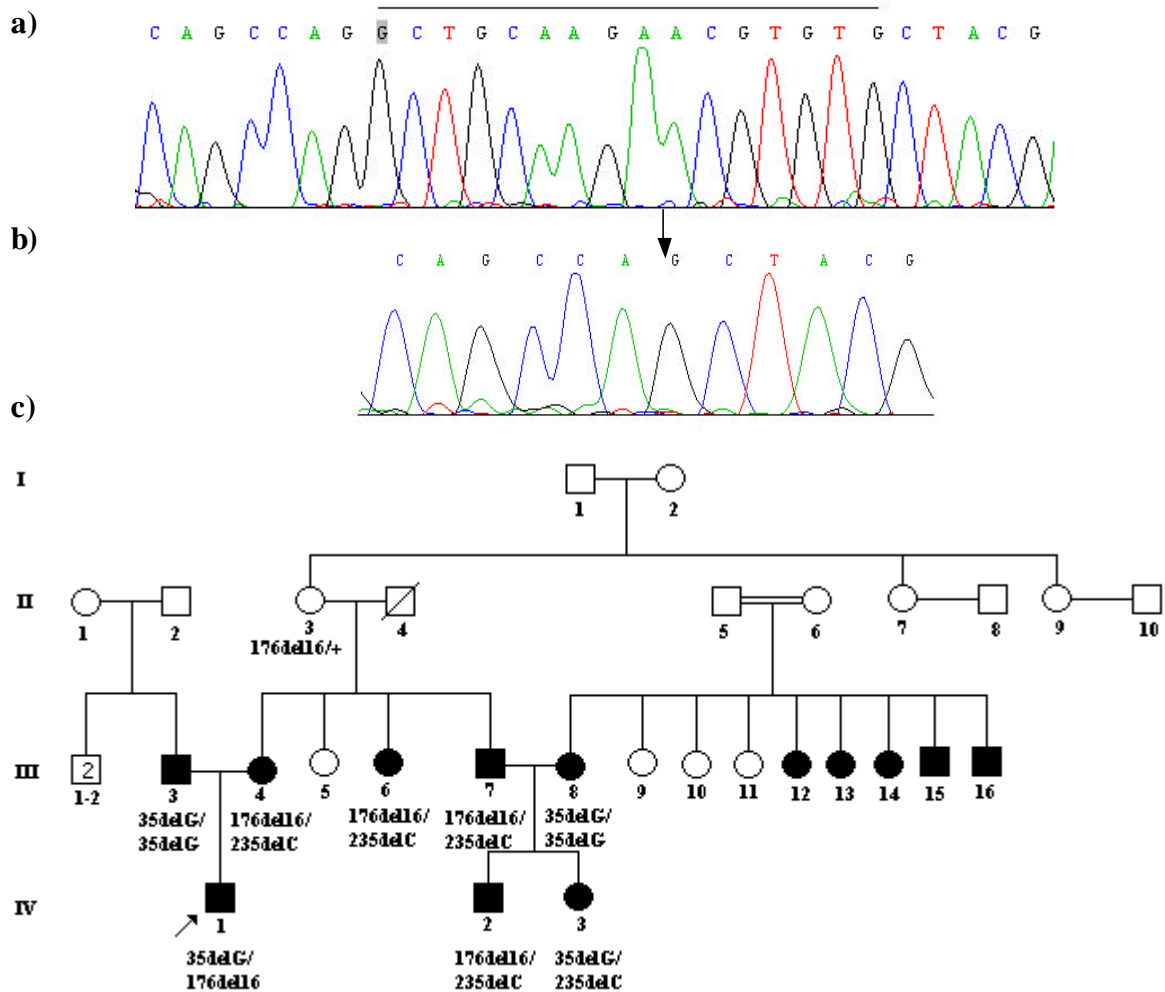


Figura 24 - a) resultado do seqüenciamento de uma fita com sentido do DNA de um indivíduo normal, que não apresenta a mutação 176-191del16. b) resultado do seqüenciamento de uma fita com sentido de um dos alelos do propósito 15115V com a mutação 176-191del16. A barra horizontal e a seta indicam a posição da mutação no seqüenciamento do indivíduo normal e no propósito, respectivamente. c) Heredograma da família 15115. A seta indica o propósito. Por meio do seqüenciamento do exon 2 do gene *GJB2* da conexina 26 foi verificado o genótipo de alguns dos familiares dessa família. O sinal “+” significa que o seqüenciamento revelou resultado normal.

IV.2.9 – Pacientes 16140, 16941 e 17229

A clonagem seguida do seqüenciamento do exon 2 do gene *GJB2* da conexina 26 nos propósitos 16140, 16941 e 17229 não revelou nenhuma outra alteração, além da mutação 35delG nesses indivíduos.

Em resumo, dentre os 16 heterozigotos previamente triados para as mutações 35delG e 167delT do gene *GJB2*, em 10 nós identificamos uma segunda mutação. Dentre os 16, em 3 estava presente a mutação del(*GJB6*-D13S1830) do gene *GJB6* e um era heterozigoto

composto para as mutações 35delG e 167delT em heterozigose. Mutações diferentes (G71A, G109A, 176-191del16, 235delC, T269C e 509insA) foram encontradas em 6 indivíduos. Já nos 6 restantes (15080, 15201, 15863, 16140, 16941 e 17229) não foi detectada nenhuma outra alteração. Não podemos afirmar com segurança se esses propósitos não possuem mesmo uma segunda alteração no gene *GJB2*, uma vez que as regiões não traduzidas não foram seqüenciadas.

IV.3. - Análise de SSCP

Na análise por meio de SSCP do primeiro fragmento no gene *GJB2*, em 14 amostras detectamos um tipo de padrão de migração diferente do padrão apresentado pelos controles. O seqüenciamento do DNA de alguns desses propósitos não identificou nenhuma alteração no exon 2 do gene *GJB2*. A análise por SSCP do primeiro e do segundo fragmento foi realizada também em uma amostra controle constituída por 100 indivíduos ouvintes, dos quais 50 foram classificados como brancos e 50 como pardos ou negros. Tanto na amostra controle formada pelos 50 indivíduos brancos quanto na formada pelos 50 indivíduos pardos ou negros, detectamos o mesmo padrão de migração alterado no SSCP no primeiro fragmento, tendo sido esse padrão visualizado em um total de 12/100 amostras (Figura 25). O seqüenciamento de algumas dessas amostras controle com padrão de migração alterado não revelou nenhuma alteração, o que nos levou à conclusão que esse padrão de migração pode ocorrer com freqüência em indivíduos normais, não devendo ter nenhum significado.

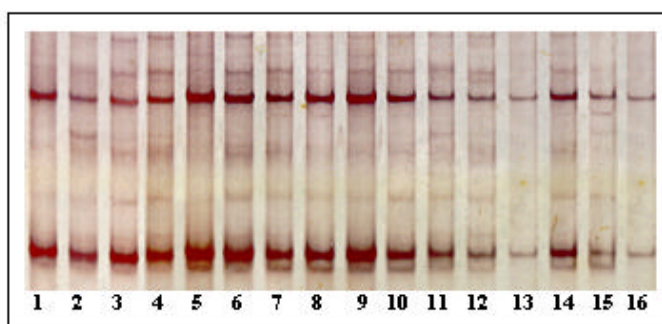


Figura 25 - Resultado da análise de SSCP do primeiro fragmento. Nos poços 1 a 4, 13 e 16 estão amostras do produto da PCR com padrão de migração normal; nos poços 5 a 12 estão amostras de alguns indivíduos do grupo controle com padrão de migração considerado alterado e nos poços 14 e 15 temos amostras do produto da PCR de dois propósitos, da nossa casuística, com padrão de migração também considerado alterado. O seqüenciamento dos fragmentos que apresentaram esse tipo de migração não revelou nenhuma alteração.

Em relação ao primeiro fragmento do exon 2 do gene *GJB2*, além dos propósitos com as mutações previamente detectadas (35delG e 167delT), foram encontrados mais 17 propósitos com alterações reais de migração. Já em relação ao segundo fragmento foram

identificados 8 indivíduos com alterações de migração no SSCP. Um dos propósitos (15513M) em que foi identificada alteração de migração no SSCP no segundo fragmento pertence à família 15513, já descrita anteriormente, pois é casado com a propósita II-4 (Figura 19, p.46).

Desse total de 25 propósitos, todos tiveram seus produtos de PCR, tanto do primeiro quanto do segundo fragmento do exon 2 do gene *GJB2*, seqüenciados. A relação dos propósitos em que foi detectada alteração de migração no SSCP e as respectivas alterações identificadas no seqüenciamento estão relacionadas na Tabela VII.

Tabela VII - Resultado do seqüenciamento das 25 amostras com migração alterada no SSCP no primeiro e no segundo fragmento. Em vermelho temos as mutações patogênicas, em azul as não patogênicas e em preto as variantes ainda não descritas.

Paciente	Proteína	Nucleotídeo	Genótipo	Referência
14960	V27I	79 G→A	heterozigoto	Kelley e col. (1998)
	M34T	101T→C	heterozigoto	Kelsell e col. (1997)
15117L	M195V	583A→G	heterozigoto	não descrita
15280	M34T	101T→C	heterozigoto	Kelsell e col. (1997)
15513M	A684C (3'UTR)	684 A→C	heterozigoto	não descrita
15572	R184P	551 G→C	homozigoto	Denoyelle e col. (1997)
15818	G160S	468 G→A	heterozigoto	Scott e col. (1998)
15854	V27I	79 G→A	heterozigoto	Kelley e col (1998)
15974	V27I	79 G→A	heterozigoto	Kelley e col (1998)
16020	R127H	380 G→A	heterozigoto	Estivill e col. (1998)
16416	M34T	101 T→C	heterozigoto	Kelsell e col. (1997)
16508	R127H	380 G→A	heterozigoto	Estivill e col. (1998)
16534	V27I	79 G→A	heterozigoto	Kelley e col (1998)
16557	A40A	120 A→C	heterozigoto	Estivil e Gasparini (2006)
16586	K168R	503A→G	heterozigoto	não descrita
16647	M34T	101 T→C	heterozigoto	Kelsell e col. (1997)
16684	L81V	241 G→C	heterozigoto	não descrita
16703C	- 15 C→T (intron)	- 15 C→T	heterozigoto	Estivill e Gasparini (2006)
16751	- 15 C→T (intron)	- 15 C→T	heterozigoto	Estivil e Gasparini (2006)
16758	M34T	101 T→C	heterozigoto	Kelsell e col. (1997)
16775	- 15 C→T (intron)	- 15 C→T	heterozigoto	Estivill e Gasparini (2006)
16933	V27I	79 G→A	heterozigoto	Kelley e col (1998)
17016	M34T	101 T→C	homozigoto	Kelsell e col. (1997)
17146	K168R	503A→G	heterozigoto	não descrita
17179	M34T	101 T→C	heterozigoto	Kelsell e col. (1997)
17225	V27I	79 G→A	heterozigoto	Kelley e col. (1998)

Dentre os 25 propósitos foram identificadas, ao todo, 11 alterações diferentes: C/T - 15, G79A (V27I), T101C (M34T), A120C (A40A), G241C (L81V), G380A (R127H), G468A (G160S), A503G (K168R), G551C (R184P), A583G (M195V) e C/A 684. Dessas

alterações, sete (C/T -15, G79A, T101C, A120C, G380A, G468A e G551C) já foram descritas na *The Connexin-deafness homepage* (Estivill e Gasparini, 2006). Somente a mutação G551C (R184P) é certamente patogênica. Apesar de estar na lista das patogênicas, a mutação G380A (R127H) já foi descrita como sendo um polimorfismo sem efeito (Estivill e Gasparini, 2006). Em nossas tabelas (VII e VIII) nós a classificamos como patogênica. As demais alterações não são consideradas patogênicas.

Tabela VIII - Resultados obtidos após os testes de triagem das mutações 35delG e 167delT do gene *GJB2* e del(*GJB6*-D13S1830) e del(*GJB6*-D13S1854) do gene *GJB6*, da análise por SSCP e do seqüenciamento do exon 2 do gene *GJB2*. O sinal “+” significa que o seqüenciamento revelou resultado normal.

Mutações encontradas	nº de propósitos identificados/ nº total de propósitos da casuística	nº de propósitos identificados/ nº de propósitos identificados com alterações no loco DFNB1
Patogênicas		
35delG/35delG	22/300 (7,5%)	22/63 (35,1%)
35delG/+	5/300 (1,7%)	5/63 (7,9%)
35delG/delGJB6(D13S1830)	3/300 (1,0%)	3/63 (4,7%)
G380A/+	2/300 (0,8%)	2/63 (3,1%)
35delG/G71A	1/300 (0,3%)	1/63 (1,6%)
35delG/G109A	1/300 (0,3%)	1/63 (1,6%)
35delG/167delT	1/300 (0,3%)	1/63 (1,6%)
35delG/176-191del16	1/300 (0,3%)	1/63 (1,6%)
35delG/235delC	1/300 (0,3%)	1/63 (1,6%)
35delG/T269C	1/300 (0,3%)	1/63 (1,6%)
35delG/509insA+T101C	1/300 (0,3%)	1/63 (1,6%)
G551C/G551C	1/300(0,3%)	1/63 (1,6%)
167delT/+	1/300 (0,3%)	1/63 (1,6%)
Total parcial	41/300 (13,7%)	41/63 (65,2%)
Não patogênicas		
T101C/+	5/300 (1,7%)	5/63 (7,9%)
G79A/+	5/300 (1,7%)	5/63 (7,9%)
- 15 T/C (intron)/+	3/300(1,0%)	3/63 (4,7%)
T101C/T101C	1/300 (0,3%)	1/63 (1,6%)
T101C/G79A	1/300 (0,3%)	1/63 (1,6%)
A120C/+	1/300 (0,3%)	1/63 (1,6%)
A478G/+	1/300 (0,3%)	1/63 (1,6%)
Total parcial	17/300 (5,6%)	17/63 (26,9%)
Não descritas		
A503G/+	2/300 (0,8%)	2/63 (3,1%)
G241C/+	1/300 (0,3%)	1/63 (1,6%)
A583G/+	1/300 (0,3%)	1/63 (1,6%)
C684T (3'UTR)/+	1/300 (0,3%)	1/63 (1,6%)
Total parcial	5/300 (1,7%)	5/63 (7,9%)
Total	63/300 (21%)	63/63 (100%)

Dentre as 4 alterações não descritas, o resultado da análise do programa *PolyPhen* que avalia a probabilidade da variante ser ou não patogênica, indicou apenas a substituição A583G (M195V) como uma provável mutação patogênica. Essa mutação foi identificada em heterozigose apenas no propósito 15177L e a surdez apresentada por esse indivíduo é um caso

isolado na família. As demais três substituições foram consideradas pelo programa como sendo provavelmente benignas.

Todas as quatro variantes não descritas foram detectadas em heterozigose e apenas a mutação A503G foi identificada em dois propósitos distintos (16586 e 17146), também em heterozigose. Nesses dois casos, o propósito era caso isolado.

Em resumo, a triagem das mutações 35delG, 167delT no gene *GJB2* e del(*GJB6*-D13S1830) e del(*GJB6*-D13S1854) no gene *GJB6*, a análise por SSCP e o seqüenciamento do exon 2 do gene *GJB2*, permitiram que identificássemos, dentre o total de 300 propósitos que formam a nossa casuística, 63 (21%) indivíduos surdos com variantes no loco DFNB1. Na tabela VIII há a relação de todas alterações identificadas.

Se considerarmos apenas as mutações conhecidamente patogênicas, temos um total de 41 propósitos que representam 13,7% da casuística total ou 65,1% do total de 63 amostras em que foram encontradas variantes genéticas nos genes *GJB2* e *GJB6*. Dentre esses 41 indivíduos, em 33 (23 homozigotos e 10 heterozigotos compostos) foi possível concluir que o quadro clínico de surdez era devido à presença dessas mutações. Em 8 casos não foi possível ter certeza se as mutações eram a causa de surdez. A mutação 35delG foi a mutação predominante, pois foi identificada em 37 propósitos do total de 41, seguida da del(*GJB6*-D13S1830) identificada em heterozigose com a 35delG em 3 indivíduos. Já as mutações 167delT, 235delC e G380A foram identificadas, cada uma, em dois propósitos diferentes. As demais mutações foram identificadas apenas uma vez na casuística total.

V - DISCUSSÃO

V - DISCUSSÃO

V.1 - Triagem das mutações 35delG e 167delT no gene *GJB2* e del(*GJB6-D13S1830*) e del(*GJB6-D13S1854*) no gene *GJB6*

Diversos estudos em diferentes populações têm descrito a prevalência das principais variantes nos genes *GJB2* e *GJB6* em indivíduos com deficiência auditiva. A maioria deles tem como foco principal os casos de surdez de herança autossômica recessiva, preliminarmente selecionados. Todos esses estudos têm demonstrado que a mutação 35delG do gene *GJB2* é a variante mais comumente identificada entre os indivíduos que apresentam surdez não-sindrômica autossômica recessiva.

A mutação 35delG tem se mostrado muito freqüente em diversos grupos populacionais, possuindo uma freqüência nas populações de surdos que pode variar de 28% a 63% dentre os casos de herança autossômica recessiva e de 10% a 33% dentre os casos isolados (Denoyelle e col., 1997; Kelley e col., 1998; Gualandi e col., 2002; Seeman e col., 2004; Marlin e col., 2005). No presente estudo identificamos a mutação 35delG em 12,7% do total de 300 indivíduos com deficiência auditiva analisados não selecionados pelo mecanismo de herança (isolados e familiares). Dentre os 63 indivíduos em que foram identificadas alterações no loco DFNB1, a mutação 35delG foi identificada em 58,7% dos casos. Já dentre os casos previamente identificados como de herança recessiva, ela estava presente em 48% dos casos. Dentre o total de casos isolados, a mutação 35delG foi detectada em 6,7% dos propósitos e obviamente não teria sido identificada se selecionássemos apenas os casos familiares.

Nossos dados confirmam que a mutação 35delG presente no loco DFNB1 é uma das mais importantes mutações relacionadas à surdez não-sindrômica autossômica recessiva na nossa população. É importante lembrar que nas populações de origem asiática e africana, raramente a mutação 35delG é encontrada e que os propósitos aqui avaliados resultam de uma amostra heterogênea etnicamente, fato comum na população brasileira. Porém, há predomínio de indivíduos com origem européia na nossa casuística, uma vez que a maioria é formada por brancos, o que provavelmente explica a alta prevalência da 35delG como causa de surdez.

Outro dado interessante, ainda em relação à mutação 35delG, é a ocorrência de famílias que mostram surdez de herança “pseudo-dominante”. Esse tipo de herança pode ocorrer quando mutações recessivas em um mesmo gene entram diversas vezes em uma genealogia, sem que haja consangüinidade. Essa exceção para o modelo clássico da transmissão típica de um traço recessivo ocorre como consequência da alta freqüência de portadores de mutações no gene *GJB2* e do casamento preferencial entre surdos (Wilcox e

col., 1999; Pampanos e col., 2000; Gualandi e col., 2002). Na nossa casuística identificamos dois exemplos de casos de surdez familiar que foram primeiramente identificados como possivelmente dominantes nos quais posteriormente a mutação 35delG foi detectada em homozigose ou associada a outras mutações no gene *GJB2* (Família 14604/Figura 26 e Família 15115/Figura 24, p.50).

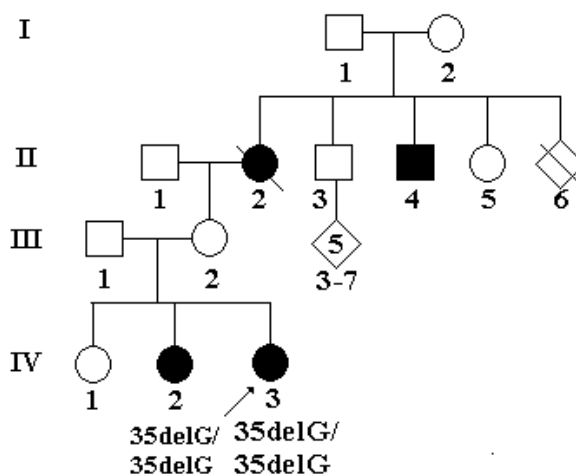


Figura 26 - Heredograma da família 14604. Nessa família a herança é aparentemente dominante, mas a detecção da 35delG sugere que a herança é recessiva e que a mutação deve ter entrado na família também pelo indivíduo I-1 ou I-2.

Vários estudos têm demonstrado que os pacientes que apresentam a mutação 35delG exibem surdez que pode variar de grave a profunda (Cohn e col., 1999; Wilcox e col., 2000; Cryns e col., 2004, Marlin e col., 2005). Os resultados obtidos nesse estudo reforçam esses achados, pois na maioria dos propósitos onde a mutação 35delG foi identificada em homozigose tiveram grau da perda auditiva também variando de grave a profundo. No entanto, em dois dos propósitos (16278 e 16748/Anexo 2, p.97 e p.100, respectivamente) a perda auditiva foi classificada como moderada. Outro fato que chama a atenção em nossa casuística é a presença de um membro na família do propósito 16748 (16748A) que apesar de apresentar a mutação 35delG em homozigose, não manifesta deficiência auditiva (Lezirovitz e col., 2005). Esse indivíduo atualmente tem quatro anos de idade, o que não exclui a possibilidade de ainda vir a manifestar perda auditiva. Além desse indivíduo, o propósito 15370 (Anexo 2, p.95), que também é homozigoto para a 35delG, veio a manifestar surdez após a aquisição da fala. Os estudos que relacionam o quadro clínico da surdez em pacientes que possuem essa mutação relatam que os mesmos apresentam geralmente surdez pré-lingual. De qualquer modo, é comum em várias doenças hereditárias variações de quadro clínico entre indivíduos que possuem as mesmas mutações. Essas variações poderiam estar relacionadas com alterações na região promotora do gene, ação de genes adicionais (como por exemplo, o

gene *GJB6*) e/ou genes modificadores e fatores ambientais. Já entre os heterozigotos compostos para a mutação 35delG, o grau da perda auditiva varia de acordo com o tipo da segunda mutação presente, uma vez que a patogenicidade dessas mutações depende de vários fatores, entre os quais a natureza da substituição e conseqüentemente a posição da mutação na proteína. Cryns e col. (2004), ao tentarem relacionar o fenótipo da surdez com o genótipo em relação às diferentes mutações do gene *GJB2*, relataram que não existe diferença clínica significativa entre os homozigotos com a 35delG e os heterozigotos compostos com os seguintes genótipos: 35delG/G71A, 35delG/G139T, 35delG/167delT, 35delG/G283A, 35delG/313del14, 35delG/C427T, 35delG/G439A. Nos nossos casos de 35delG/G71A e 35delG/167delT a perda era grave.

A mutação 167delT, comumente detectada na população judaica, afeta a primeira alça extracelular e assim como a 35delG, leva à formação de uma proteína truncada e, portanto não funcional. A triagem da mutação 167delT em nossa casuística identificou duas propósitos com essa mutação em heterozigose, cujo grau da perda auditiva variou de moderado a grave (15080/p.43 e 16354/Figura 17, p.44). Esses resultados reforçam os estudos que associam a mutação 167delT com um quadro clínico de surdez que varia de grave a profundo (Cryns e col., 2004; Marlin e col., 2005; Snoeckx e col., 2005b).

A deleção del(*GJB6*-D13S1830) de 309kb do gene *GJB6* foi identificada em três indivíduos, dentre os 15 heterozigotos com 35delG ou com mutação em apenas um alelo, o que fez dessa deleção a segunda mutação mais freqüentemente detectada em nossa casuística. Em outro estudo realizado no Brasil, porém com uma amostra formada por apenas 33 surdos da região sudeste, Piatto e col., (2004) detectaram a del(*GJB6*-D13S1830) em dois dos nove afetados que apresentaram mutações no gene *GJB2* em um de seus alelos. A del(*GJB6*-D13S1830), em nosso estudo, não foi detectada em nenhum dos demais propósitos além dos que tinham a mutação 35delG em heterozigose. Quanto à del(*GJB6*-D13S1854), ela não foi identificada em nenhum dos 300 propósitos da nossa casuística, o que indica que ela não deve ser causa importante de surdez na nossa população. No entanto, no estudo multicêntrico realizado por Del Castillo e col. (2005), foi relatada a ocorrência dessa deleção no grupo dos pacientes brasileiros, em apenas um dos 16 heterozigotos previamente identificados com uma mutação no gene *GJB2*. A perda auditiva nos indivíduos que possuem essas deleções é descrita como variando de moderada a profunda (Bolz e col., 2004; Feldmann e col., 2004; Dalamon e col., 2005, Del Castillo e col., 2005; Marlin e col., 2005). Em dois dos três propósitos (15362V e 16000/Anexo 2, p.94 e 98, respctivamente) com a del(*GJB6*-D13S1830) identificados em nosso estudo, a perda auditiva foi considerada mais grave do que

os demais com a surdez relacionada com a presença das outras mutações no gene *GJB2*, o que também foi visto em outros estudos da literatura (Feldmann e col., 2004; Roux e col., 2004).

A herança digênica, devida a mutações presentes nos genes *GJB2* e *GJB6* em nossa casuística, reforça a hipótese de Del Castillo e col. (2002) de que o DFNB1 é um loco complexo. Além disso, a presença de alterações em alelos pertencentes a dois genes diferentes levando ao quadro clínico de surdez, reforça as hipóteses de que as conexinas 26 e 30 interagem entre si formando conexons heteroméricos e/ou canais de junção do tipo *gap* heterotípicos ou que a presença dessa deleção no gene *GJB6* removeria algum elemento regulatório no gene *GJB2*, afetando assim a sua expressão. (Marziano e col., 2003; Commom e col., 2005). A hipótese de que a deleção no gene *GJB6* remove algum elemento regulatório no gene *GJB2*, afetando assim sua expressão nos parece mais plausível. Entretanto, outros estudos devem ser realizados para elucidar de que maneira esses genes estariam interagindo nos indivíduos portadores de alterações nos genes *GJB2* e *GJB6* de modo a causar a surdez .

V.2 - Análise de SSCP e seqüenciamento do gene *GJB2* (outras mutações no gene *GJB2*)

Além da mutação 35delG e 167delT, identificamos outras 17 alterações diferentes no gene *GJB2*. Dentre essas alterações, 13 já foram previamente descritas e 4 são alterações novas (Estivill e Gasparini, 2006). Entre as alterações já descritas, 8 são patogênicas: G71A (W24X), 176-191del16, 235delC, G109A (V37I), G380A (R127H), T269C (L90P), 509insA e G551C (R184P) e 5 são consideradas polimorfismos sem efeito: T/C -15, G79A (V27I), A120C (A40A), G468A (G160S) e T101C (M34T).

A mutação G71A ou W24X, está localizada no primeiro domínio transmembrânico da proteína conexina 26 e se caracteriza pela substituição do aminoácido triptofano na posição 24 por um códon de parada prematuro, levando à formação de uma proteína truncada e conseqüentemente não funcional. Essa mutação foi descrita primeiramente por Kelsell e col. em 1997 em duas famílias consanguíneas paquistanesas. Posteriormente outros estudos identificaram essa mutação na população de surdos especialmente da região do sudeste da Ásia, do Irã, da República Tcheca e da Grécia (Kudo e col., 2001; Najmabadi e col., 2002; Pampanos e col., 2002). Na Índia, Maheshwari e col. (2003) identificaram essa mutação em 13,3% da população surda estudada, o que sugere que essa mutação é comum na população desse país. Essa mutação também foi identificada em 50% dos indivíduos surdos da população cigana hispano-romana e em 22,2% dos casos de surdez na população cigana eslovaca (Minarik e col., 2003; Alvarez e col., 2005). A mutação G71A foi identificada em heterozigose, com a 35delG, em apenas um dos nossos propósitos, cuja perda auditiva foi

classificada como grave (Família 16495/Figura 20, p.47). Não foi possível identificar a origem desse propósito, mas ele foi caracterizado como sendo branco.

As mutações 176-191del16 e 235delC também levam à formação de uma proteína truncada e, portanto não funcional, mas nesses casos, isso ocorre por alteração do quadro de leitura. A variante 176-191del16 está localizada na região correspondente à primeira alça extracelular. Já a mutação 235delC está localizada no segundo domínio transmembrânico da proteína conexina. As mutações 176-191del16 e 235delC só foram descritas em populações asiáticas, sendo a variante 235delC considerada como a principal mutação na população asiática, com “status” comparável ao da mutação 35delG na população caucasiana. Já a mutação 176-191del16 foi descrita primeiramente por Kudo e col. em 2000, sendo detectada somente na população japonesa. Essas duas variantes foram identificadas em heterozigose com a mutação 35delG, em dois propósitos distintos, sendo que a perda auditiva foi caracterizada como profunda (Família 14401/Figura 23, p. 49 e Família 15115/Figura 24, p. 50). Nas duas famílias foi possível confirmar a origem japonesa.

Vários estudos têm indicado a existência de fenótipos menos graves de surdez relacionados com certas variantes, especialmente com as mutações G109A (ou V37I) e G380A (ou R127H) (Bruzzzone e col., 2003; Oguchi e col., 2005). Entretanto, esses achados são contraditórios quando comparados aos resultados dos estudos funcionais que demonstram completa perda da atividade dos canais formados por proteínas que contêm essas variantes (D’Ándrea e col., 2002, Bruzzzone e col., 2003, Snoeckx e col., 2005b). A mutação G109A foi inicialmente identificada como um polimorfismo sem efeito, mas o fato do resíduo 37 que corresponde a uma valina ser altamente conservado entre as conexinas e a existência de indivíduos surdos que apresentam essa variante em homozigose ou em heterozigose com outras mutações no gene *GJB2* indicaram que a mesma poderia ser uma mutação patogênica (Kelley e col., 1998; Abe e col., 2000; Rabionet e col., 2000; Marlin e col., 2001). Em estudos populacionais com indivíduos normais, essa mutação não foi detectada na Alemanha, Itália, Espanha, Grécia, Israel e Ghana. No entanto, ela foi detectada com uma alta frequência em heterozigose na população normal do Japão, tendo sido caracterizada como a segunda mutação mais frequente entre surdos japoneses (Abe e col., 2000, Kudo e col., 2000; Ohtsuka e col., 2003; Oguchi e col., 2005). O único propósito identificado com a mutação G109A (ou V37I) em heterozigose com a mutação 35delG apresentou perda auditiva leve, o que coincide com as descrições prévias do quadro clínico de surdez com essa mutação (Família 17241/Figura 21, p.48). Tanto a isoleucina (que é o aminoácido que substitui a valina nessa mutação) quanto a valina são aminoácidos apolares, cujas propriedades físico-químicas são muito semelhantes, o que pode talvez justificar o quadro clínico de surdez leve apresentado

pelos pacientes com essa variante. O paciente tem origem japonesa. Já a variante G380A ou R127H é considerada tanto um polimorfismo sem efeito por alguns autores (Marlin e col., 2001; Thonnissen e col., 2002) quanto uma mutação patogênica por outros (Estivill e col., 1998; D'Ándrea e col., 2002; Wang e col., 2002). Ela leva à substituição de uma arginina por uma histidina, ambos com características polares, no resíduo 127, localizado na alça citoplasmática. Toth e col. (2004), em um estudo familiar, identificaram a mutação G380A em homozigose segregando com surdez profunda. Posteriormente, estudos funcionais evidenciaram que as conexinas que contêm essa mutação possuem menor eficiência quando comparadas com as selvagens (Palmada e col., 2005). No entanto, em um estudo realizado por Roux e col. (2004) com famílias que possuíam indivíduos afetados por surdez não-sindrômica, foram identificados dois indivíduos com audição normal, mas portadores homozigotos da mutação G380A. De qualquer modo, essa variante foi identificada em heterozigose em dois propósitos diferentes (16020 e 16508/Anexo 2, p.95 e 98, respectivamente) da nossa casuística, sem que uma segunda mutação fosse detectada, o que não nos permite concluir se a surdez apresentada por esses indivíduos pode ser devida à presença da mutação G380A. A surdez foi classificada como grave no propósito 16020. No propósito 16508 o grau da perda auditiva foi descrito como profundo na orelha direita e a audiometria era normal na orelha esquerda.

A mutação T269C ou L90P, descrita em 1999 por Murgia e col., também está relacionada com um fenótipo de surdez mais brando, que pode variar de leve a moderado. Essa mutação está localizada no segundo domínio transmembrânico da proteína e a substituição do aminoácido leucina por uma prolina no resíduo 90 resulta na formação de canais de junção do tipo *gap* não funcionais. (Thonnissen e col., 2002; Bruzzone e col., 2003; Tekin e col., 2003; Snoeckx e col., 2005b) A mutação T269C não é frequentemente detectada na população normal, o que faz com que ela seja considerada provavelmente uma mutação deletéria (Roux e col., 2004; Marlin e col., 2005). Em um estudo com indivíduos afetados por surdez recessiva da Áustria, Janecke e col. (2002) encontraram uma frequência de 9,8% para a mutação T269C, tendo sido considerada a segunda mutação mais frequente nessa população após a mutação 35delG. O único propósito onde essa variante foi identificada em heterozigose com a mutação 35delG possui perda auditiva leve na orelha esquerda e moderada na orelha direita, o que vem a confirmar essa tendência de fenótipos mais leves (Família 15481/Figura 18, p.45).

Denoyelle e col. descreveram a variante 509insA pela primeira vez em 1999 em um estudo familiar com indivíduos surdos da França. Essa variante, que afeta a segunda alça extracelular, é caracterizada pela inserção de uma adenina no resíduo 509, o que altera o

quadro de leitura e leva à formação de uma proteína truncada. Na nossa casuística, essa mutação foi detectada em heterozigose em dois indivíduos afetados por surdez profunda de uma mesma família, em combinação com a mutação 35delG (Família 15513/Figura 19, p.46). Esses dois propósitos apresentaram a variante T101C (ou M34T) em *cis* com a variante 509insA. Apesar da variante T101C ser considerada atualmente como um polimorfismo sem efeito, ela já foi identificada em homozigose associada a uma deleção de 10pb na região 5'UTR (também em homozigose) em indivíduos surdos (Houseman e col., 2001). No entanto, não podemos relacionar com certeza a presença dessa variante com a surdez apresentada por esse propósito, pois o mais provável é que a surdez decorra da presença das mutações 35delG e 509insA.

Finalmente, outra mutação patogênica identificada em nossa casuística foi a C551G (ou R184P). Essa mutação foi detectada em homozigose em um único propósito. Não foi possível caracterizar a surdez devido à falta de informações. Essa mutação foi descrita por Denoyelle e col. (1999) associada com outra mutação do gene *GJB2*, em um indivíduo que possuía surdez variando de moderada a grave. A mutação C551G afeta o resíduo 184, localizado na segunda alça extracelular, o qual é totalmente conservado entre as conexinas e se caracteriza pela substituição de uma arginina, que é um aminoácido polar, por uma prolina, que é um aminoácido não polar. Essa substituição afeta a formação do conexon, levando a uma degradação mais rápida do mesmo (Denoyelle e col., 1999).

Outras variantes já descritas consideradas como não patogênicas foram identificadas nos propósitos da nossa casuística em heterozigose, com exceção da T101C que foi detectada em homozigose em um dos propósitos analisados.

O polimorfismo C/T -15 está localizado na região 5' não traduzida no intron 1 do gene da conexina 26. Esse polimorfismo foi descrito pela primeira vez por Zariwala (Estivill e Gaparini, 2006). São poucos os dados sobre a sua frequência na população em geral. Essa variante não patogênica foi identificada em heterozigose em dois propósitos da nossa casuística, no irmão afetado de um dos propósitos (16703C/Anexo 2, p.100) e em um indivíduo não afetado (16910J/Anexo 2, p.101).

Outro polimorfismo sem efeito que foi detectado em heterozigose em seis dos propósitos foi o G79A (ou V27I), onde uma adenina é substituída por uma guanina no resíduo 79. Essa substituição ocorre na região do primeiro domínio transmembrânico da conexina 26 e leva à troca do aminoácido valina por uma isoleucina. Tanto a valina quanto a isoleucina são aminoácidos não polares. A alteração V27I foi descrita pela primeira vez por Kelley e col. em 1998. Na população chinesa ela foi detectada tanto em indivíduos controles quanto afetados, tendo sido estabelecida uma frequência de 30% para esse alelo entre os controles normais (Li

e col., 2003). Foi observada uma frequência de 52% desse alelo em heterozigose na população japonesa ouvinte (Kudo e col., 2000). Em um estudo realizado entre 430 surdos do Paquistão esse polimorfismo foi detectado em heterozigose em apenas um indivíduo (Santos e col., 2005). Nossos achados sugerem que esse polimorfismo deve ser comum também em nossa população. Dentre os pacientes em que foi possível verificar o grupo étnico, 3 eram brancos e 2 eram pardos.

A mutação A120C ou A40A, também considerada um polimorfismo sem efeito, descrita por Rabionet (Estivill e Gaparini, 2006), foi detectada em heterozigose em apenas um paciente. Ela se caracteriza pela substituição de uma citosina por uma adenina na região da primeira alça extracelular da proteína e não acarreta substituição de aminoácido.

A variante A468G (G160S) foi descrita por Scott e col. (1998) como sendo um polimorfismo sem efeito, com uma frequência de 2% na população normal estudada. A mutação A468G se caracteriza pela substituição de uma serina por uma glicina, no resíduo 160 na segunda alça extracelular. Essa variante foi detectada em heterozigose em um único propósito da nossa casuística.

A variante T101C ou M34T, detectada em 7 propósitos da nossa casuística, tem se mostrado como sendo uma variante frequente tanto na população ouvinte quanto na de surdos (Tabela IX). Ela exhibe um histórico controvertido, pois em estudos *in vitro* ela resulta em incapacidade de formar canais de junção do tipo *gap* funcionais. No entanto, o fato dessa variante já ter sido identificada em *trans* com outras variantes patogênicas no gene *GJB2* em indivíduos não afetados por surdez, reforça a hipótese dela ser apenas um polimorfismo frequente na população, mas sem efeito (Griffith e col., 2000; Feldmann e col., 2004). Em nossa amostra, a variante T101C foi detectada em heterozigose em um dos propósitos (14960/Anexo 2, p.87), com surdez de grau moderado, associada à outra variante também não patogênica, G79A. A variante G79A sozinha é tida como não patogênica, mas em *cis* com a variante sem efeito A341G (E114G) foi descrita por Pandya e col. (2001) como sendo uma mutação recessiva e patogênica. O fato de termos detectado as duas variantes T101C e G79A não nos permite afirmar que a surdez, nesse caso, decorra da presença dessas duas mutações. Em outro propósito (17016/Anexo 2, p.102) a mutação T101C foi detectada em homozigose. No entanto, a irmã (17016U) desse propósito que também é afetada por surdez, apresenta essa variante em heterozigose, o que nos permite concluir que essa mutação não está segregando com a surdez nessa família. Nos outros 4 propósitos (15280 16416, 16647 e 16758/Anexo 2, p.90, 97, 99 e 101, respectivamente) essa variante foi detectada em heterozigose e nenhuma outra alteração foi identificada. Em nenhum caso da nossa casuística pode se afirmar com certeza que a surdez foi devida a essa mutação. Isso tudo nos leva a acreditar que o potencial

patogênico da mutação T101C permanece em aberto. Alguns estudos têm demonstrado que os efeitos clínicos dessa mutação T101C podem depender da atividade de outros genes e/ou da co-segregação com outras mutações provenientes da região não codificadora do gene *GJB2* (Zoll e col., 2003). Novos trabalhos devem ser realizados para poder fornecer um aconselhamento genético seguro para os indivíduos afetados por surdez portadores dessa alteração, bem como para os seus familiares.

Tabela IX - Prevalência dos portadores e heterozigotos compostos da alteração T101C (M34T) em populações normais e entre surdos, em diversas áreas geográficas (Tabela modificada de Kenneson e col., 2002).

País	População de ouvintes		População de surdos		Referência
	M34T/+	M34T/outros	M34T/+	M34T/outros	
França			0/88	0/88	Denoyelle e col. (1999)
	3/128	0/128	--	--	Green e col. (1999)
	1/116	0/116	3/96	1/96	Martin e col. (2001)
	2/116	0/116	--	--	Feldmann e col. (2004)
	81/3517	0/3517	5/159	--	Roux e col. (2004)
Japão	0/96	0/96	0/35	0/35	Abe e col. (2000)
	0/63	0/63	0/39	0/39	Kudo e col. (2000)
Coréia	0/100	0/100	0/147	0/147	Park e col. (2000)
Reino Unido e Irlanda	25/630	0/630	7/173	3/173	Housemann e col. (2001)
Estados Unidos	0/40	0/40	--	--	Kellsell e col. (2000)
	--	--	0/210	0/210	Mueller e col. (1999)
	--	--	1/52	1/52	Green e col. (1999)
	3/96	0/96	--	--	Kelley e col. (1998)
	--	--	1/30	3/30	Kenna e col. (2000)
Finlândia	1/100	0/100	--	--	Scott e col. (1998)
	26/313	--	--	--	Lopponen e col. (2003)
Brasil	--	--	4/300	2/300	presente estudo

Em nossa amostra detectamos 4 substituições não descritas: G241C (L81V), A503G (K168R), C/A 684 e A583G (M195V). A variante G241C está localizada no segundo domínio transmembrânico e faz com que uma leucina seja substituída por uma valina, ambos aminoácidos não polares, o que nos leva a acreditar que provavelmente se trata de uma variante não patogênica. Já a variante A503G, foi identificada em heterozigose em dois propósitos. Resulta em uma lisina sendo substituída por uma treonina no resíduo 168, localizado na segunda alça extracelular. A lisina é um aminoácido não polar, enquanto que a treonina é neutra. Essas propriedades físico-químicas e o resultado da análise do programa *PolyPhen* indicam que ela não deve ter efeito. Acreditamos que se trata também de uma variante não patogênica. Por estar localizada na região 3'UTR e portanto não acarretar

substituição de aminoácido, a variante C/A 684 também não deve ser patogênica. O estudo realizado com o grupo controle formado por 100 indivíduos ouvintes (50 brancos e 50 afro-descendentes) com a técnica de SSCP não identificou nenhuma dessas três variantes. Futuros estudos funcionais e mais estudos populacionais devem ser realizados para confirmar a natureza não patogênica dessas variantes.

A única nova variante encontrada em nosso estudo que o programa *Polyphen* indicou como sendo uma provável mutação patogênica foi a A583G. Ela está localizada no quarto domínio transmembrânico e leva à substituição de uma metionina por uma valina no resíduo 195. Apesar de ambos os aminoácidos serem apolares, a metionina possui enxofre em sua composição, o que leva a sugerir que esse aminoácido possa estar relacionado com a formação de pontes dissulfídicas, necessárias para que dois conexons de células adjacentes se unam no espaço extracelular, para formar o canal de junção do tipo *gap*. O fato dessa mutação ter sido detectada em heterozigose no propótipo 15177L sem outra mutação no gene *GJB2* (Anexo 2, p.88), não nos permite relacioná-la com certeza com a surdez apresentada. O caso era isolado na família e não temos atualmente amostra dos pais. Estudos adicionais com populações de ouvintes devem ser realizados com o intuito de se verificar o possível papel patogênico dessa mutação.

Como já foi dito anteriormente, entre os indivíduos que apresentam surdez não-sindrômica de herança autossômica recessiva, existe uma alta proporção (10% a 50%) de pessoas surdas que apresentam uma única mutação patogênica no gene *GJB2* (Del Castillo e col., 2003 e 2005). Em nosso estudo nós identificamos 37 indivíduos com a mutação 35delG no gene *GJB2*, sendo 22 homozigotos e 15 heterozigotos. Dentre os 15 heterozigotos, em 8 (53,3%) indivíduos não foi identificada uma segunda mutação no gene *GJB2*. A frequência desses indivíduos na casuística, de 8/300, é muita alta para ser atribuída somente ao acaso, dado que a frequência de heterozigotos na nossa população é de 1% (Sartorato e col., 2000). Esses resultados podem ser atribuídos a limitações nas técnicas utilizadas para triagem das mutações no gene ou a existência de mutações em outras regiões do gene *GJB2* que não foram estudadas (5'UTR, exon 1, parte da região 3'UTR e introns). Além disso, podem existir outras mutações no loco *DFNB1*, fora do gene *GJB2*, ou mesmo em outro loco determinante de surdez que podem estar interagindo com o gene *GJB2* para causar a surdez, de modo análogo aos que podem estar ocorrendo com as deleções del(*GJB6*-D13S1830) e del(*GJB6*-D13S1854) no gene *GJB6*.

Finalmente, os resultados obtidos em nosso estudo atestam a importância da triagem de mutações mais frequentes nos genes *GJB2* (35delG e 167delT) e *GJB6* em nosso meio (12,7% da casuística total). A maioria dos trabalhos de triagem de mutações no gene *GJB2*

realizam uma pré-seleção quanto aos indivíduos que serão estudados. Nosso objetivo era estudar mutações em uma amostra de indivíduos afetados por surdez não selecionados. O resultado foi, de certo modo, surpreendente porque em alguns casos onde foi identificada a mutação 35delG, os propósitos não apresentavam um quadro clínico de surdez compatível com o geralmente descrito na literatura em relação a esse genótipo (surdez pré-lingual, estacionária e profunda) ou a história familiar não sugeria herança recessiva. Por ser a surdez uma doença genética extremamente heterogênea, sem correlações precisas entre o genótipo e o fenótipo, e o mecanismo de herança aparente nem sempre ser confirmado na análise molecular, a triagem dessas mutações frequentes torna-se praticamente mandatória em todos os casos de surdez não-sindrômica, tanto isolados como familiares.

Foi notável em nosso estudo a diversidade de mutações detectadas na casuística, após a análise de SSCP. Ao todo nós identificamos 20 alterações diferentes, incluindo del(*GJB6*-D13S1830) no gene *GJB6*. Apesar de já existirem estudos em relação às variantes detectadas no gene *GJB2* no Brasil, o número e a diversidade de variantes detectadas nesses estudos e o número de indivíduos analisados foram menores quando comparados com os nossos resultados (Tabela II, p.25). Outro dado interessante é que a maioria dessas variantes até então não tinha sido identificada no Brasil. Em nosso estudo identificamos 4 novas variantes no gene *GJB2*, sendo somente uma delas potencialmente patogênica. Apesar da nossa amostra ser em sua maioria formada por brancos, a diversidade das mutações identificadas nesse estudo retrata a heterogeneidade étnica da nossa população, uma vez que as mutações são características de grupos populacionais diferentes.

Em resumo, a frequência da mutação 35delG no gene *GJB2* observada em nosso estudo aparentemente justifica a triagem dessa mutação em todos os indivíduos surdos, independente do histórico clínico ou familiar. Já em relação à mutação 167delT do gene *GJB2*, sua triagem estaria mais indicada entre os indivíduos cuja ascendência judaica fosse relatada, uma vez que essa mutação se mostrou específica a esse grupo populacional na nossa amostra. Quanto às deleções do gene *GJB6*, o fato da del(*GJB6*-D13S1830) ter sido a segunda mutação mais frequentemente identificada justifica a sua triagem em nosso meio. Atualmente, nosso laboratório tem trabalhado com um PCR *multiplex* descrito por Del Castillo e col. (2005), que permite que as duas deleções, del(*GJB6*-D13S1830) e del(*GJB6*-D13S1854), possam ser pesquisadas juntas, o que também facilita a triagem da del(*GJB6*-D13S1854).

Por outro lado, a triagem de mutações realizada por SSCP não demonstrou uma frequência significativa de variantes patogênicas no gene *GJB2*. Na prática, o estudo do SSCP seguido do sequenciamento permitiu detectar somente mais um caso (15572/Tabela VII, p.52) de mutação patogênica (C551G) que explicaria a surdez no propósito com certeza. Revelou-se

como uma estratégia mais produtiva o seqüenciamento direto do gene *GJB2* somente nos casos em que a mutação 35delG foi detectada em heterozigose. Assim, concluímos que, do ponto de vista da rotina de aconselhamento genético, o uso do SSCP é questionável principalmente em laboratório de prestação de serviços, que não estão comprometidos com a pesquisa. Trata-se de uma técnica trabalhosa e que ofereceu poucos resultados práticos do ponto de vista de aconselhamento genético das famílias. Um protocolo de triagem constituído pelos testes de detecção da 35delG no gene *GJB2*, del(*GJB6*-D13S1830) e del(*GJB6*-D13S1854) no gene *GJB6* e da mutação mitocondrial A1555G (Abreu-Silva e col., 2006), seguido do seqüenciamento do gene *GJB2* nos casos onde a 35delG é encontrada em heterozigose é o que nos parece mais adequado no momento para atender a maioria dos casos de solicitação de estudo genético na surdez.

Em 1998, Braga estimou que no Brasil as causas hereditárias contribuíam com 16% dos casos de surdez. Na nossa casuística, com a introdução dos testes moleculares, o fator genético contribuiu com certeza em 35,7% dos casos de surdez. Em países desenvolvidos essa frequência tem sido descrita como de 60% (Petit e col., 2001). Esse aumento significativo da contribuição do fator genético, obtido com o nosso estudo, se deve em parte à aplicação dos testes genéticos para detecção das mutações mais frequentes nos genes *GJB2* e *GJB6*. Além disso, esses achados sugerem que pode ter havido recentemente redução do papel dos fatores ambientais nos casos de surdez em nossa população, o que provavelmente está diretamente relacionado com as campanhas nacionais de vacinação contra a rubéola e melhoria nos cuidados à saúde materna e infantil. Convém lembrar que os pacientes que compareceram ao nosso serviço de aconselhamento genético podem ter sido previamente triados quanto à etiologia ambiental, de modo que a proporção de surdez genética pode estar superestimada. De qualquer modo, nosso estudo permitiu a identificação de 12 (6,7%) casos isolados de surdez com mutações que teriam sido considerados idiopáticos sem o auxílio dos testes moleculares. Portanto, um acréscimo de no mínimo 6,7% nos casos com diagnóstico de surdez genética ocorreu em decorrência do diagnóstico molecular.

VI - CONCLUSÕES

VI - CONCLUSÕES

Na nossa casuística de 300 indivíduos deficientes auditivos não selecionados, a mutação 35delG no gene *GJB2* foi a mutação mais frequentemente detectada (12,7% da amostra total), tendo sido identificada em 20,7% dos casos familiares e 6,7% dos casos isolados. Entre os casos de herança recessiva, a mutação 35delG estava presente em 48%. Já a deleção del(*GJB6*-D13S1830) no gene *GJB6* mostrou-se ser a segunda mutação mais freqüente na nossa casuística (1%).

Além da del(*GJB6*-D13S1830) no gene *GJB6*, identificamos 19 variantes no gene *GJB2* em nossa amostra. Dentre essas variantes, 10 são patogênicas: 35delG, G71A (W24X), 167delT, 176-191del16, 235delC, G109A (V37I), G380A (R127H), T269C (L90P), 509insA e G551C (R184P), 5 são polimorfismos sem efeito: T/C - 15, G79A (V27I), A120C (A40A), G468A (G160S) e T101C (M34T), e 4 são variantes novas: G241C (L81V), A503G (K168R), A583G (M195V) e C/A 684. A única nova variante encontrada em nosso estudo que o programa *Polyphen* indicou como sendo uma provável mutação patogênica foi a A583G

O número de variantes identificadas em nosso estudo e o fato de que algumas dessas variantes são características de diversos grupos populacionais confirmam a diversidade étnica da nossa população, embora a maioria da nossa casuística tenha sido formada por indivíduos classificados como brancos.

A triagem de mutações realizada por SSCP não demonstrou uma freqüência significativa de variantes patogênicas no gene *GJB2*, o que nos leva a conclusão de que do ponto de vista da rotina de aconselhamento genético, o uso do SSCP não é praticável principalmente em laboratório de prestação de serviços.

Nossos estudos indicaram a importância de se estabelecer um protocolo mínimo de triagem genética na deficiência auditiva que deve incluir, portanto, os testes de triagem das mutações 35delG no gene *GJB2* e del(*GJB6*-D13S1830) e del(*GJB6*-D13S1854) no gene *GJB6*, juntamente com o teste de triagem da mutação mitocondrial A1555G. Nos casos de detecção de mutação em heterozigose, o seqüenciamento do gene *GJB2* é recomendado para identificação da segunda mutação.

Nossos resultados indicaram que fatores genéticos foram a causa de surdez em pelo menos 35,7% da casuística estudada. O aumento dessa proporção em relação a estudos anteriores se deve possivelmente à realização de testes moleculares de triagem das mutações mais freqüentes nos genes *GJB2* e *GJB6* em portadores de deficiência auditiva, acompanhada da melhoria das condições de saúde materna e infantil.

VII - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

VII - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abe S, Usami S, Shinkawa H, Kelley PM, Kimberling WJ. (2000). Prevalent connexin 26 gene *GJB2* mutations in Japanese. *J Med Genet* 37:41-43.
- Abreu-Silva RS, Lezirovitz K, Braga MC, Spinelli M, Pirana S, Della-Rosa VA, Otto PA, Mingroni-Netto RC. (2006). Prevalence of the A1555G (12S rRNA) and tRNA Ser(UCN) mitochondrial mutations in hearing-impaired Brazilian patients. *Braz J Med Biol Res* 39(2):219-26.
- Alvarez A; del Castillo I; Pera A; Villamar M; Moreno-Pelayo MA; Rivera T; Solanellas J; Moreno F. (2003). Uniparental disomy of chromosome 13q causing homozygosity for the 35delG mutation in the gene encoding connexin26 (*GJB2*) results in prelingual hearing impairment in two unrelated Spanish patients. *J Med Genet* 40: 636-639.
- Alvarez A, del Castillo I, Villamar M, Aguirre LA, Gonzalez-Neira A, Lopez-Nevot A, Moreno-Pelayo MA, Moreno F. (2005). High prevalence of the W24X mutation in the gene encoding connexin-26 (*GJB2*) in Spanish Romani (gypsies) with autosomal recessive non-syndromic hearing loss. *Am J Med Genet A* 1;137(3):255-8.
- Antoniadi T, Gronskov K, Sand A, Pampanos A, Brondum-Nielsen K, Petersen MB. (2000). Mutation analysis of the *GJB2* (connexin 26) gene by DGGE in Greek patients with sensorineural deafness. *Hum Mutat* 16: 7-12.
- Antoniadi T, Rabionet R, Kroupis C, Aperis GA, Economides J, Petmezakis J, Economou-Petersen E, Estivill X, Petersen MB. (1999). High prevalence in the Greek population of the 35delG mutation in the connexin 26 gene causing prelingual deafness. *Clin Genet* 55(5):381-2.
- Bassam BJ, Catano-Anolles G, Gresshoff PM. (1991) Fast nad sensitive silver staining of DNA in polyacrilamide gels. *Anal Biochem* 196:80-83.
- Ben Arab S, Hmani M, Denoyelle F, Boulila-Elgaied A, Chardenoux S, Hachicha S, Petit C, Ayadi H. (2000). Mutations of *GJB2* in three geographic isolates from northern Tunisia: evidence for genetic heterogeneity within isolates. *Clin Genet* 57(6): 439-443.
- Berry A, Scott HS, Kudoh J, Talior I, Korostishevsky M, Wattenhofer M, Guipponi M, Barras C, Rossier C, Shibuya K, Wang J, Kawasaki K, Asakawa S, Minoshima S, Shimizu N, antonarakis S, Bonne-Tamir B. (2000). Refined Localization of Autosomal Recessive Nonsyndromic Deafness DFNB10 Locus Using 34 Novel Microsatellite Markers, Genomic Structure, and Exclusion of Six Known Genes in the region. *Genomics* 68(1)22-9.
- Bolz H, Schade G, Ehmer S, Kothe C, Hess M, Gal A. (2004). Phenotypic variability of non-syndromic hearing loss in patients heterozygous for both c.35delG of *GJB2* and teh 342-Kb deletion involving *GJB6*. *Hearing Research* 188:42-46.
- Braga MCC. (1998). Calculo de Risco em Doenças Geneticamente Heterogêneas: Desenvolvimento d Método e Aplicação no Caso da surdez Congênita. Dissertação de Mestrado. Instituto de Biociências da USP. São Paulo, SP.
- Brobby GW, Muller-Myhsok B, Horstmann RD. (1998). Connexin 26 R143W mutation associated with recessive nonsyndromic sensorineural deafness in Africa. *N Engl J Méd* 19;338(8):548-50.
- Bruzzo R, Veronesi V, Gomes D, Bicego M, Duval N, Marlin S, Petit C, D'andrea P, White TW. (2003). Loss-of-function and residual Channel Activity of Connexin 26 Mutations Associated With Non-syndromic deafness. *FEBS Letters* 533:79-88.
- Bruzzo R, White TW, Paul DL. (1996). Connections with connexins: the molecular basis of direct intercellular signaling. *Eur J Biochem* 15;238(1):1-27. Review.
- Campbell DA, McHale DP, Brown KA, Moynihan LM, Houseman M, Karbani G, Parry G, JanJua AH, Newton V, Al-Gazali L, Markham AF, Lench NJ, Mueller RF. (1997). A New Locus for

Non-syndromal, Autosomal Recessive, Sensorineural Hearing Loss (DFNB16) Maps to Human Chromosome 15q21-q22. *J Med Genet* 34(12):1015-7.

Carlson NR. (1998). **Physiology of behavior**. 6^a.ed. Allyn and Bacon, Boston.

Carrasquillo MM, Zlotogora J, Barges S, Chakravarti A. (1997). Two different connexin 26 mutations in an inbred kindred segregating non-syndromic recessive deafness: implications for genetic studies in isolated populations. *Hum Mol Genet* 6: 2163-2172.

Chang EH, Van Camp G, Smith RJ. (2003). The role of connexins in human disease. *Ear Hear* 24(4):314-23. Review.

Cohn ES e Kelley PM. (1999). Clinical phenotype and mutations in connexin 26 cause of childhood hearing loss. *Am J Hum Genet* 53(1):252-63.

Common JEA, Bitner-Glindzicz M, O'Toole EA, Barnes MR, Jenkins L, forges A, Kelsell DP. (2005). Specific loss of connexin 26 expression in ductal sweat gland epithelium associated with the deletion mutation del(*GJB6*-D13S1830). *Clin and Experim Derm* 30:688-693.

Common JE, Di WL, Davies D, Kelsell DP. (2004). Further evidence for heterozygote advantage of *GJB2* deafness mutations: a link with cell survival. *J Med Genet*.41(7):573-5.

Cottrell GT e Burt JM. (2005). Functional consequences of heterogeneous gap junction channel formation and its influence in health and disease. *Bioch Biophy Acta* 1711:126-141. Review.

Cryns H, Orzan E, Murgia A, Huygen PLM, Moreno F, Del Castillo I, Parker Chamberlin G, Azaiez H, Prasad S, Cucci RA, Leonardi E, Snoeckx RL, Govaerts PJ, Van de Heyning PH, Van de Heyning CM, Smith RJH, Van Camp G. (2004). A genotype-phenotype correlation for *GJB2* (connexin 26) deafness. *J Med Genet* 41:147-154.

Cryns K, Orzan E, Murgia A, Huygen PLM, Moreno F, del Castillo I, Parker C, Azaiez H, Prasad C, Cucci, Leonardi E, Snoeckx RL, Govaerts PJ, Van de Heyning PH, Van de Heyning CM, Smith FRJH, Van Camp G. (2002). A genotype-phenotype correlation for *GJB2* (connexin 26) deafness. *J Med Genet* 41: 147–154.

Dahl HH, Saunders K, Kelly TM, Osborn AH, Wilcox S, Cone-Wesson B, Wunderlich JL, Du Sart D, Kamarinos M, Gardner RJ, Dennehy S, Williamson R, Vallance N, Mutton P. (2001). Prevalence and nature of connexin 26 mutations in children with non-syndromic deafness. *Med J Aust* 175: 191-194.

D'Andrea P, Veronesi V, Bicego M, Melchionda S, Zelante L, Di Iorio E, Bruzzone R, Gasparini P. (2002). Hearing loss: frequency and functional studies of the most common connexin26 alleles. *Biochem Biophys Res Commun* 23;296(3):685-91.

Dalmon V, Beheran A, Diamante F, Pallares N, Diamante V, Elgoyhen AB. (2005). Prevalence of *GJB2* mutations and the del(*GJB6*-D13S1830) in Argentinean non-syndromic deaf patients. *Hear Res* 207(1-2):43-9.

Davis H e Silverman SR. (1970). Auditory Test Hearing Aids. In: DAVIS H, SILVERMAN SR, Hearing and Deafness. Holt: Rinehart and Winston.

Del Castillo FJ, Rodríguez-Ballesteros M, Alvarez A, Hutchin T, Leonardi E, Oliveira CA, Azaiez H, Brownstein Z, Avenarius MR, Marlin S, Pandya A, Shahin H, Siemering KR, Weil D, Wuys W, Aguirre LA, Martín Y, Moreno-Pelayo MA, Vilamar M, Abraham KB Dahl HHM, Kanaan M, Nance WE, Petit C, Smith RJH, Van Camp G, Sartorato EL, Murgia A, Moreno F, del Castillo I. (2005). 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 Genetic* 42:588-594.

Del Castillo I, Moreno-Pelayo MA, Del Castillo FJ, Brownstein Z, Marlin S, Adina Q, Cockburn DJ, Pandya A, Siemering KR, Chamberlin GP, Ballana E, Wuyts W, Maciel-Guerra AT, Alvarez A, Villamar M, Shohat M, Abeliovich D, Hans-Henrik MD, Estivill X, Gasparini P, Hutchin T,

- Nance WE, Sartorato EL, Smith RJH, Van Camp G, Avraham KB, Petit C, Moreno F. (2003). Prevalence and Evolutionary Origins of the del(*GJB6*-D13S1830) Mutation in the *DFNB1* Locus in Hearing-Impaired Subjects: a Multicenter Study. *Am J Hum Genet* 73:554-561.
- Del Castillo I, Villamar M, Moreno-Pelayo MA, del Castillo FJ, Alvarez A, Telleria D, Menendez I, Moreno F. (2002). A deletion involving the connexin 30 gene in nonsyndromic hearing impairment. *N Engl J Méd* 346(4):243-249.
- Denoyelle F, Lina-Granade G, Plauchu H, Bruzzone R, Chaib H, Levi-Acobas F, Weil D, Petit C. (1998). Connexin 26 gene linked to a dominant deafness. *Nature* 393:319-320.
- Denoyelle F, Marlin S, Weil D, Moatti L, Chauvin P, Garabedian EN, Petit C. (1999) Clinical features of the prevalent form of childhood deafness, *DFNB1*, due to a connexin-26 gene defect: implications for genetic counselling. *Lancet* 353:1298-1303.
- Denoyelle F, Weil D, Maw M A, Wilcox S A, Lench N J, Allen-Powell D R, Osborn A H, Dahl H H, Middleton A, Houseman M J, Dode C, Marlin S, Boulila-ElGaied A, Grati M, Ayadi H, BenArab S, Bitoun P, Lina-Granade G, Godet J, Mustapha M, Loiselet J, El-Zir E, Aubois A, Joannard A, Petit C, e col. (1997). Prelingual deafness: high prevalence of a 30delG mutation in the connexin 26 gene. *Hum Mol Genet* 6(12):2173-2177.
- Dong J, Katz DR, Eng CM, Kornreich R, Desnick RJ. (2001). Nonradioactive detection of the common Connexin 26 167delT and 35delG mutations and frequencies among Ashkenazi Jews. *Mol Genet Metab* 73(2): 160-3.
- Eckert R. (1988). **Animal physiology: mechanisms and adaptations**. New York: W.H. Freeman, 3rd ed.
- Engel-Yeger B, Zaaroura S, Zlotogora J, Shaley S, Hujeirat Y, Carrasquillo M, Barges S, Pratt H. (2002). The Effects of a Connexin 26 Mutation -35delG- in Oto-acoustic Emissions and Brainstem Evoked Potentials: Homozygotes and Carriers. *Hearing Research* 163:93-100.
- Essenfelder GM, Larderet G, Waksman G, Lamartine J. (2005). Gene structure and promoter analysis of the human *GJB6* gene encoding connexin 30. *Gene* 25;350(1):33-40.
- Estivill X e Gasparini P. (01/2006). **The Connexin-deafness homepage**. World Wide Web URL: <http://www.iro.es/cx26deaf.html>
- Estivill X, Fortina P, Surrey S, Rabionet R, Melchionda S, D'Agruma L, Mansfield E, Rappaport E, Govea N, Mila M, Zelante L, Gasparini P. (1998). Connexin-26 mutations in sporadic and inherited sensorineural deafness. *Lancet* 351(9100):394-8.
- Feldmann D, Denoyelle F, Loundon N, Weil D, Garabedian, EN, Couderc R, Joannard A, Schmerber S, Delobel B, Leman J, Journel H, Catros H, Ferrec C, Drouin-Garraud V, Obstoy MF, Moati L, Petit C, Marlin S. (2004). Clinical evidence of the nonpathogenic nature of the M34T variant in the connexin 26 gene. *Europ J Hum Genet* 12: 279-284.
- Fitzgerald T, Duva S, Ostrer H, Pass K, Oddoux C, Ruben R, Caggana M. (2004). The frequency of *GJB2* and *GJB6* mutations in the New York State newborn population: feasibility of genetic screening for hearing defects. *Clin Genet* 65(4):338-42.
- Fransen E, Van Camp G. (1999). The *COCH* gene: a frequent cause of hearing impairment and vestibular dysfunction? *Br J Audiol.* 33(5):297-302.
- Frei K, Szuhai K, Lucas T, Weipoltshammer K, Schofer C, Ramsebner R, Baumgartner WD, Raap AK, Bittner R, Wachtler FJ, Kirschhofer K. (2002). Connexin 26 mutations in cases of sensorineural deafness in eastern Austria. *Eur J Hum Genet* 10: 427-432.
- Fuse Y, Doi K, Hasegawa T, Sugii A, Hibino H, Kubo T. (1999). Three novel connexin 26 gene mutations in autosomal recessive non-syndromic deafness. *Neuroreport* 10:1853-1857.

- Gasmelseed NM, Schmidt M, Magzoub MMA, Macharia M, Elmustafa OM, Ototo B, Winkler E, Ruge G, Horstmann RD, Meyer CG. (2004). Low frequency of deafness-associated *GJB2* variants in Kenya and Sudan and novel *GJB2* variants. *Hum Mutat* 23(2):206-7.
- Gasparini P, Rabionet R, Barbujani G, Melchionda S, Petersen M, Brondum-Nielsen K, Metspalu A, Oitmaa E, Pisano M, Fortina P, Zelante L, Estivill X. (2000). High carrier frequency of the 35delG deafness mutation in European populations: Genetic Analysis Consortium of *GJB2* 35delG. *Eur J Hum Genet* 8(1):19-23.
- Gasparini P, Estivill X, Volpini V, Totaro A, Castellvi-Bel S, Govea N, Mila M, Della Monica M, Ventruto V, De Benedetto M, Stanziale P, Zelante L, Mansfield ES, Sandkuijl L, Surrey S, Fortina P. (1997). Linkage of *DFNB1* to non-syndromic neurosensory autosomal-recessive deafness in Mediterranean families. *Eur J Hum Genet* ;5(2):83-8.
- Gerido DA, White TW. Connexin disorders of the ear, skin, and lens. (2004). *Biochim Biophys Acta* 23;1662(1-2):159-70. Review.
- Green GE; Scott DA; McDonald JM; Woodworth GG; Sheffield VC; Smith RJH. (1999). Carrier rates in the midwestern United States for *GJB2* mutations causing inherited deafness. *JAMA* 281: 2211-2216.
- Grifa A, Wagner CA, D'Ambrosio L, Melchionda S, Bernardi F, Lopez-Bigas N, Rabionet R, Arbones M, Monica MD, Estivill X, Zelante L, Lang F, Gasparini P. (1999). Mutations in *GJB6* cause nonsyndromic autosomal dominant deafness at *DFNA3* locus. *Nature Genet* 23: 16-18.
- Griffith AJ, Chowdhry AA, Kurima K, Hood LJ, Keats B, Berlin CI, Morell RJ, Friedman TB. (2000). Autosomal recessive nonsyndromic neurosensory deafness at *DFNB1* not associated with the compound-heterozygous *GJB2* (connexin 26) genotype M34T/167delT. *Am J Hum Genet* 67: 745-749.
- Gualandi F, Ravani A, Berto A, Sensi A, Trabaneli C, Falciano F, Trevisi P, Mazzoli M, Tibiletti MG, Cristofari E, Burdo S, Ferlini A, Martini A, Calzolari E. (2002). Exploring the clinical and epidemiological complexity of *GJB2*-linked deafness. *Am J Med Genet* 112: 38-45.
- Guilford P, Ayadi H, Blanchard S, Chaib H, Le Paslier D, Weissenbach J, Drira M, Petit C (1994). A human gene responsible for neurosensory, non-syndromic recessive deafness is a candidate homologue of the mouse *sh-1* gene. *Hum Mol Genet* 3(6):989-93.
- Gurtler N, Y. Kim, A. Mhatre, R. Muller, R. Probst and A.K. (2003). *GJB2* mutations in the Swiss hearing impaired, *Ear Hear.* 24(5); 440-447.
- Hamelmann C, Amedofu GK, Albrecht K, Muntau B, Gelhaus A, Brobby GW, Horstmann RD. (2001). Pattern of connexin 26 (*GJB2*) mutations causing sensorineural hearing impairment in Ghana. *Hum Mutat* 18(1):84-5.
- Houseman, MJ, Ellis LA, Pagnamenta A, Di WL, Rickard S, Osborn AH, Dahl HHM, Taylor GR, Bitner-Glindzicz M, Reardon W, Mueller RF, Kelsell DP. (2001). Genetic analysis of the connexin-26 M34T variant: identification of genotype M34T/M34T segregating with mild-moderate non-syndromic sensorineural hearing loss. *J Med Genet* 38: 20-25.
- Janecke AR, Hirst-Stadlmann A, Gunther B, Utermann B, Muller T, Loffler J, Utermann G, Nekahm-Heis D. (2002). Progressive hearing loss, and recurrent sudden sensorineural hearing loss associated with *GJB2* mutations – phenotypic spectrum and frequencies of *GJB2* mutations in Austria. *Hum. Genet* 111:145-153
- Jun AI, McGuirt WT, Hinojosa R, Green GE, Fischel-Ghodsian N, Smith RJH. (2000). Temporal bone histopathology in connexin 26-related hearing loss. *Laryngoscope* 110:269-275.
- Junqueira LC e Carneiro J (1999). **Histologia Básica**. 9ª edição – Editora Guanabara Koogan S.A., Rio de Janeiro.

- Kalatzis V, Petit C. (1998). The fundamental and Medical Impacts of recent Progress in research on Hereditary Hearing Loss. *Hum Mol Genet* 7(10):1589-97.
- Keats BJB e Berlin CI. (1999). Genomics and Hearing Impairment. *Genome Research* 9(1):7-16.
- Kelley PM, Cohn E, Kimberling WJ. (2000). Connexin 26: required for normal auditory function. *Brain Res Brain Res Rev.* 32(1):184-8. Review.
- Kelley PM, Harris DJ, Comer BC, Askew JW, Fowler T, Smith SD, Kimberling WJ. (1998). Novel Mutations in the Connexin 26 Gene (*GJB2*) that Cause Autosomal Recessive (DFNB1) Hearing Loss. *Am J Hum Genet* 62:792-799.
- Kelsell DP, Dunlop J, Stevens HP, Lench NJ, Liang JN, Parry G, Mueller RF, Leigh IM. (1997). Connexin 26 Mutations in Hereditary Non-syndromic sensorineural Deafness. *Nature* 387(6628):80-3.
- Kelsell, DP, Wilgoss AL, Richard G, Stevens HP, Munro CS, Leigh IM, Kelley PM, Cohn E, Kimberling WJ (2000). Connexin 26: Required for normal auditory function. *Brain Res Rev* 32:184-188.
- Kenna MA, Wu BL, Cotanche DA, Korf BR, Rehm HL. (2001). Connexin 26 studies in patients with sensorineural hearing loss. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg.* 127(9):1037-42.
- Kenneson A, Van Naarden BK, Boyle C. (2002). *GJB2* (connexin 26) variants and nonsyndromic sensorineural hearing loss: a HuGE review. *Genet Med.* 4(4):258-74.
- Kiang DT, Jin N, Tu ZJ, Lin HH. (1997). Upstream genomic sequence of the human connexin26 gene. *Gene* 199: 165-17.
- Kok YJ, Bom SJ, Brunt TM, Kemperman MH, van Beusekom E, van der Velde-Visser SD, Robertson NG, Morton CC, Huygen PL, Verhagen WI, Brunner HG, Cremers CW, Cremers FP. (1999). A Pro51Ser mutation in the COCH gene is associated with late onset autosomal dominant progressive sensorineural hearing loss with vestibular defects. *Hum Mol Genet* 8(2):361-6.
- Krutovskikh V, Yamasaki H. (2000). Connexin gene mutation in human genetic diseases. *Mutation Researc*;462:197-207
- Kudo T, Ikeda K, Kure S, Matsubara Y, Oshima T, Watanabe K-I, Kawase T, Narisawa K, Takasaka T. (2000). Novel Mutations in the Connexin 26(*GJB2*) Responsible for Childhood Deafness in the Japanese Populations. *Am J Med Genet* 90: 141-145.
- Kudo T, Ikeda K, Oshima T, Kure S, Tammasaeng M, Prasansuk S, Matsubara Y. (2001). *GJB2* (connexin 26) mutations and childhood deafness in Thailand. *Otol Neurotol* 22 (6):858–861
- Lautermann J, Frank HG, Jahnke K, Traub O, Winterhanger E. (1999). Developmental expression patterns of connexin 26 and 30 in the rat cochlea. *Dev Genet* 25(4):306-311.
- Lefebvre PP & Van de Water TR. (2000). Connexins, Hearing and Deafness: Clinical Aspects of Mutations in the Connexin 26 gene. *Brain Research Reviews* 32:159-162.
- Lench NJ, Markham AF, Mueller RF, Kelsell DP, Smith RJ, Willems PJ, Schatterman I, Capon H, Van De Heyning PJ, Van Camp G. (1998). A Moroccan family with autosomal recessive sensorineural hearing loss caused by a mutation in the gap junction protein gene connexin 26 (*GJB2*), *J Med Genet* 35(2):151-152.
- Lerer I, Sagi M, Bem-Neriah Z, Wang T, Levi H, Abeliovich D. (2001). A deletion mutation in *GJB6* cooperating with a *GJB2* mutation in trans in non-syndromic deafness: A novel founder mutation in Ashkenazi Jews. *Hum Mutat* 18(5):460.
- Lerer I, Sagi M, Malamud E, Levi H, Raas-Rothschild A, Abeliovich D. (2000). Contribution of connexin 26 mutations to nonsyndromic deafness in Ashkenazi patients and the variable phenotypic effect of the mutation 167delT. *Am J Med Genet* 6;95(1):53-6.

- Lezirovitz K, Nicastro FS, Pardon E, Abreu-Silva RS, Batisso AC, Neustein I, Spinelli M, Mingroni-Netto RC. (2005). Is autosomal recessive deafness associated to oculocutaneous albinism a “coincidence syndrome”? (Program Number 1961) <http://www.ashg.org/cgi-bin/ashg05s/ashg05>
- Li JR, Chen Y, Guo WB, Li LX, Li RQ. (2003). Analysis on mutations of *GJB2* gene in Chinese population. *Zhonghua Yi Xue Yi Chuan Xue Za Zhi*.20(5):441-3. Abstract.
- Lim LH, Bradshaw JK, Guo Y, Pilipenko V, Madden C, Ingala D, Keddache M, Choo DI, Wenstrup R, Greinwald JH Jr. (2003). Genotypic and phenotypic correlations of DFNB1-related hearing impairment in the Midwestern United States. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 129(8): 836-40.
- Liu XZ, Xia XJ, Xu LR, Pandya A, Liang CY, Blanton SH, Brown SD, Steel KP, Nance WE (2000). Mutations in connexin31 underlie recessive as well as dominant non -syndromic hearing loss. *Hum Mol Genet* 9(1):63-7.
- Liu XZ, Xia XJ, Ke XM, Ouyang XM, Du LL, Liu YH, Angeli S, Telischi FF, Nance WE, Balkany T, Xu LR. (2002). The prevalence of connexin 26 (*GJB2*) mutations in the Chinese population. *Hum Genet* 111: 394-397.
- Löffler J, Nekahm D, Hirst-Stadlmann A, Gunther B, Menzel HJ, Utermann G, Janecke AR. (2001). Sensorineural hearing loss and the incidence of Cx26 mutations in Austria. *Eur J Hum Genet* 9(3): 226-30.
- Lopponen T, Vaisanen ML, Luotonen M, Allinen M, Uusimaa J, Lindholm P, Maki-Torkko E, Vayrynen M, Lopponen H, Leisti J. (2003). Connexin 26 mutations and nonsyndromic hearing impairment in northern Finland. *Laryngoscope*113(10):1758-63.
- Lucotte G, Bathelier C, Champenois T. (2001). 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* 15:57-59.
- Lucotte G, Pinna A.(2003). Elevated frequencies of the 35delG allele of the connexin 26 gene in Corsica, France. *Clin Genet* 64: 517-518. (Letter).
- Mahdieh N, Nishimura C, Ali-Madadi K, Riazalhosseini Y, Yazdan H, Arzhang S, Jalalvand K, Ebrahimi A, Kazemi S, Smith RJH, Najmabadi H. (2004). The frequency of *GJB2* mutations and the *GJB6*-D13S1830 deletion as a cause of autosomal recessive non-syndromic deafness in the Kurdish population. *Clin Genet* 65: 506–508
- Maheshwari M, Vijaya R, Ghosh M, Shastri S, Kabra M, Menon PS. (2003). Screening of families with autosomal recessive non-syndromic hearing impairment (ARNSHI) for mutations in *GJB2* gene: Indian scenario. *Am J Med Genet*15;120(2):180-4.
- Marlin S, Feldmann D, Blons , Loundon N, Rouillon I, Albert S, Chauvin P, Garabedian EN Couderc R, Odent S e col. (2001).*GJB2* and *GJB6* mutations: Genotypic and phenotypic correlations in a large cohort of hearing impaired patients. *Arch Otor Head Neck Surg* 131:481-487.
- Marlin S, Feldmann D, Blons H, Loundon N, Rouillon I, Albert S, Chauvin P, Garabedian EN, Couderc R, Odent S, Joannard A, Schmerber S, Delobel B, Leman J, Journal H, Catros H, Lemarechal C, Dollfus H, Eliot MM, Delaunoy JL, David A, Calais C, Drouin-Garraud V, Obstoy MF, Goizet C, Duriez F, Fellmann F, Helias J, Vigneron J, Montaut B, Matin-Coignard D, Faivre L, Baumann C, Lewin P, Petit C, Denoyelle F. (2005). *GJB2* and *GJB6* mutations: genotypic and phenotypic correlations in a large cohort of hearing-impaired patients. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg*. 131(6):481-7.
- Martin PE, Errington RJ, Evans WH. (2001). Gap junction assembly: multiple connexin fluorophores identify complex trafficking pathways. *Cell Commun Adhes* 8(4-6): 243-8.
- Marziano NK, Casalotti SO, Portelli AE, Becker DL, Forge A. (2003) Mutations in the Gene for Connexin 26 (*GJB2*) that cause hearing Loss a Dominant Negative Effect on Connexin 30. *Human Molec Genet* 12(8):805-812.

- McGuirt WT, Smith RJ. (1999). Connexin 26 as a Cause of Hereditary Hearing Loss. *Am J Audiology* 8:1059-1066.
- Medlej-Hashim M, Mustapha M, Chouery E, Weil D, Parronau J, Salem N, Delague V, Loiselet J, Lathrop M, Petit C, Megarbane A. (2002). Non-syndromic recessive deafness in Jordan: mapping of a new locus to chromosome 9q34.3 and prevalence of DFNB1 mutations. *Eur J Hum Genet* 10(6):391–394.
- Mesoletta M, Tranchino G, Nardone M, Motta S, Galli V. (2004). Connexin 26 mutations in nonsyndromic autosomal recessive hearing loss: speech and hearing rehabilitation. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol* 68: 995–1005.
- Meyer CG, Amedofu GK, Brandner JM, Pohland D, Timmann C, Horstmann RD. (2002). Selection for deafness? (Letter) *Nature Med* 8: 1332-1333.
- Minarik G, Ferak V, Ferakova E, Ficek A, Polakova H, Kadasi L. (2003). High frequency of *GJB2* mutation W24X among Slovak Romany (Gypsy) patients with non-syndromic hearing loss (NSHL). *Gen Physiol Biophys* 22(4):549–556.
- Morell RJ, Kim HJ, Hood LJ, Goforth L, Friderici K, Fisher R, Van Camp G, Berlin CI, Oddoux C, Ostrer H, Keats B, Friedman TB. (1998). Mutations in the connexin 26 gene (*GJB2*) among Ashkenazi Jews with nonsyndromic recessive deafness. *N Engl J Med.* 19;339(21):1500-5.
- Murgia A, Orzan E, Polli R, Martella M, Vinanzi C, Leonardi E, Arslan E, Zacchello F. (1999). Cx26 deafness: mutation analysis and clinical variability. *J Med Genet* 36: 829-832.
- Mueller RF, Nehammer A, Middleton A, Houseman M, Taylor GR, Bitner-Glindzicz M, Van Camp G, Parker M, Young ID, Davis A, Newton VE, Lench NJ. (1999). Non-syndromal sensorineural hearing impairment (NSSNHI) due to connexin 26 mutations: molecular and audiological findings. *J Med Gen* 36:pS28.
- Mustapha M, Salem N, Delague V, Chouery E, Ghassibeh M, Rai M, Loiselet J, Petit C, Megarbane A. (2001). Autosomal recessive non-syndromic hearing loss in the Lebanese population: prevalence of the 30delG mutation and report of two novel mutations in the connexin 26 (*GJB2*) gene. *J Med Genet.* 38(10):E36.
- Najmabadi H, Cucci RA, Sahebjam S, Kouchakian N, Farhadi M, Kahrizi K, Arzhangi S, Daneshmandan N, Javan K, Smith RJ. (2002). *GJB2* mutations in Iranians with autosomal recessive non-syndromic sensorineural hearing loss. *Hum Mutat* 19(5):572.
- Najmabadi H, Nishimura C, Kahrizi K, Riazalhosseini Y, Malekpour M, Daneshi A, Farhadi M, Mohseni M, Mahdih N, Ebrahimi A, Bazazzadegan N, Naghavi A, Avenarius M, Arzhangi S, Smith RJH. (2005). *GJB2* mutations: passage through Iran. *Am J Med Genet* 133A: 132-137.
- Nance WE, Liu XZ, Pandya A. (2000). Relation between choice of partner and high frequency of connexin-26 deafness. *Lancet* 356(9228):500-1.
- Nuldemann AA, Costa EA, Seligman J, Ibañez RN. (1997). **PAIR Perda Auditiva Induzida pelo Ruído.** 1ª edição – Editora Bagagem Comunicação Ltda. Porto Alegre, RS.
- Oguchi T, Ohtsuka A, Hashimoto S, Oshima A, Abe S, Kobayashi Y, Nagai K, Matsunaga T, Iwasaki S, Nakagawa T, Usami S. (2005). Clinical features of patients with *GJB2* (connexin 26) mutations: severity of hearing loss is correlated with genotypes and protein expression patterns. *J Hum Genet* 50:76-83.
- Ohtsuka I, Yuge S, Kimura A, Namba S, Abe L, Van Laer L, Van Camp G, Usami SI.(2003). *GJB2* deafness gene shows a specific spectrum of mutations in Japan, including a frequent founder mutation. *Hum Genet* 112(4):329–333.
- Oliveira CA, Alexandrino F, Abe-Sandes K, Silva WA Jr, Maciel-Guerra AT, Magna LA, Sartorato EL. (2004). Frequency of the 35delG mutation in the *GJB2* gene in samples of European, Asian, and African Brazilians. *Hum Biol.*76(2):313-6.

- Oliveira CA, Maciel-Guerra AT, Sartorato EL. (2002). Deafness resulting from mutations in the *GJB2* (connexin 26) gene in Brazilian patients. *Clin Genet* 61(5):354-8.
- Onay T, Topaloglu O, Zielenski J e col. (1998). Analysis of the CFTR gene in Turkish cystic fibrosis patients: identification of three novel mutations (3172delAC, P1013L and M1028I). *Hum Genet* 102: 224–230.
- Orzan E, Polli R, Martella M, Vinanzi C, Leonardi M, Murgia A. (1999). Molecular genetics applied to clinical practice: the Cx26 hearing impairment. *Br J Audiol* 33: 291-295.
- Pallares-Ruiz N, Blanchet P, Mondain M, Claustres M, Roux AF. (2002). A large deletion including most of *GJB6* in recessive non syndromic deafness: a digenic effect? *Eur J Hum Genet* 10(1):72-6.
- Palmada M., Schmalish K, Bohmer C, Schug N, Pfister, Lang F, Blin N. (2005). Loss of function mutations of the *GJB2* gene detected in patients with DFNB1 associated hearing impairment. *Neurobiol Dis*. (<http://www.elsevier.com/located/ynbdi>).
- Pampanos A, Neou P, Iliades T, Apostolopoulos N, Voyiatzis N, Grigoriadou M, Katsichti L, Skevas A, Petersen MB. (2000). Pseudodominant inheritance of DFNB1 deafness due to the common 35delG mutation. *Clin Genet* 57(3):232-4.
- Pampanos A, Economides J, Iliadou V, Neou P, Leotsakos P, Voyiatzis N, Eleftheriades N, Tsakanikos M, Antoniadis T, Hatzaki A, Konstantopoulou I, Yannoukakos D, Gronskov K, Brondum-Nielsen K, Grigoriadou M, Gyftodimou J, Iliades T, Skevas A, Petersen MB. (2002) Prevalence of *GJB2* mutations in prelingual deafness in the Greek population. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol.* 2;65(2):101-8
- Pandya A, Arnos KS, Xia XJ, Welch KO, Blanton SH, Friedman TB, Garcia Sanchez G, Liu XZ, Morell R, Nance WE. (2003). Frequency and distribution of *GJB2* (connexin 26) and *GJB6* (connexin 30) mutations in a large North American repository of deaf probands, *Genet Med* 5(4):295–303.
- Park HJ, Hahn SH, Chun YM, Park K, Kim HN. (2000). Connexin26 mutations associated with nonsyndromic hearing loss. *Laryngoscope* 110: 1535-1538.
- Parker MJ, Fortnum HM, Young ID, Davis AC, Mueller RF. (2000). Population-based genetic study of childhood hearing impairment in the Trent Region of the United Kingdom. *Audiology* 39(4):226–231.
- Petit C (1996). Genes Responsible for Human Hereditary Deafness: Symphony of a Thousand. *Nat Genet* 14(4):385-91. Review.
- Petit C, Levilliers J, Hardelin JP. (2001). Molecular Genetics of hearing loss. *Annu Rev Genet* 35:589-646.
- Piatto VB, Bertollo MGE, Sartorato EL, Maniglia JV. (2004). Prevalence of the *GJB2* mutations and the del(*GJB6*-D13S1830) mutation in Brazilian patients with deafness. *Hear Res* 196(1-2):87-93.
- Posukh O, Pallares-Ruiz N, Tadinova V, Osipova L, Claustres M, Roux AF. (2005). First molecular screening of deafness in the Altai Republic population. *BMC Med Genet* 24;6(1):12
- Pujol R, Réclar-Enjalbert V e Pujol T. (01/2006). **Promenade round the cochlea**. World Wide Web URL: <http://www.iurc.montp.inserm.fr/cric/audition/english/index.htm>.
- Rabionet R, Gasparini P, Estivill X. (2000). Molecular Genetics of Hearing Impairment due to Mutations in gap Junction Genes Encoding Beta Connexins. *Hum Mutat* 16(3):190-202.
- RamShankar M, Girirajan S, Dagan O, Ravi Shankar, Jalvi R, Rangasayee R, Avraham KB, Anand A.. (2003). Contribution of connexin 26 (*GJB2*) mutations and founder effect to non-syndromic hearing loss in India. *J Med Genetics* 40:41-46.

- Robertson NG, Lu L, Heller S, Merchant SN, Eavey RD, McKenna M, Nadol JB, Myyamoto RT, Linthicum FH, Lubianca Neto JF, Seidman CE, Morton CC, Seidman JG. (1998). Mutations in a novel cochlear gene cause DFNA9, a human nonsyndromic deafness with vestibular dysfunction. *Nat Genet* 20(3):299-303.
- Rothrock CR, Murgia A, Sartorato EL, Leonardi E, Wei S, Lebeis SL, Yu LE, Elfenbein JL, Fisher RA, Friderici KH. (2003). Connexin 26 35delG does not represent a mutational hotspot. *Hum Genet* 113(1):18-23.
- Roux AF, Pallares-Ruiz N, Vielle A, Faugere V, Templin C, Leprevost D, Artieres F, Lina G, Molinari N, Blanchet P, Mondain M, Claustres M. (2004). Molecular epidemiology of DFNB1 deafness in France. *BMC Med Genet* 06;5(1):5.
- Russo, IC. (2000). Overview of audiology in Brazil: state of the art. *Audiology* 39(4):202-6
- Santos F, Pena SDJ, Epplen JT. (1993). Genetic and population study of a Y-Linked tetranucleotide repeat DNA polymorphism with a simple non-Isotopic technique. *Hum Genet* 90:655-656.
- Santos RL, Wajid M, Pham TL, Hussan J, Ali G, Ahmad W, Leal SM. (2005) Low prevalence of Connexin 26 (GJB2) variants in Pakistani families with autosomal recessive non-syndromic hearing impairment. *Clin Genet* 67(1):61-8.
- Salvinelli F, Casale M, Alemanno I, Greco F, Trivelli M, Baldi A. (2003). Low prevalence of the deafness-associated 35delG mutation in the connexin-26 (GJB2) gene in a Sicilian population. *Clin Genet* 63:541–542.
- Sartorato EL, Gottardi E, de Oliveira CA, Magna LA, Annichino-Bizzacchi JM, Seixas CA, Maciel-Guerra AT. (2000). Determination of the frequency of the 35delG allele in Brazilian neonates. *Clin Genet* 58(4):339-40.
- Scott DA, Kraft ML, Carmi R, Ramesh A, Elbedour K, Yairi Y, Srisailapathy CR, Rosengren SS, Markham AF, Mueller RF, Lench NJ, Van Camp G, Smith RJ, Sheffield VC. (1998). Identification of mutations in the connexin 26 gene that cause autosomal recessive nonsyndromic hearing loss. *Hum Mutat* 11(5):387-94.
- Seeman P, Bendova O, Raskova D, Malikova M, Groh D, Kabelka Z. (2005). 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* 69(Pt 1):9-14.
- Seeman P, Malikova M, Raskova D, Bendova O, Groh D, Kubalkova M, Sakmaryyova E, Kabelka Z. (2004). Spectrum and frequencies of mutations in the GJB2 (Cx26) gene among 156 Czech patients with pre-lingual deafness. *Clin Genet* 66(2): 152-7.
- Shahin H, Walsh T, Sobe T, Lynch E, King MC, Avraham KB, Kanaan M. (2002). Genetics of congenital deafness in the Palestinian population: multiple connexin 26 alleles with shared origins in the Middle East. *Hum Genet* 110(3):284–289.
- Shalev SA e Hujirat Y. Maternal origin of a de novo mutation of the connexin 26 gene resulting in recessive nonsyndromic deafness. (Letter) *Am J Med Genet* 124A: 411-412, 2004
- Simsek M, Al-Wardy N, Al-Khayat A, Shanmugakonar M, Al-Bulushi T, Al-Khabory M, Al-Mujeni S, Al-Harathi S. (2001). Absence of deafness-associated connexin-26 (GJB2) gene mutations in the Omani population. *Hum Mutat*18(6):545-6.
- Snoeckx R, Djelantik B, Van Laer L, Van de Heyning P, Van Camp G. (2005a). GJB2 (connexin 26) mutations are not a major cause of hearing loss in the Indonesian population. *Am J Med Genetics* 1;135(2):126-9.
- Snoeckx RL, Huygen PLM, Feldmann D, Marlin S, Denoyelle F, Waligora J, Malgorzata MM, Polak A, Ploski R, Murgia A, Orzan E, Castorina P e col. (2005b). GJB2 Mutations And Degree Of Hearing Loss: A Multicenter Study. *Am J Hum Genet* 77:945-957.

- Sobe T, Erlich P, Berry A, Korostichevsky M, Vreugde S, Avraham KB, Bonne-Tamir B, Shohat M (1999). High frequency of the deafness-associated 167delT mutation in the connexin 26 (GJB2) gene in Israeli Ashkenazim. *Am J Med Genet* 86(5):499-500.
- Sobe T, Vreugde S, Shahin H, Berlin M, Davis N, Kanaan M, Yaron Y, Orr-Urtreger A, Frydman M, Shohat M, Avraham KB. (2000). The prevalence and expression of inherited connexin 26 mutations associated with nonsyndromic hearing loss in the Israeli population. *Hum Genet* 106(1):50-7.
- Storm K, Willocx S, Flothmann K, Van Camp G (1999). Determination of the carrier frequency of the common GJB2 (connexin-26) 35delG mutation in the Belgian population using an easy and reliable screening method. *Hum Mutat* 14(3):263-6.
- Sundstrom RA, Laer LV, Camp GV, Smith RJH (1999). Autosomal Recessive Nonsyndromic Hearing Loss. *Am J Med Genetics* 89:123-129.
- Tekin M, Duman T, Bogoclu G, Incesulu A, Comak E, Ilhan I, Akar N (2003). Spectrum of *GJB2* Mutations in Turkey Comprises Both Caucasian and Oriental Variants: roles of Parental Consanguinity and Assortative Mating. *Human Mutation*; 21(5):552-3
- Tekin, M, Akar N, Cin S, Blanton SH, Xia XJ, Liu XZ, Nance WE, Pandya A.(2001). Connexin 26 (*GJB2*) mutations in the Turkish population: implications for the origin and high frequency of the 35delG mutation in Caucasians. *Hum Genet* 108(5): 385-9.
- Thonnissen E, Rabionet R, Arbones ML, Estivill X, Willecke K, Ott T. (2002). Human connexin26 (*GJB2*) deafness mutations affect the function of gap junction channels at different levels of protein expression. *Human Genet* ([http:// www.spingerlink.com](http://www.spingerlink.com))
- Toth T, Kupka S, Haack B, Riemann K, Braun S, Fazakas F, Zenner HP, Muszbek L, Blin N, Pfister M, Sziklai I. (2004). *GJB2* mutations in patients with non-syndromic hearing loss from Northeastern Hungary. *Hum Mutat* 23(6):631-2.
- Tran Van Nhieu G, Clair C, Bruzzone R, Mesnil M, Sansonetti P, Combettes L. (2003). Connexin-dependent inter-cellular communication increases invasion and dissemination of *Shigella* in epithelial cells. *Nat Cell Biol.* 5(8):720-6.
- Uyguner O, Emiroglu M, Uzumcu A, Hafiz G, Ghanbari A, Baserer N, Yuksel-Apak M, Wollnik B. (2003). Frequencies of gap- and tight-junction mutations in Turkish families with autosomal-recessive non-syndromic hearing loss. *Clin Genet* 64(1):65-9.
- Van Camp G. e Smith RJH. (01/2006). **Hereditary hearing loss homepage**. World Wide Web URL: <http://www.uia.ac.be/dnalab/hhh/>
- Van Camp G, Willens PJ, Smith RJ (1997). Nonsyndromic Hearing Impairment: Unparalleled Heterogeneity; *Am J Hum Genet*; 60(4):758-64.
- Van Laer L, Coucke P, Mueller RF, Caethoven G, Flothmann K, Prasad SD, Chamberlin GP, Houseman M, Taylor GR, Van de Heyning CM, Franssen E, Rowland J, Cucci RA, Smith RJ, Van Camp G. (2001). A common founder for the 35delG *GJB2* gene mutation in connexin 26 hearing impairment. *J Med Genet* 38(8):515-8.
- Van Laer L, McGuirt WT, Yang T, Smith RJ, Van Camp G. (1999). Autosomal dominant nonsyndromic hearing impairment. *Am J Med Genet* 89(3):167-74. Review.
- Wang YC, Kung CY, Su MC, Su CC, Hsu HM, Tsai CC, Lin CC, Li SY. (2002). Mutations of Cx26 gene (*GJB2*) for prelingual deafness in Taiwan. *Europ J Hum Genet* 10: 495-498.
- Wattanasirichaigoon D, Limwongse C, Jariengprasert C, Yenchitsomanus PT, Tocharoenthanaphol C, Thongnoppakhun W, Thawil C, Charoenpipop D, Pho-iam T, Thongpradit S, Duggal P. (2004). High prevalence of V37I genetic variant in the connexin-26 (*GJB2*) gene among non-syndromic hearing-impaired and control Thai individuals. *Clin Genet* 66(5): 452-60.

- White TW, Deans MR, Kelsell DP, Paul DL. (1998). Connexin mutations in deafness. *Nature* 394: 630-631, 1998.
- White T. (2000). Functional analysis of human Cx26 mutations associated with deafness. *Brain Research* 32:181-183.
- Wilcox SA, Osborn AH, Dahl HH. (2000). simple PCR test to detect the common 35delG mutation in the connexin 26 gene. *Mol Diagn.* 5(1):75-8.
- Wilcox SA, Osborn AH, Allen-Powell DR, Mawb MA, Dahla HHM, McKinlay RJG. (1999). Connexin26 deafness in several interconnected families. *J Med Genet* 36:383-385.
- Willems PJ. (2000). Mechanism of Disease: Genetic Causes of Hearing Loss. *N Engl J Med* 342(15) 1101-1109.
- Wiszniewski W, Sobieszczanska-Radoszewska L, Nowakowska-Szyrwinska E, Obersztyn E, Bal J. (2001). High frequency of *GJB2* gene mutations in Polish patients with prelingual nonsyndromic deafness. *Genet Test* 5: 147-148.
- Xiao, Z, Xie DH. (2004). *GJB2* (Cx26) gene mutations in Chinese patients with congenital sensorineural deafness and a report of one novel mutation. *Chin Med J (Engl)* 117(12): 1797-801.
- Yan D, Park HJ, Ouyang XM, Pandya A, Doi K, Erdenetungalag R, Du LL, Matsushiro N, Nance WE, Griffith AJ, Liu XZ. (2003). Evidence of a founder effect for the 235delC mutation of *GJB2* (connexin 26) in east Asians. *Hum Genet* 114(1):44-50.
- Zanchetta S, Ohara K, Rodrigues PT, Carvalho EL, Richieri-Costa A (2000). “New” autosomal-dominant Infantile Sensorineural Non-progressive High-frequency Hearing Loss: Report on a Brazilian Family. *Am J Med Genet* 95(1):13-6.
- Zelante L, Gasparini P, Estivill X, Melchionda S, D’Agruma L, Govea N, Mila M, Monica MD, Lufti J, Shohat M, Mansfield E, delgrosso K, rappaport E, Surrey S, Fortina P (1997). Connexin 26 Mutations Associated With the Most Common Form of Non-syndromic Neurosensory Autosomal Recessive Deafness (DFNB1) in Mediterraneans. *Hum Mol Genet* 6(9):1605-9.
- Zinchenko RA, Zinchenko SP, Galkina VA, Elchinova GI, Nurbaev SD, Polyakov SV, Nekrasova NY, Ginter EK. Prevalence and molecular-genetic typing of nonsyndromic sensorineural deafness in Chuvash Republic. *Genetika* 39(9):1275–1284.
- Zoll B, Petersen L, Lange K, Gabriel P, Kiese-Himmel C, Rausch P, Berger J, Pasche B, Meins M, Gross M, Berger R, Kruse E, Kunz J, Sperling K, Laccone F. (2003). Evaluation of Cx26/*GJB2* in German hearing impaired persons: mutation spectrum and detection of disequilibrium between M34T (c.101T>C) and -493del10. *Hum Mutat.* 21(1):98.

VIII - ANEXOS

Anexo 1 – Cópia da ficha de anamnese utilizada na entrevista durante aconselhamento genético dos pacientes.

ESTUDO GENÉTICO-CLÍNICO DOS CASOS DE SURDEZ PARA USO EM ACONSELHAMENTO GENÉTICO:

DADOS PESSOAIS:

DATA:----- CASO N°:-----

NOME:-----

NASC.:----- IDADE:----- SEXO: M() F()

NATURAL:----- OCUPAÇÃO:-----

ESCOLARIDADE:-----

B() P () N ()

PAI:-----

IDADE:----- NATURAL:-----

OCUP.:----- ESCOL.:-----

MÃE:-----

IDADE:----- NATURAL:-----

OCUP.:----- ESCOL.:-----

ENDEREÇO:-----

TELEFONE:-----

ORIGEM DO PACIENTE:-----

MOTIVO DA CONSULTA:-----

HISTÓRICO FAMILIAL:

CONSANGÜINIDADE PARENTAL: ()NÃO ()SIM GRAU:-----

OUTROS CASOS DE SURDEZ NA FAMÍLIA: ()NÃO ()SIM

CASOS DE DOENÇAS GENÉTICAS NA FAMÍLIA: ()NÃO ()SIM

CONSULENTE JÁ TEVE ABORTOS: ()NÃO ()SIM

HEREDOGRAMA:

CARACTERIZAÇÃO DO TIPO DE SURDEZ:

() BILATERAL () UNILATERAL () ?

() ESTACIONÁRIA () PROGRESSIVA () ?

() LEVE (25-40 DB) () MODERADA (40-65 DB) () GRAVE (65-95 DB)

() PROFUNDA (> 95 DB)

() CONDUTIVA () NEUROSENSORIAL () MISTA () ?

ETIOLOGIA: () CONGÊNITA () PÓS-NATAL IDADE DE INÍCIO:-----

ÉPOCA EM QUE PERCEBERAM O PROBLEMA:-----

ÉPOCA EM QUE FOI FEITO O DIAGNÓSTICO DE SURDEZ:-----

() ZUMBIDO () TONTURA

GESTAÇÃO:

() SEM INTERCORRÊNCIAS () COM INTERCORRÊNCIAS

() FEZ PRÉ-NATAL INFECÇÕES MATERNAS: () NÃO () SIM

() CMV () RUBÉOLA () TOXOPLASMOSE () SÍFILIS () HERPES

() OUTRAS DOENÇAS OU SINTOMAS -----

USO DE DROGAS PELA MÃE: () NÃO () SIM QUAIS?:

RAIO X NA GESTAÇÃO: () NÃO () SIM

OBSERVAÇÕES:-----

PERÍODO PERINATAL:

() SEM INTERCORRÊNCIAS () COM INTERCORRÊNCIAS

PARTO: () NORMAL () CESÁREA MOTIVO:-----

() FORCEPS

CRONOLOGIA: () TERMO () PRÉ-TERMO () PÓS-TERMO

PESO AO NASCER:----- COMPRIMENTO AO NASCER:-----

BOAS CONDIÇÕES DE VITALIDADE: () NÃO () SIM

() ANOXIA () CIANOSE () ICTERÍCIA

() INCOMPATIBILIDADE DE Rh () FOTOTERAPIA () INCUBADORA

() FEBRE ALTA () DEFEITOS FÍSICOS

SAIU DO HOSPITAL COM A MÃE: () NÃO () SIM

OBSERVAÇÕES:-----

DESENVOLVIMENTO NEUROPSICOMOTOR:

DNPM: ()NORMAL ()COM ATRASO

BEBÊ ()FIRME ()MOLE

SUSTENTOU PESCOÇO:-----

SENTOU COM APOIO:-----

SENTOU SEM APOIO:-----

ENGATINHOU:-----

ANDOU:-----

PRIMEIRAS PALAVRAS:-----

()ANTIBIÓTICOS AMINOGLICOSÍDEOS ()USO DE OUTRAS DROGAS OTOTÓXICAS

()INFECÇÕES DE OUVIDO ()DIABETES MELITO

()MENINGITE ()SARAMPO ()CAXUMBA

()MENINGOENCEFALITES ()INFECÇÃO DAS VIAS AÉREAS SUPERIORES

()EXPOSIÇÃO CONSTANTE A RUÍDOS

OUTRAS DOENÇAS, INTERNAÇÕES, CIRURGIAS:-----

EXAMES REALIZADOS:-----

HIPÓTESE DIAGNÓSTICA:

()HEREDITÁRIA ()ADQUIRIDA ()?

()ISOLADA ()SINDRÔMICA ()?

PAIS PRETENDEM TER MAIS FILHOS: ()NÃO ()SIM

FIZERAM ()LAQUEADURA ()VASECTOMIA

DIAGNÓSTICO:-----

CONDUTA:-----

Anexo II - Quadro com resumo da casuística total. Abreviações utilizadas: “Br” = Branco; “Pd” = Pardo; “Ne” = Negro; “Or” = Oriental; “DNAmT” = DNA mitocondrial; “OE” = orelha esquerda; “OD = orelha direita; “A” = ausência da mutação; “P” = presença da mutação; “(+/-)” = heterozigoto; “(+/+)” = homozigoto; “-” = não testada ou não esclarecida; “na” = não se aplica; “nl” = normal; “AR” = herança autossômica recessiva; “AD” = herança autossômica dominante; “MT” = herança mitocondrial; “Cons” = consangüinidade.

Nº	Registro	Grupo étnico	Idade de manifestação	Grau da perda		Evolução	Tipo	História familiar	DNAmT	Conexinas						Conclusão	
				OD	OE					A1555G	35delG	GJB6-18S1830	GJB6-18S1854	167delT	1º SSCP		2º SSCP
1	11336L	-	pré-lingual	profundo	profundo	-	neurossensorial	familiar	A	A	A	A	A	nl	nl	-	AR com sinais
2	13806	-	pré-lingual	profundo	profundo	estacionária	neurossensorial	isolado	A	A	A	A	A	nl	nl	nl/nl	idiopático com sinais
3	14219	-	pré-lingual	grave	grave	estacionária	neurossensorial	isolado	A	A	A	A	A	nl	nl	nl/nl	idiopático
4	14401R	-	pré-lingual	profundo	profundo	estacionária	-	familiar	A	P(+/-)	A	A	A	alt	nl	35delG/ 235delC	AR
5	14428S	-	pós-lingual	leve	leve	progressiva	neurossensorial	familiar	A	A	A	A	A	nl	nl	nl/nl	AD ou MT
	14428L	-	pós-lingual	moderado	moderado	progressiva	neurossensorial	familiar	A	A	A	-	-	-	-	-	
6	14604P	-	pré-lingual	profundo	profundo	estacionária	neurossensorial	familiar	A	P(+/+)	A	-	-	-	-	35delG/35delG	AR
	14604E	-	pré-lingual	profundo	profundo	estacionária	neurossensorial	familiar	A	P(+/+)	A	-	-	-	-	35delG/35delG	
7	14960	-	pré-lingual	moderado	moderado	-	neurossensorial	familiar	A	A	A	A	A	alt	nl	G79A/T101C	AR
8	14993	-	pré-lingual	profundo	profundo	progressiva	neurossensorial	isolado	A	A	A	A	A	nl	nl	nl/nl	idiopático
9	15015	-	pós-lingual	moderado	grave	progressiva	neurossensorial	isolado	A	A	A	A	A	nl	nl	nl/nl	AR/Cons com sinais
10	15041	-	pós-lingual	moderado	moderado	progressiva	neurossensorial	familiar	A	A	A	A	A	nl	nl	nl/nl	AD ou MT
11	15080	Br	pré-lingual	grave	grave	-	neurossensorial	isolado	A	A	A	A	P(+/-)	alt	nl	167delT/nl	AR
12	15081	-	pré-lingual	profundo	profundo	estacionária	neurossensorial	familiar	A	A	A	A	A	nl	nl	nl/nl	AR
13	15082	-	pré-lingual	profundo	profundo	-	neurossensorial	isolado	A	A	A	A	A	nl	nl	nl/nl	idiopático
14	15082T	-	pré-lingual	profundo	profundo	-	-	isolado	A	A	A	A	A	nl	nl	nl/nl	idiopático
15	15091	-	pré-lingual	moderado	profundo	progressiva	neurossensorial	isolado	A	A	A	A	A	nl	nl	nl/nl	idiopático
16	15092	-	pós-lingual	profundo	profundo	-	neurossensorial	isolado	A	A	A	A	A	nl	nl	nl/nl	ototóxicos-aminoglicosídeos
17	15115V	Or	pré-lingual	profundo	profundo	estacionária	neurossensorial	familiar	A	P(+/-)	A	A	A	alt	nl	176del16/ 35delG	AR
	15115	Or	pré-lingual	profundo	profundo	estacionária	neurossensorial	familiar	A	A	A	-	A	-	-	176del16/ 235delC	
	15115L	Or	pré-lingual	profundo	profundo	estacionária	neurossensorial	familiar	A	A	A	-	A	-	-	176del16/ 235delC	
	15115Y	Or	ouvinte	na	na	na	na	na	A	A	A	-	-	-	-	176del16/ nl	
	15115E	Br	pré-lingual	profundo	profundo	estacionária	neurossensorial	isolado	A	P(+\+)	A	-	-	-	-	35delG/35delG	
18	15115J	Br	pré-lingual	profundo	profundo	estacionária	neurossensorial	familiar	-	P(+\+)	A	A	A	alt	nl	35delG/35delG	
	15115N	Or	pré-lingual	profundo	profundo	estacionária	neurossensorial	familiar	-	A	-	-	-	-	-	176del16/235delC	

Anexo II - Quadro com resumo da casuística total. Abreviações utilizadas: “Br” = Branco; “Pd” = Pardo; “Ne” = Negro; “Or” = Oriental; “DNAmT” = DNA mitocondrial; “OE” = orelha esquerda; “OD = orelha direita; “A” = ausência da mutação; “P” = presença da mutação; “(+/-)” = heterozigoto; “(+/+)” = homozigoto; “ - “ = não testada ou não esclarecida; “na” = não se aplica; “nl” = normal; “AR” = herança autossômica recessiva; “AD” = herança autossômica dominante; “MT” = herança mitocondrial; “Cons” = consangüinidade.

Nº	Registro	Grupo étnico	Idade de manifestação	Grau da perda		Evolução	Tipo	História familiar	DNAmT	Conexinas						Conclusão	
				OD	OE					A1555G	35delG	GJB6-18S1830	GJB6-18S1854	167delT	1º SSCP		2º SSCP
	15115T	Or	pré-lingual	profundo	profundo	estacionária	neurossensorial	familiar	-	P(+/-)	-	-	-	-	-	176del16/ 35delG	AR
	15115C	Or	pré-lingual	profundo	profundo	estacionária	neurossensorial	familiar	-	P(+/-)	-	-	-	-	-	35delG/235delC	
19	15122	-	pré-lingual	moderado	grave	estacionária	-	isolado	A	A	A	A	A	nl	nl	-	idiopático
20	15123	-	pré-lingual	profundo	profundo	progressiva	-	familiar	A	P(+/-)	A	A	A	alt	nl	35delG/35delG	AR
21	15137	-	pré-lingual	profundo	profundo	progressiva	neurossensorial	isolado	A	A	A	A	A	nl	nl	nl/nl	idiopático
22	15138	Br	pré-lingual	profundo	profundo	-	neurossensorial	familiar	A	P(+/-)	A	A	A	alt	nl	35delG/35delG	AR
	15138J	-	ouvinte	na	na	na	na	na	A	P(+/-)	A	-	-	-	-	35delG/nl	
	15138A	-	ouvinte	na	na	na	na	na	A	P(+/-)	A	-	-	-	-	35delG/nl	
	15138D	-	ouvinte	na	na	na	na	na	A	A	A	-	-	-	-	nl/nl	
	15138B	-	ouvinte	na	na	na	na	na	A	P(+/-)	A	-	-	-	-	35delG/nl	
23	15139	-	pré-lingual	profundo	profundo	estacionária	neurossensorial	isolado	A	A	A	A	A	nl	nl	-	idiopático
24	15140	-	pré-lingual	profundo	profundo	estacionária	neurossensorial	isolado	P	A	A	A	A	nl	nl	nl/nl	MT
	15140R	-	ouvinte	na	na	na	na	na	P	A	A	A	A	nl	nl	-	
25	15147	-	pré-lingual	profundo	profundo	progressiva	neurossensorial	familiar	A	A	A	A	A	nl	nl	nl/nl	idiopático
26	15148	-	pós-lingual	profundo	profundo	estacionária	neurossensorial	isolado	A	A	A	A	A	nl	nl	nl/nl	ambiental
27	15149	-	pré-lingual	profundo	profundo	estacionária	neurossensorial	isolado	A	A	A	A	A	nl	nl	nl/nl	idiopático
28	15150	-	pré-lingual	grave	grave	estacionária	neurossensorial	isolado	A	A	A	A	A	nl	nl	nl/nl	idiopático
29	15151	-	pós-lingual	leve	moderado	progressiva	neurossensorial	isolado	A	A	A	A	A	nl	nl	nl/nl	ambiental
30	15164	-	pré-lingual	profundo	profundo	estacionária	-	isolado	A	A	A	A	A	nl	nl	nl/nl	idiopático
31	15165	-	pré-lingual	profundo	profundo	estacionária	neurossensorial	isolado	A	A	A	A	A	nl	nl	nl/nl	idiopático
32	15166	Pd	pós-lingual	profundo	profundo	estacionária	neurossensorial	familiar	P	A	A	A	A	nl	nl	-	MT
	15166J	Pd	ouvinte	na	na	na	na	na	A	-	A	-	-	-	-	-	
	15166P	Pd	pré-lingual	profundo	profundo	estacionária	neurossensorial	familiar	P	-	-	-	A	nl	nl	-	
	15166T	Pd	ouvinte	na	na	na	na	na	P	-	A	-	-	-	-	-	
33	15177	-	pré-lingual	profundo	profundo	progressiva	neurossensorial	isolado	A	A	A	A	A	nl	nl	nl/nl	idiopático
34	15177L	-	pré-lingual	profundo	profundo	estacionária	neurossensorial	isolado	A	A	A	A	A	nl	alt	G583A/nl	idiopático

Anexo II - Quadro com resumo da casuística total. Abreviações utilizadas: “Br” = Branco; “Pd” = Pardo; “Ne” = Negro; “Or” = Oriental; “DNAmt” = DNA mitocondrial; “OE” = orelha esquerda; “OD = orelha direita; “A” = ausência da mutação; “P” = presença da mutação; “(+/-)” = heterozigoto; “(+/+)” = homozigoto; “ - ” = não testada ou não esclarecida; “na” = não se aplica; “nl” = normal; “AR” = herança autossômica recessiva; “AD” = herança autossômica dominante; “MT” = herança mitocondrial; “Cons” = consangüinidade.

Nº	Registro	Grupo étnico	Idade de manifestação	Grau da perda	Evolução		Tipo	História familiar	DNAmt	Conexinas						Conclusão		
					OD	OE				A1555G	35delG	GJB6-18S1830	GJB6-18S1854	167delT	1º SSCP		2º SSCP	Seqüência GJB2
35	15178	-	pré-lingual	grave	grave	-	-	isolado	A	A	A	A	A	nl	nl	nl/nl	AR	
	15178I	-	ouvinte	na	na	na	na	na	A	A	A	-	-	-	-	-		
	15178R	-	ouvinte	na	na	na	na	na	A	A	A	-	-	-	-	-		
36	15186	-	pré-lingual	profundo	profundo	estacionária	neurossensorial	isolado	A	A	A	A	A	nl	nl	nl/nl	ambiental	
37	15187	-	pré-lingual	grave	grave	progressiva	neurossensorial	isolado	A	A	A	A	A	nl	nl	nl/nl	idiopático	
38	15188	-	pré-lingual	profundo	profundo	estacionária	neurossensorial	isolado	A	A	A	A	A	nl	nl	nl/nl	idiopático	
39	15199	-	pré-lingual	grave	grave	estacionária	-	isolado	A	A	A	A	A	nl	nl	nl/nl	idiopático com sinais	
40	15200	-	pós-lingual	-	-	-	neurossensorial	isolado	A	A	A	A	A	nl	nl	nl/nl	idiopático	
41	15200V	-	pré-lingual	profundo	profundo	estacionária	-	isolado	A	A	A	A	A	nl	nl	-	ambiental	
42	15201	-	pré-lingual	profundo	profundo	estacionária	neurossensorial	familiar	A	P(+/-)	A	A	A	alt	nl	35delG/nl	AR	
	15201M	-	ouvinte	na	na	na	na	na	A	A	A	A	A	nl	nl	nl/nl		
	15201G	-	ouvinte	na	na	na	na	na	-	P(+/-)	-	-	-	alt	nl	35delG/nl		
	15201A	-	ouvinte	na	na	na	na	na	-	P(+/-)	-	-	-	alt	nl	35delG/nl		
	15201B	-	pós-lingual	moderado	moderado	-	-	familiar	-	P(+/-)	-	-	-	alt	nl	35delG/nl		
	15201P	-	-	-	-	-	-	na	-	A	-	-	-	-	-	-		
43	15212	-	pós-lingual	moderado	moderado	estacionária	neurossensorial	familiar	A	A	A	A	A	nl	nl	-	AR/Cons	
44	15215	-	pré-lingual	profundo	profundo	estacionária	neurossensorial	isolado	A	A	A	A	A	nl	nl	nl/nl	idiopático	
45	15218	-	pós-lingual	profundo	profundo	progressiva	-	isolado	A	A	A	A	A	nl	nl	-	idiopático	
46	15233	-	pré-lingual	profundo	profundo	estacionária	mista	isolado	A	A	A	A	A	nl	nl	-	idiopático	
47	15234	-	pré-lingual	moderado	moderado	estacionária	-	familiar	A	A	A	A	A	nl	nl	-	AR/Cons	
48	15235	-	pré-lingual	profundo	profundo	estacionária	-	isolado	A	A	A	A	A	nl	nl	-	idiopático	
49	15243	-	pré-lingual	profundo	profundo	estacionária	-	familiar	A	A	A	A	A	nl	nl	nl/nl	idiopático	
50	15244	-	pré-lingual	profundo	profundo	estacionária	neurossensorial	isolado	A	A	A	A	A	nl	nl	-	idiopático	
51	15245	-	pré-lingual	grave	grave	estacionária	neurossensorial	isolado	A	A	A	A	A	nl	nl	-	ambiental	
52	15246	-	pré-lingual	profundo	profundo	estacionária	neurossensorial	isolado	A	A	A	A	A	nl	nl	nl/nl	idiopático	

Anexo II - Quadro com resumo da casuística total. Abreviações utilizadas: “Br” = Branco; “Pd” = Pardo; “Ne” = Negro; “Or” = Oriental; “DNAmT” = DNA mitocondrial; “OE” = orelha esquerda; “OD = orelha direita; “A” = ausência da mutação; “P” = presença da mutação; “(+/-)” = heterozigoto; “(+/+)” = homozigoto; “-” = não testada ou não esclarecida; “na” = não se aplica; “nl” = normal; “AR” = herança autossômica recessiva; “AD” = herança autossômica dominante; “MT” = herança mitocondrial; “Cons” = consangüinidade.

Nº	Registro	Grupo étnico	Idade de manifestação	Grau da perda		Evolução	Tipo	História familiar	DNAmT	Conexinas						Conclusão		
				OD	OE					A1555G	35delG	GJB6-18S1830	GJB6-18S1854	167delT	1º SSCP		2º SSCP	Seqüência GJB2
53	15259	-	pré-lingual	profundo	profundo	estacionária	neurossensorial	isolado	A	A	A	A	A	nl	nl	-	idiopático	
54	15260	-	pré-lingual	profundo	profundo	estacionária	neurossensorial	isolado	A	A	A	A	A	nl	nl	-	idiopático	
55	15261	-	pós-lingual	profundo	profundo	estacionária	-	-	A	A	A	A	A	nl	nl	-	idiopático	
56	15280	-	pré-lingual	moderado	moderado	estacionária	neurossensorial	isolado	A	A	A	A	A	alt	nl	T101C/nl	idiopático com sinais	
57	15281	-	pré-lingual	profundo	profundo	-	neurossensorial	isolado	A	A	A	A	A	nl	nl	nl/nl	idiopático	
58	15282	-	pré-lingual	profundo	profundo	estacionária	-	isolado	A	A	A	A	A	nl	nl	-	idiopático	
59	15302	-	pré-lingual	profundo	profundo	estacionária	neurossensorial	familiar	A	P(+/+)	A	A	A	alt	nl	35delG/35delG	AR	
	15302H	-	ouvinte	na	na	na	na	na	A	P(+/-)	A	-	-	-	-	35delG/nl		
	15302J	-	-	leve	leve	-	-	familiar	A	P(+/-)	A	-	-	alt	nl	35delG/nl		
	15302R	-	ouvinte	na	na	na	na	na	A	A	A	-	-	-	-	nl/nl		
60	15306	-	pré-lingual	profundo	profundo	estacionária	neurossensorial	isolado	A	A	A	A	A	nl	nl	-	idiopático	
61	15310	-	pré-lingual	moderado	moderado	-	neurossensorial	isolado	A	A	A	A	A	nl	nl	nl/nl	idiopático com sinais	
62	15317	Br	pré-lingual	profundo	profundo	estacionária	neurossensorial	familiar	A	P(+/+)	A	A	A	alt	nl	35delG/35delG	AR	
	15317T	Br	pré-lingual	profundo	profundo	estacionária	neurossensorial	familiar	A	P(+/+)	A	-	-	-	-	35delG/35delG		
	15317R	Br	ouvinte	na	na	na	neurossensorial	na	A	P(+/-)	A	-	-	-	-	35delG/nl		
	15317V	Br	ouvinte	na	na	na	na	na	A	P(+/-)	A	-	-	-	-	35delG/nl		
63	15327	-	pré-lingual	profundo	profundo	estacionária	neurossensorial	familiar	A	A	A	A	A	nl	nl	-	idiopático	
64	15354	-	pré-lingual	moderado	moderado	estacionária	neurossensorial	isolado	A	A	A	A	A	nl	nl	-	idiopático	
65	15362	-	pré-lingual	profundo	profundo	estacionária	neurossensorial	familiar	A	P(+/-)	P	A	A	alt	nl	35delG/nl	AR	
	15362V	-	pré-lingual	profundo	profundo	estacionária	neurossensorial	familiar	A	P(+/-)	P	A	A	-	-	35delG/nl		
66	15363	-	pré-lingual	profundo	profundo	-	-	isolado	A	A	A	A	A	nl	nl	-	idiopático	
67	15364	-	pré-lingual	profundo	profundo	estacionária	neurossensorial	-	A	A	A	A	A	nl	nl	nl/nl	idiopático	
68	15365	-	pré-lingual	profundo	profundo	-	neurossensorial	isolado	A	A	A	A	A	nl	nl	-	idiopático	
69	15366	-	pré-lingual	profundo	profundo	estacionária	-	isolado	A	A	A	A	A	nl	nl	nl/nl	idiopático	
70	15367	-	pré-lingual	profundo	profundo	progressiva	neurossensorial	isolado	A	A	A	A	A	nl	nl	-	idiopático	

Anexo II - Quadro com resumo da casuística total. Abreviações utilizadas: “Br” = Branco; “Pd” = Pardo; “Ne” = Negro; “Or” = Oriental; “DNAmT” = DNA mitocondrial; “OE” = orelha esquerda; “OD = orelha direita; “A” = ausência da mutação; “P” = presença da mutação; “(+/-)” = heterozigoto; “(+/+)” = homozigoto; “-” = não testada ou não esclarecida; “na” = não se aplica; “nl” = normal; “AR” = herança autossômica recessiva; “AD” = herança autossômica dominante; “MT” = herança mitocondrial; “Cons” = consangüinidade.

Nº	Registro	Grupo étnico	Idade de manifestação	Grau da perda		Evolução	Tipo	História familiar	DNAmT	Conexinas						Conclusão	
				OD	OE					A1555G	35delG	GJB6-18S1830	GJB6-18S1854	167delT	1º SSCP		2º SSCP
71	15368	-	pré-lingual	profundo	profundo	estacionária	-	isolado	A	A	A	A	A	nl	nl	-	idiopático
72	15370	Pd	pós-lingual	grave	grave	progressiva	neurossensorial	isolado	A	P(+/-)	A	A	A	alt	nl	35delG/35delG	AR
73	15452	-	pré-lingual	-	-	-	-	familiar	P	A	A	A	A	nl	nl	nl/nl	MT
	15452J	-	pós-lingual	-	-	progressiva	-	familiar	P	A	A	-	-	nl	nl	-	
74	15458	Br	pré-lingual	profundo	profundo	estacionária	neurossensorial	isolado	A	A	A	A	A	nl	nl	-	ototóxicos - aminoglicosídeos
75	15459	-	pós-lingual	grave	profundo	progressiva	neurossensorial	isolado	A	A	A	A	A	nl	nl	-	idiopático
76	15466	Br	pré-lingual	profundo	profundo	estacionária	neurossensorial	familiar	A	A	A	A	A	nl	nl	-	AR
	15466A	Br	-	profundo	profundo	-	-	familiar	-	A	A	-	A	nl	nl	-	
77	15481	Br	-	moderado	leve	estacionária	neurossensorial	isolado	A	P(+/-)	A	A	A	alt	nl	35delG/ T269C	AR
	15481A	Br	-	-	-	-	-	-	A	P(+/-)	A	A	A	alt	nl	35delG/nl	
	15481D	Br	ouvinte	na	na	na	na	na	A	A	A	-	-	alt	nl	T269C/nl	
	15481E	Br	ouvinte	na	na	na	na	na	A	A	A	-	-	alt	nl	T269C/nl	
	15481T	Br	ouvinte	na	na	na	na	na	A	A	A	-	-	nl	nl	nl/nl	
	15513	Br	ouvinte	na	na	na	na	na	A	A	A	-	-	alt	alt	T101C+509insA/nl	AR
	15513A	Br	ouvinte	na	na	na	na	na	A	A	A	-	-	nl	nl	nl/nl	
78	15513C	Br	pré-lingual	profundo	profundo	-	neurossensorial	familiar	A	P(+/-)	A	A	A	alt	alt	T101C+509insA/35delG	
	15513K	Br	pré-lingual	profundo	profundo	-	neurossensorial	familiar	A	P(+/-)	A	A	A	alt	alt	T101c+509insA/35delG	
79	15513M	Br	pré-lingual	profundo	profundo	-	neurossensorial	isolado	A	A	A	A	A	nl	nl	A/C 684/ nl	idiopático
80	15516	-	pós-lingual	grave	profundo	progressiva	neurossensorial	isolado	A	A	A	A	A	nl	nl	-	idiopático
81	15518	Br	pós-lingual	moderado	moderado	progressiva	neurossensorial	familiar	A	A	A	A	A	nl	nl	-	idiopático
82	15542	-	pré-lingual	profundo	profundo	estacionária	neurossensorial	isolado	A	A	A	A	A	nl	nl	-	idiopático com sinais
83	15550	-	pré-lingual	profundo	profundo	estacionária	neurossensorial	familiar	A	A	A	A	A	nl	nl	-	AR
	15550A	-	pré-lingual	profundo	profundo	estacionária	neurossensorial	familiar	A	A	A	-	A	nl	nl	-	
	15550M	-	ouvinte	na	na	na	na	na	A	A	A	-	-	-	-	-	

Anexo II - Quadro com resumo da casuística total. Abreviações utilizadas: “Br” = Branco; “Pd” = Pardo; “Ne” = Negro; “Or” = Oriental; “DNAmt” = DNA mitocondrial; “OE” = orelha esquerda; “OD = orelha direita; “A” = ausência da mutação; “P” = presença da mutação; “(+/-)” = heterozigoto; “(+/+)” = homozigoto; “-” = não testada ou não esclarecida; “na” = não se aplica; “nl” = normal; “AR” = herança autossômica recessiva; “AD” = herança autossômica dominante; “MT” = herança mitocondrial; “Cons” = consangüinidade.

Nº	Registro	Grupo étnico	Idade de manifestação	Grau da perda		Evolução	Tipo	História familiar	DNAmt	Conexinas						Conclusão	
				OD	OE					A1555G	35delG	GJB6-18S1830	GJB6-18S1854	167delT	1º SSCP		2º SSCP
84	15567	-	pré-lingual	profundo	profundo	-	neurossensorial	familiar	A	A	A	A	A	nl	nl	-	idiopático
85	15569	-	-	profundo	profundo	estacionária	neurossensorial	isolado	A	A	A	A	A	nl	nl	-	idiopático
86	15569R	-	pré-lingual	profundo	profundo	estacionária	neurossensorial	isolado	A	A	A	A	A	nl	nl	-	idiopático
87	15570	-	pré-lingual	profundo	profundo	estacionária	neurossensorial	isolado	A	A	A	A	A	nl	nl	-	idiopático com sinais
88	15571	-	pré-lingual	profundo	profundo	-	neurossensorial	isolado	A	A	A	A	A	nl	nl	-	idiopático
89	15572	-	-	moderado	moderado	-	-	-	A	A	A	A	A	nl	alt	C551G/C551G	AR
90	15573	-	pré-lingual	profundo	profundo	estacionária	neurossensorial	-	A	A	A	A	A	nl	nl	-	idiopático
91	15574	Br	pré-lingual	moderado	moderado	-	neurossensorial	isolado	A	A	A	A	A	nl	nl	-	idiopático
92	15575	Br	pré-lingual	profundo	profundo	-	neurossensorial	familiar	A	P(+/+)	A	A	A	alt	nl	35delG/35delG	AR
93	15627	-	pós-lingual	-	-	progressiva	-	familiar	A	A	A	A	A	nl	nl	-	idiopático
94	15643	-	pós-lingual	grave	grave	progressiva	neurossensorial	familiar	A	A	A	A	A	nl	nl	-	AD
95	15684	-	pré-lingual	profundo	profundo	-	neurossensorial	isolado	A	A	A	A	A	nl	nl	-	idiopático
96	15694	Ne	pós-lingual	grave	grave	-	neurossensorial	familiar	A	A	A	A	A	nl	nl	-	AD ou MT
	15694R	Ne	pré-lingual	grave	grave	-	neurossensorial	familiar	A	A	A	-	-	-	-	-	
	15694S	Ne	pré-lingual	grave	grave	-	neurossensorial	familiar	A	A	A	-	-	-	-	-	
97	15731	-	pós-lingual	moderado	moderado	progressiva	neurossensorial	isolado	A	A	A	A	A	nl	nl	nl/nl	idiopático
98	15732	-	pré-lingual	profundo	profundo	estacionária	neurossensorial	isolado	A	A	A	A	A	nl	nl	-	idiopático
99	15740	Br	pré-lingual	profundo	profundo	-	neurossensorial	isolado	A	P(+/-)	A	A	A	alt	nl	35delG/35delG	AR
	15740 L	Br	ouvinte	na	na	na	na	na	-	P(+/-)	A	-	-	alt	-	35delG/nl	
	15740M	Br	ouvinte	na	na	na	na	na	-	P(+/-)	A	-	-	alt	-	35delG/nl	
100	15778	-	pré-lingual	moderado	moderado	-	neurossensorial	isolado	A	A	A	A	A	nl	nl	-	idiopático com sinais
101	15779	Br	pré-lingual	grave	grave	estacionária	neurossensorial	isolado	A	A	A	A	A	nl	nl	-	idiopático
102	15780	-	-	profundo	profundo	-	neurossensorial	isolado	A	A	A	A	A	nl	nl	-	AR/Cons
103	15796	-	pós-lingual	grave	grave	progressiva	neurossensorial	familiar	A	A	A	A	A	nl	nl	-	AR/Cons
	15796 D	-	pós-lingual	grave	grave	progressiva	neurossensorial	familiar	A	A	A	-	-	-	-	-	

Anexo II - Quadro com resumo da casuística total. Abreviações utilizadas: “Br” = Branco; “Pd” = Pardo; “Ne” = Negro; “Or” = Oriental; “DNAmT” = DNA mitocondrial; “OE” = orelha esquerda; “OD = orelha direita; “A” = ausência da mutação; “P” = presença da mutação; “(+/-)” = heterozigoto; “(+/+)” = homozigoto; “-” = não testada ou não esclarecida; “na” = não se aplica; “nl” = normal; “AR” = herança autossômica recessiva; “AD” = herança autossômica dominante; “MT” = herança mitocondrial; “Cons” = consangüinidade.

Nº	Registro	Grupo étnico	Idade de manifestação	Grau da perda		Evolução	Tipo	História familiar	DNAmT	Conexinas						Conclusão	
				OD	OE					A1555G	35delG	GJB6-18S1830	GJB6-18S1854	167delT	1º SSCP		2º SSCP
104	15817	-	pré-lingual	grave	grave	estacionária	neurossensorial	isolado	A	A	A	A	A	nl	nl	-	ototóxico - aminoglicosídeos
105	15818	-	pré-lingual	moderado	moderado	estacionária	neurossensorial	familiar	A	A	A	A	A	nl	alt	G468A/nl	idiopático
	15818C	-	ouvinte	na	na	na	na	na	A	A	A	-	-	-	-	-	
	15818I	-	ouvinte	na	na	na	na	na	A	A	A	-	-	-	-	-	
106	15819	-	pré-lingual	profundo	profundo	-	neurossensorial	familiar	A	A	A	A	A	nl	nl	-	AD
107	15836	-	pós-lingual	grave	grave	estacionária	neurossensorial	familiar	A	A	A	A	A	nl	nl	-	AD
108	15840	Br	pré-lingual	profundo	profundo	-	neurossensorial	familiar	A	P(+/-)	A	A	A	alt	nl	35delG/35delG	AR
	15840R	Br	pré-lingual	profundo	profundo	-	neurossensorial	familiar	A	P(+/-)	A	-	-	-	-	35delG/35delG	
	15840S	Br	ouvinte	na	na	na	na	na	A	P(+/-)	A	-	-	-	-	35delG/nl	
	15840J	Br	ouvinte	na	na	na	na	na	-	P(+/-)	A	-	-	-	-	35delG/nl	
	15840N	Br	ouvinte	na	na	na	na	na	-	P(+/-)	A	-	-	-	-	35delG/nl	
109	15842	-	pós-lingual	profundo	nl	estacionária	neurossensorial	isolado	A	A	A	A	A	nl	nl	nl/nl	idiopático
110	15845	Ne	pré-lingual	grave	grave	-	neurossensorial	isolado	A	A	A	A	A	nl	nl	-	idiopático com sinais
111	15850	-	pós-lingual	nl	moderado	-	neurossensorial	isolado	A	A	A	A	A	nl	nl	nl/nl	idiopático
112	15853	-	pré-lingual	profundo	profundo	estacionária	neurossensorial	familiar	P	A	A	A	A	nl	nl	-	MT
	15853C	-	pós-lingual	grave	grave	-	neurossensorial	familiar	P	A	A	-	A	nl	nl	-	
113	15854	Br	pós-lingual	moderado	moderado	-	mista	isolado	A	A	A	A	A	alt	nl	G79A/nl	idiopático com sinais
114	15863	-	pós-lingual	profundo	nl	-	neurossensorial	isolado	A	P(+/-)	A	A	A	alt	nl	35delG/nl	AR
	15863M	-	ouvinte	na	na	na	na	na	A	P(+/-)	A	-	A	alt	nl	35delG/nl	
	15863W	-	ouvinte	na	na	na	na	na	A	A	A	-	A	nl	nl	nl/nl	
115	15884	-	pré-lingual	moderado	grave	-	neurossensorial	familiar	A	A	A	A	A	nl	nl	nl/nl	idiopático
116	15886J	-	pré-lingual	-	-	-	-	isolado	A	A	A	A	A	nl	nl	-	idiopático
117	15886M	-	pré-lingual	-	-	estacionária	-	familiar	A	A	A	A	A	nl	nl	-	idiopático
118	15894	-	pós-lingual	moderado	moderado	progressiva	mista	familiar	A	A	A	A	A	nl	nl	nl/nl	AD ou MT

Anexo II - Quadro com resumo da casuística total. Abreviações utilizadas: “Br” = Branco; “Pd” = Pardo; “Ne” = Negro; “Or” = Oriental; “DNAmt” = DNA mitocondrial; “OE” = orelha esquerda; “OD = orelha direita; “A” = ausência da mutação; “P” = presença da mutação; “(+/-)” = heterozigoto; “(+/+)” = homozigoto; “-” = não testada ou não esclarecida; “na” = não se aplica; “nl” = normal; “AR” = herança autossômica recessiva; “AD” = herança autossômica dominante; “MT” = herança mitocondrial; “Cons” = consangüinidade.

Nº	Registro	Grupo étnico	Idade de manifestação	Grau da perda		Evolução	Tipo	História familiar	DNAmt	Conexinas						Conclusão	
				OD	OE					A1555G	35delG	GJB6-18S1830	GJB6-18S1854	167delT	1º SSCP		2º SSCP
	15894M	-	pós-lingual	moderado	moderado	progressiva	mista	familiar	A	A	A	-	A	nl	nl	nl/nl	AD ou MT
119	15938	Pd	pré-lingual	moderado	moderado	estacionária	neurossensorial	isolado	A	P(+/+)	A	A	A	alt	nl	35delG/35delG	AR
	15938P	Pd	ouvinte	na	na	na	na	na	-	P(+/-)	A	-	-	-	-	35delG/nl	
	15938A	Pd	ouvinte	na	na	na	na	na	-	P(+/-)	A	-	-	-	-	35delG/nl	
	15938S	Pd	ouvinte	na	na	na	na	na	-	P(+/-)	-	-	-	-	-	35delG/nl	
120	15953	Br	pré-lingual	grave	profundo	estacionária	-	isolado	A	A	A	A	A	nl	nl	-	idiopático
121	15956	-	ouvinte	na	na	na	na	na	A	A	A	-	A	nl	nl	-	AR
	15956C	-	ouvinte	na	na	na	na	na	A	A	A	-	-	-	-	-	
	15956M	-	pós-lingual	profundo	profundo	-	neurossensorial	familiar	A	A	A	A	A	nl	nl	-	
122	15956N	-	pré-lingual	profundo	profundo	-	neurossensorial	familiar	A	A	A	A	A	nl	nl	-	
123	15969	-	pré-lingual	profundo	profundo	progressiva	neurossensorial	isolado	A	A	A	A	A	nl	nl	-	idiopático
124	15973	-	pré-lingual	profundo	profundo	-	neurossensorial	isolado	A	A	A	A	A	nl	nl	-	ambiental
125	15974	Br	pós-lingual	grave	grave	progressiva	neurossensorial	familiar	A	A	A	A	A	alt	nl	G79A/nl	idiopático
	15974N	Br	pós-lingual	grave	profundo	progressiva	neurossensorial	familiar	A	A	A	-	-	-	-	-	
126	15975	-	pré-lingual	profundo	profundo	-	neurossensorial	isolado	A	A	A	-	A	nl	nl	-	ambiental
127	15988	-	pós-lingual	moderado	moderado	estacionária	neurossensorial	adotada	A	A	A	A	A	nl	nl	-	idiopático
128	15989	Pd	pré-lingual	grave	profundo	-	neurossensorial	isolado	A	A	A	A	A	nl	nl	-	ambiental
129	15998	Pd	pré-lingual	profundo	profundo	estacionária	neurossensorial	familiar	A	P(+/+)	A	-	-	-	-	35delG/35delG	AR
	15998M	Pd	ouvinte	na	na	na	na	na	-	P(+/-)	A	-	-	-	-	35delG/nl	
	15998A	Pd	ouvinte	na	na	na	na	na	-	P(+/-)	A	-	-	-	-	35delG/nl	
130	15999	Pd	pré-lingual	profundo	profundo	-	neurossensorial	familiar	A	A	A	A	A	nl	nl	nl/nl	idiopático
131	16000	Br	pré-lingual	profundo	profundo	estacionária	neurossensorial	isolado	A	P(+/-)	P	A	A	alt	nl	35delG/nl	AR
	16000L	Br	ouvinte	na	na	na	na	na	-	A	P	A	-	-	-	nl/nl	
	16000R	Br	ouvinte	na	na	na	na	na	-	P(+/-)	A	A	-	-	-	35delG/nl	
132	16003	-	pré-lingual	profundo	profundo	estacionária	-	isolado	A	A	A	A	A	nl	nl	-	AR/Cons com sinais

Anexo II - Quadro com resumo da casuística total. Abreviações utilizadas: “Br” = Branco; “Pd” = Pardo; “Ne” = Negro; “Or” = Oriental; “DNAmT” = DNA mitocondrial; “OE” = orelha esquerda; “OD = orelha direita; “A” = ausência da mutação; “P” = presença da mutação; “(+/-)” = heterozigoto; “(+/+)” = homozigoto; “ - ” = não testada ou não esclarecida; “na” = não se aplica; “nl” = normal; “AR” = herança autossômica recessiva; “AD” = herança autossômica dominante; “MT” = herança mitocondrial; “Cons” = consanguinidade.

Nº	Registro	Grupo étnico	Idade de manifestação	Grau da perda		Evolução	Tipo	História familiar	DNAmT	Conexinas						Conclusão	
				OD	OE					A1555G	35delG	GJB6-18S1830	GJB6-18S1854	167delT	1º SSCP		2º SSCP
133	16009	-	pós-lingual	moderado	moderado	-	neurossensorial	familiar	A	A	A	A	A	nl	nl	-	AR/Cons com sinais
134	16019	-	pré-lingual	moderado	moderado	progressiva	neurossensorial	isolado	A	A	A	A	A	nl	nl	-	ambiental
135	16020	-	pré-lingual	grave	grave	progressiva	neurossensorial	isolado	A	A	A	A	A	nl	alt	G380A/nl	idiopático
136	16021	-	pré-lingual	profundo	profundo	estacionária	neurossensorial	isolado	A	A	A	A	A	nl	nl	-	idiopático
137	16029	Pd	pré-lingual	profundo	profundo	-	neurossensorial	isolado	A	A	A	A	A	nl	nl	-	ambiental
138	16030	Br	pré-lingual	profundo	profundo	estacionária	neurossensorial	isolado	A	A	A	A	A	nl	nl	-	AR/Cons
139	16031	-	pós-lingual	grave	profundo	-	neurossensorial	isolado	A	A	A	A	A	nl	nl	-	ototóxico - aminoglicosídeos com sinais
140	16032	-	pré-lingual	profundo	profundo	estacionária	neurossensorial	isolado	A	A	A	A	A	nl	nl	-	ambiental
141	16046	-	pré-lingual	profundo	grave	estacionária	neurossensorial	isolado	A	A	A	A	A	nl	nl	-	idiopático
142	16047	Pd	pré-lingual	grave	grave	estacionária	neurossensorial	familiar	A	A	A	A	A	nl	nl	-	AD ou MT
	16047M	Pd	pós-lingual	moderado	moderado	progressiva	neurossensorial	familiar	A	A	A	-	-	-	-	-	
143	16048	-	pré-lingual	profundo	profundo	progressiva	neurossensorial	isolado	A	A	A	A	A	nl	nl	-	idiopático
144	16049	Ne	pré-lingual	grave	grave	-	-	isolado	A	A	A	A	A	nl	nl	-	ambiental
145	16066	-	pré-lingual	leve	leve	-	neurossensorial	isolado	A	A	A	A	A	nl	nl	-	idiopático com sinais
146	16085	Pd	pós-lingual	moderado	grave	-	neurossensorial	isolado	A	A	A	A	A	nl	nl	nl/nl	idiopático
147	16086	Br	pré-lingual	profundo	profundo	estacionária	neurossensorial	isolado	A	A	A	A	A	nl	nl	-	idiopático
148	16087	Br	pré-lingual	profundo	profundo	-	neurossensorial	isolado	A	A	A	A	A	nl	nl	-	AR
149	16100	Br	pré-lingual	profundo	profundo	estacionária	neurossensorial	isolado	A	A	A	A	A	nl	nl	-	ototóxico - aminoglicosídeos
150	16106	Pd	pós-lingual	grave	grave	progressiva	neurossensorial	isolado	A	A	A	A	A	nl	nl	-	idiopático
151	16132	Pd	pré-lingual	profundo	profundo	estacionária	neurossensorial	isolado	A	A	A	A	A	nl	nl	-	idiopático
152	16133	Br	pré-lingual	grave	profundo	progressiva	neurossensorial	isolado	A	A	A	A	A	nl	nl	-	idiopático
153	16134	Br	pré-lingual	profundo	profundo	estacionaria	neurossensorial	isolado	A	A	A	A	A	nl	nl	nl/nl	idiopático
154	16135	Pd	pré-lingual	profundo	profundo	-	-	isolado	A	A	A	A	A	nl	nl	-	idiopático
155	16137	Br	pré-lingual	-	-	-	neurossensorial	familiar	A	A	A	A	A	nl	nl	-	AD

Anexo II - Quadro com resumo da casuística total. Abreviações utilizadas: “Br” = Branco; “Pd” = Pardo; “Ne” = Negro; “Or” = Oriental; “DNAmT” = DNA mitocondrial; “OE” = orelha esquerda; “OD = orelha direita; “A” = ausência da mutação; “P” = presença da mutação; “(+/-)” = heterozigoto; “(+/+)” = homozigoto; “-” = não testada ou não esclarecida; “na” = não se aplica; “nl” = normal; “AR” = herança autossômica recessiva; “AD” = herança autossômica dominante; “MT” = herança mitocondrial; “Cons” = consangüinidade.

Nº	Registro	Grupo étnico	Idade de manifestação	Grau da perda		Evolução	Tipo	História familiar	DNAmT	Conexinas						Conclusão	
				OD	OE					A1555G	35delG	GJB6-18S1830	GJB6-18S1854	167delT	1º SSCP		2º SSCP
156	16138	-	pré-lingual	grave	grave	estacionária	neurossensorial	familiar	A	P(+/+)	A	A	A	alt	nl	35delG/35delG	AR
	16138G	-	pré-lingual	grave	grave	estacionária	neurossensorial	familiar	A	P(+/+)	A	-	-	-	-	35delG/35delG	
157	16139	-	pré-lingual	moderado	moderado	-	-	isolado	A	A	A	A	A	nl	nl	-	idiopático
158	16140	-	-	-	-	-	neurossensorial	isolado	A	P(+/-)	A	A	A	alt	nl	35delG/nl	idiopático com sinais
159	16153	Br	pré-lingual	profundo	profundo	estacionária	neurossensorial	isolado	A	A	A	A	A	nl	nl	-	Cons com sinais
160	16167	Pd	pré-lingual	profundo	grave	estacionária	neurossensorial	isolado	A	A	A	A	A	nl	nl	-	idiopático
161	16171	Br	pré-lingual	moderado	grave	estacionária	neurossensorial	isolado	A	A	A	A	A	nl	nl	-	ambiental
162	16189	Pd	pré-lingual	profundo	profundo	-	-	isolado	A	A	A	A	A	nl	nl	-	idiopático
163	16190	Br	pré-lingual	profundo	profundo	estacionária	-	isolado	A	A	A	A	A	nl	nl	-	AR/Cons
164	16209	Or	pré-lingual	profundo	profundo	estacionária	neurossensorial	familiar	A	A	A	A	A	nl	nl	nl/nl	idiopático
165	16227	Pd	pré-lingual	profundo	profundo	estacionária	neurossensorial	isolado	A	A	A	A	A	nl	nl	-	idiopático
166	16232	-	pré-lingual	-	-	-	neurossensorial	isolado	A	A	A	A	A	nl	nl	-	idiopático
167	16246	Br	pré-lingual	profundo	profundo	-	neurossensorial	isolado	A	A	A	A	A	nl	nl	-	idiopático com sinais
168	16247	Br	pós-lingual	grave	grave	progressiva	neurossensorial	familiar	A	A	A	A	A	nl	nl	-	AD
169	16248	Pd	pré-lingual	profundo	profundo	-	neurossensorial	isolado	A	A	A	A	A	nl	nl	-	idiopático
170	16251	Pd	pré-lingual	grave	profundo	-	neurossensorial	isolado	A	A	A	A	A	nl	nl	nl/nl	idiopático
171	16252	Br	pré-lingual	moderado	moderado	-	neurossensorial	isolado	A	A	A	A	A	nl	nl	nl/nl	idiopático
172	16253	Pd	pré-lingual	grave	grave	-	neurossensorial	isolado	A	A	A	A	A	nl	nl	-	idiopático
173	16254	Ne	pré-lingual	profundo	profundo	estacionária	neurossensorial	isolado	A	A	A	A	A	nl	nl	-	ambiental
174	16266	Br	pré-lingual	profundo	profundo	-	mista	isolado	A	A	A	A	A	nl	nl	-	idiopático com sinais
175	16268	Br	pré-lingual	grave	profundo	-	neurossensorial	isolado	A	A	A	A	A	nl	nl	-	idiopático com sinais
176	16269	Ne	pré-lingual	profundo	profundo	-	neurossensorial	isolado	A	A	A	A	A	nl	nl	nl/nl	AR/Cons
177	16275	Pd	pós-lingual	moderado	moderado	-	neurossensorial	familiar	A	A	A	A	A	nl	nl	nl/nl	AD ou MT
	16275M	Pd	pós-lingual	moderado	moderado	estacionária	neurossensorial	familiar	A	A	A	-	A	nl	nl	nl/nl	

Anexo II - Quadro com resumo da casuística total. Abreviações utilizadas: “Br” = Branco; “Pd” = Pardo; “Ne” = Negro; “Or” = Oriental; “DNAmt” = DNA mitocondrial; “OE” = orelha esquerda; “OD = orelha direita; “A” = ausência da mutação; “P” = presença da mutação; “(+/-)” = heterozigoto; “(+/+)” = homozigoto; “-” = não testada ou não esclarecida; “na” = não se aplica; “nl” = normal; “AR” = herança autossômica recessiva; “AD” = herança autossômica dominante; “MT” = herança mitocondrial; “Cons” = consangüinidade.

Nº	Registro	Grupo étnico	Idade de manifestação	Grau da perda		Evolução	Tipo	História familiar	DNAmt	Conexinas						Conclusão	
				OD	OE					A1555G	35delG	GJB6-18S1830	GJB6-18S1854	167delT	1º SSCP		2º SSCP
178	16277	Pd	pré-lingual	leve	leve	-	-	isolado	A	A	A	A	A	nl	nl	-	AR/Cons
179	16278	Br	pré-lingual	moderado	moderado	-	-	familiar	A	P(+/-)	A	A	A	alt	nl	35delG/35delG	AR
	16278C	Br	perda ambiental	-	-	-	-	-	-	P(+/-)	A	-	-	-	-	35delG/nl	
	16278L	Br	ouvinte	na	na	na	na	na	-	P(+/-)	A	-	-	-	-	35delG/nl	
180	16291	Pd	pré-lingual	grave	moderado	-	-	isolado	A	A	A	A	A	nl	nl	-	idiopático
181	16292	Br	pré-lingual	profundo	profundo	-	-	isolado	A	A	A	A	A	nl	nl	-	idiopático
182	16348	Pd	pré-lingual	grave	grave	-	neurossensorial	isolado	A	A	A	A	A	nl	nl	-	idiopático
183	16354	Br	pré-lingual	grave	moderado	progressiva	neurossensorial	familiar	A	P(+/-)	A	A	P(+/-)	alt	nl	35delG/167delT	AR
	16354T	Br	pré-lingual	grave	grave	estacionária	neurossensorial	familiar	A	P(+/-)	A	-	P(+/-)	alt	-	35delG/167delT	
	16354M	Br	ouvinte	na	na	na	na	na	-	P(+/-)	A	-	A	alt	-	35delG/nl	
	16354L	Br	ouvinte	na	na	na	na	na	-	A	A	-	P(+/-)	alt	-	167delT/nl	
	16354F	Br	ouvinte	na	na	na	na	na	-	A	A	A	A	nl	nl	-	
184	16358G	Br	pós-lingual	moderado	grave	estacionária	neurossensorial	familiar	A	A	A	A	A	nl	nl	-	AR/Cons
	16358K	Br	pós-lingual	moderado	grave	estacionária	neurossensorial	familiar	A	A	A	-	A	nl	nl	-	
	16358S	Br	pós-lingual	profundo	grave	estacionária	neurossensorial	familiar	A	A	A	-	A	nl	nl	-	
185	16368	Br	pós-lingual	moderado	grave	progressiva	neurossensorial	isolado	A	A	A	A	A	nl	nl	-	idiopático
186	16369	Br	pré-lingual	moderado	moderado	estacionária	neurossensorial	familiar	A	A	A	A	A	nl	nl	-	idiopático
	16369T	Br	pré-lingual	moderado	moderado	estacionária	neurossensorial	familiar	A	A	A	-	A	nl	nl	-	idiopático
187	16370	Br	pós-lingual	moderado	moderado	progressiva	neurossensorial	familiar	A	A	A	A	A	nl	nl	-	AR/Cons
188	16373	Br	pré-lingual	-	-	-	-	isolado	A	A	A	A	A	nl	nl	-	idiopático
189	16390	Br	pré-lingual	profundo	profundo	-	-	isolado	A	A	A	A	A	nl	nl	-	idiopático
190	16391	Br	pré-lingual	profundo	profundo	estacionária	neurossensorial	isolado	A	A	A	A	A	nl	nl	-	idiopático
191	16405	Br	pré-lingual	profundo	grave	progressiva	neurossensorial	familiar	A	A	A	A	A	nl	nl	-	AR
192	16408D	Br	pré-lingual	grave	grave	estacionaria	-	familiar	A	A	A	A	A	nl	nl	-	idiopático
193	16409	Br	pós-lingual	moderado	moderado	progressiva	neurossensorial	familiar	A	A	A	A	A	nl	nl	-	AD

Anexo II - Quadro com resumo da casuística total. Abreviações utilizadas: “Br” = Branco; “Pd” = Pardo; “Ne” = Negro; “Or” = Oriental; “DNAmT” = DNA mitocondrial; “OE” = orelha esquerda; “OD = orelha direita; “A” = ausência da mutação; “P” = presença da mutação; “(+/-)” = heterozigoto; “(+/+)” = homozigoto; “ - “ = não testada ou não esclarecida; “na” = não se aplica; “nl” = normal; “AR” = herança autossômica recessiva; “AD” = herança autossômica dominante; “MT” = herança mitocondrial; “Cons” = consangüinidade.

Nº	Registro	Grupo étnico	Idade de manifestação	Grau da perda		Evolução	Tipo	História familiar	DNAmT	Conexinas						Conclusão	
				OD	OE					A1555G	35delG	GJB6-18S1830	GJB6-18S1854	167delT	1º SSCP		2º SSCP
194	16416	-	pré-lingual	profundo	profundo	-	mista	isolado	A	A	A	A	A	alt	nl	T101C/nl	idiopático
195	16417	Pd	pré-lingual	profundo	profundo	-	-	isolado	A	A	A	A	A	nl	nl	-	idiopático
196	16428	Br	pré-lingual	profundo	profundo	-	-	familiar	A	A	A	A	A	nl	nl	-	AD
	16428T	Br	ouvinte	na	na	na	na	na	A	A	A	-	A	nl	nl	-	
197	16441	Pd	pré-lingual	profundo	profundo	-	neurossensorial	isolado	A	A	A	A	A	nl	nl	-	idiopático
198	16454	Br	pré-lingual	moderado	moderado	-	-	isolado	A	A	A	A	A	nl	nl	-	idiopático
199	16455	Br	pré-lingual	profundo	profundo	-	-	familiar	A	A	A	A	A	nl	nl	-	idiopático
200	16469	Pd	pré-lingual	-	-	-	neuropatia	familiar	A	A	A	A	A	nl	nl	-	AR
201	16490	Br	pós lingual	moderado	moderado	progressiva	neurossensorial	familiar	A	A	A	A	A	nl	nl	-	idiopático
202	16495	Br	pré-lingual	grave	grave	-	neurossensorial	isolado	A	P(+/-)	A	A	A	alt	nl	35delG/ G71A	AR
	16495L	Br	ouvinte	na	na	na	na	na	-	A	-	-	-	alt	nl	G71A/nl	
	16495C	Br	ouvinte	na	na	na	na	na	-	P(+/-)	-	-	-	alt	nl	35delG/nl	
203	16496	Br	pré-lingual	profundo	profundo	estacionaria	neurossensorial	isolado	A	P(+++)	A	A	A	alt	nl	35delG/35delG	AR
204	16508	Pd	pós-lingual	profundo	normal	progressiva	neurossensorial	isolado	A	A	A	A	A	nl	alt	G380A/nl	idiopático
205	16509	Br	pré-lingual	grave	grave	-	neurossensorial	isolado	A	A	A	A	A	nl	nl	-	MT com sinais
206	16534	Pd	pré-lingual	profundo	grave	-	neurossensorial	familiar	-	A	A	A	A	alt	nl	G79A/nl	idiopático
	16534C	Pd	ouvinte	na	na	na	na	na	-	A	A	-	A	-	-	nl/nl	
	16534T	Pd	ouvinte	na	na	na	na	na	-	A	A	-	A	-	-	G79A/nl	
207	16535	Br	pré-lingual	-	-	-	-	isolado	A	A	A	A	A	nl	nl	nl/nl	idiopático
208	16536	Br	pré-lingual	profundo	profundo	estacionária	neurossensorial	isolado	A	A	A	A	A	nl	nl	nl/nl	idiopático
209	16543	Br	pré-lingual	moderado	profundo	progressiva	neurossensorial	isolado	A	A	A	A	A	nl	nl	-	idiopático
210	16544	Pd	pré-lingual	moderado	moderado	progressiva	neurossensorial	familiar	A	A	A	A	A	nl	nl	-	AD ou MT
	16544S	Pd	pós-lingual	leve	leve	progressiva	neurossensorial	familiar	A	A	A	-	-	-	-	-	
	16544A	Pd	pré-lingual	grave	grave	progressiva	neurossensorial	familiar	-	A	A	-	-	-	-	-	
211	16553	Br	pós-lingual	-	-	progressiva	-	isolado	A	A	A	A	A	nl	nl	-	idiopático

Anexo II - Quadro com resumo da casuística total. Abreviações utilizadas: “Br” = Branco; “Pd” = Pardo; “Ne” = Negro; “Or” = Oriental; “DNAmT” = DNA mitocondrial; “OE” = orelha esquerda; “OD = orelha direita; “A” = ausência da mutação; “P” = presença da mutação; “(+/-)” = heterozigoto; “(+/+)” = homozigoto; “-” = não testada ou não esclarecida; “na” = não se aplica; “nl” = normal; “AR” = herança autossômica recessiva; “AD” = herança autossômica dominante; “MT” = herança mitocondrial; “Cons” = consangüinidade.

Nº	Registro	Grupo étnico	Idade de manifestação	Grau da perda		Evolução	Tipo	História familiar	DNAmT	Conexinas						Conclusão	
				OD	OE					A1555G	35delG	GJB6-18S1830	GJB6-18S1854	167delT	1º SSCP		2º SSCP
212	16554	Br	pós-lingual	grave	nl	-	-	isolado	A	A	A	A	A	nl	nl	-	idiopático
213	16556	-	-	-	-	-	-	familiar	A	A	A	A	A	nl	nl	-	idiopático
214	16557	Br	pós-lingual	grave	moderado	progressiva	neurossensorial	familiar	-	A	A	A	A	alt	nl	A120C/nl	AD ou MT
215	16567	Br	pré-lingual	profundo	profundo	-	condutiva	isolado	A	A	A	A	A	nl	nl	-	idiopático
216	16568	-	pré-lingual	-	-	-	condutiva	familiar	A	A	A	A	A	nl	nl	-	idiopático com sinais
217	16586	Pd	pré-lingual	profundo	profundo	-	neurossensorial	isolado	A	A	A	A	A	nl	alt	G503A/nl	idiopático
218	16590	Br	pré-lingual	profundo	profundo	estacionária	neurossensorial	familiar	A	A	A	A	A	nl	nl	-	AR/Cons
219	16644	Br	pós-lingual	moderado	moderado	progressiva	neurossensorial	familiar	A	A	A	A	A	nl	nl	-	AR
220	16645	Pd	pré-lingual	profundo	profundo	progressiva	neurossensorial	familiar	A	P(+/+)	A	A	A	alt	nl	35delG/35delG	AR
	16645 N	Pd	ouvinte	na	na	na	na	na	-	P(+/-)	-	-	-	-	-	35delG/nl	
	16645F	Pd	ouvinte	na	na	na	na	na	-	P(+/-)	-	-	-	-	-	35delG/nl	
	16645J	Pd	ouvinte	na	na	na	na	na	-	A	-	-	-	-	-	nl/nl	
	16645V	Pd	pré-lingual	-	-	progressiva	-	familiar	-	P(+/+)	-	-	-	-	-	35delG/35delG	
221	16647	Pd	pré-lingual	-	-	estacionária	-	familiar	A	A	A	A	A	alt	nl	T101C/nl	idiopático
222	16648	Pd	pré-lingual	-	-	estacionária	-	isolado	A	A	A	A	A	nl	nl	-	idiopático
223	16649	Br	pós-lingual	profundo	profundo	progressiva	neurossensorial	familiar	A	A	A	A	A	nl	nl	-	AR
224	16658	Br	pré-lingual	grave	grave	-	neurossensorial	familiar	A	P(+/+)	A	A	A	alt	nl	35delG/35delG	AR
	16658A	Br	pré-lingual	profundo	profundo	-	neurossensorial	familiar	A	P(+/+)	A	-	-	-	-	35delG/35delG	
	16658D	Br	ouvinte	na	na	na	na	na	-	P(+/-)	-	-	-	-	-	35delG/nl	
	16658L	Br	ouvinte	na	na	na	na	na	-	P(+/-)	-	-	-	-	-	35delG/nl	
	16658V	Br	ouvinte	na	na	na	na	na	-	P(+/-)	-	-	-	-	-	35delG/nl	
	16658 G	Br	ouvinte	na	na	na	na	na	-	A	-	-	-	-	-	nl/nl	
225	16668	Br	pré-lingual	profundo	moderado	progressiva	neurossensorial	isolado	A	A	A	A	A	nl	nl	nl/nl	idiopático
226	16669	Br	pós-lingual	moderado	moderado	-	neuropatia	familiar	A	A	A	A	A	nl	nl	-	idiopático com sinais
227	16673	-	pré-lingual	profundo	profundo	progressiva	neurossensorial	isolado	A	A	A	A	A	nl	nl	nl/nl	idiopático

Anexo II - Quadro com resumo da casuística total. Abreviações utilizadas: “Br” = Branco; “Pd” = Pardo; “Ne” = Negro; “Or” = Oriental; “DNAmT” = DNA mitocondrial; “OE” = orelha esquerda; “OD = orelha direita; “A” = ausência da mutação; “P” = presença da mutação; “(+/-)” = heterozigoto; “(+/+)” = homozigoto; “ - - ” = não testada ou não esclarecida; “na” = não se aplica; “nl” = normal; “AR” = herança autossômica recessiva; “AD” = herança autossômica dominante; “MT” = herança mitocondrial; “Cons” = consangüinidade.

Nº	Registro	Grupo étnico	Idade de manifestação	Grau da perda		Evolução	Tipo	História familiar	DNAmT	Conexinas						Conclusão	
				OD	OE					A1555G	35delG	GJB6-18S1830	GJB6-18S1854	167delT	1º SSCP		2º SSCP
228	16676	Pd	pré-lingual	-	-	-	-	isolado	A	A	A	A	A	nl	nl	-	idiopático
229	16678	Pd	pré-lingual	-	-	progressiva	-	familiar	A	A	A	A	A	nl	nl	nl/nl	idiopático
230	16684	Ne	pós-lingual	grave	grave	progressiva	-	familiar	A	A	A	A	A	alt	nl	G241A/nl	AD ou MT
	16684C	Ne	pós-lingual	-	-	progressiva	-	familiar	-	A	A	-	-	-	-	nl/nl	
	16684E	Ne	pré-lingual	profundo	profundo	-	-	familiar	A	A	A	-	-	-	-	-	
	16684J	Ne	ouvinte	na	na	na	na	na	-	A	A	-	-	-	-	nl/nl	
231	16703	Pd	-	profundo	profundo	-	neurossensorial	familiar	A	A	A	A	A	nl	nl	nl/nl	AD
	16703C	Pd	-	profundo	profundo	-	neurossensorial	familiar	A	A	A	A	A	alt	nl	T/C - 15/nl	
232	16711	Br	pós-lingual	grave	profundo	-	neurossensorial	isolado	A	A	A	A	A	nl	nl	-	idiopático
233	16728M	Br	pré-lingual	-	-	-	-	isolado	A	P(+/-)	P	A	A	alt	nl	35delG/nl	AR
234	16728R	Br	pré-lingual	-	-	-	-	isolado	A	P(+/+)	A	A	A	nl	nl	35delG/35delG	AR
235	16729	Br	pré-lingual	profundo	profundo	-	neurossensorial	isolado	A	A	A	A	A	nl	nl	-	idiopático
236	16745	Br	pré-lingual	profundo	profundo	-	neurossensorial	isolado	A	A	A	A	A	nl	nl	-	idiopático
237	16747	Br	pós-lingual	grave	grave	progressiva	mista	isolado	A	A	A	A	A	nl	nl	-	idiopático
238	16748	albino	pós lingual	moderado	moderado	estacionária	neurossensorial	familiar	A	P(+/+)	A	A	A	alt	nl	35delG/35delG	AR com sinais
	16748E	Pd	ouvinte	na	na	na	na	familiar	-	P(+/-)	A	-	A	alt	nl	35delG/nl	
	16748S	Pd	ouvinte	na	na	na	na	familiar	-	p(+/-)	A	-	A	alt	nl	35delG/nl	
	16748L	Pd	ouvinte	na	na	na	na	na	-	P(+/-)	A	-	-	-	-	35delG/nl	
	16748P	Pd	ouvinte	na	na	na	na	familiar	-	A	A	-	-	-	-	nl/nl	
	16748M	Pd	pós-lingual	profundo	profundo	-	-	familiar	-	P(+/+)	A	-	-	-	-	35delG/35delG	
	16748I	Pd	ouvinte	na	na	na	na	na	-	A	A	-	-	-	-	nl/nl	
	16748D	Pd	ouvinte	na	na	na	na	na	-	A	A	-	-	-	-	nl/nl	
	16748A	Pd	ouvinte	-	-	-	-	familiar	-	P(+/+)	A	-	-	-	-	35delG/35delG	
16748U	Pd	normal	na	na	na	na	na	-	A	A	-	-	-	-	nl/nl		
239	16751	Br	pós-lingual	-	-	progressiva	-	familiar	A	A	A	A	A	alt	nl	T/C - 15/nl	AR

Anexo II - Quadro com resumo da casuística total. Abreviações utilizadas: “Br” = Branco; “Pd” = Pardo; “Ne” = Negro; “Or” = Oriental; “DNAmt” = DNA mitocondrial; “OE” = orelha esquerda; “OD = orelha direita; “A” = ausência da mutação; “P” = presença da mutação; “(+/-)” = heterozigoto; “(+/+)” = homozigoto; “-” = não testada ou não esclarecida; “na” = não se aplica; “nl” = normal; “AR” = herança autossômica recessiva; “AD” = herança autossômica dominante; “MT” = herança mitocondrial; “Cons” = consangüinidade.

Nº	Registro	Grupo étnico	Idade de manifestação	Grau da perda		Evolução	Tipo	História familiar	DNAmt	Conexinas						Conclusão	
				OD	OE					A1555G	35delG	GJB6-18S1830	GJB6-18S1854	167delT	1º SSCP		2º SSCP
240	16752	Ne	pré-lingual	profundo	profundo	-	neurossensorial	isolado	A	A	A	A	A	nl	nl	-	AR/Cons
241	16758	Br	pré-lingual	moderado	moderado	-	-	familiar	A	A	A	A	A	alt	nl	T101C/nl	idiopático
242	16759	Pd	pré-lingual	profundo	profundo	estacionária	neurossensorial	isolado	A	A	A	A	A	nl	nl	nl/nl	idiopático
243	16773	Br	pós-lingual	leve	leve	-	neurossensorial	isolado	A	A	A	A	A	nl	nl	nl/nl	idiopático
244	16774	Br	-	leve	leve	-	condutiva	isolado	A	A	A	A	A	nl	nl	-	idiopático
245	16775	Br	pós-lingual	moderado	moderado	progressiva	neurossensorial	isolado	A	A	A	A	A	alt	nl	T/C - 15/nl	idiopático
246	16776	Pd	-	moderado	moderado	-	neurossensorial	isolado	A	A	A	A	A	nl	nl	-	idiopático
247	16797	Pd	pré-lingual	moderado	moderado	-	-	isolado	A	A	A	A	A	nl	nl	-	AR/Cons
248	16798	Br	pré-lingual	grave	grave	-	neurossensorial	familiar	A	P(+/-)	A	A	A	alt	Nl	35delG/35delG	AR
	16798M	Ne	ouvinte	na	na	na	na	na	-	P(+/-)	-	-	-	-	-	35delG/nl	
	16798 R	Br	ouvinte	na	na	na	na	na	-	P(+/-)	-	-	-	-	-	35delG/nl	
249	16814	Br	pré-lingual	profundo	profundo	-	-	-	A	A	A	A	A	nl	nl	nl/nl	idiopático
250	16829	Br	pré-lingual	profundo	profundo	-	neurossensorial	familiar	A	P(+/-)	A	A	A	alt	nl	35delG/35delG	AR
	16829 M	Pd	pré-lingual	profundo	profundo	-	neurossensorial	familiar	-	P(+/-)	A	-	A	-	-	35delG/35delG	
	16829J	Pd	ouvinte	na	na	na	na	na	-	P(+/-)	-	-	-	-	-	35delG/nl	
251	16832	Pd	pré-lingual	grave	grave	estacionária	-	familiar	A	P(+/-)	A	A	A	alt	nl	35delG/35delG	AR
252	16833	Ne	pré-lingual	profundo	profundo	-	-	familiar	A	A	A	A	A	nl	nl	nl/nl	idiopático
253	16851	Br	-	grave	grave	-	mista	familiar	A	A	A	A	A	nl	nl	-	AD ou MT
254	16869	Pd	pré-lingual	profundo	profundo	-	-	adotada	A	A	A	A	A	nl	nl	-	idiopático
255	16870	Pd	pré-lingual	profundo	profundo	-	-	isolado	A	A	A	A	A	nl	nl	-	idiopático
256	16871	Br	pós-lingual	moderado	moderado	-	-	familiar	A	A	A	A	A	nl	nl	-	idiopático
257	16876	Br	pré-lingual	profundo	profundo	-	neurossensorial	familiar	A	A	A	A	A	nl	nl	-	AR/Cons
258	16886	-	pré-lingual	-	-	-	-	isolado	A	A	A	A	A	nl	nl	-	idiopático com sinais
259	16887	Br	pré-lingual	profundo	profundo	-	-	familiar	A	A	A	A	A	nl	nl	-	idiopático
260	16902	Pd	pré-lingual	profundo	profundo	-	neurossensorial	familiar	A	A	A	A	A	nl	nl	-	AR/Cons

Anexo II - Quadro com resumo da casuística total. Abreviações utilizadas: “Br” = Branco; “Pd” = Pardo; “Ne” = Negro; “Or” = Oriental; “DNAmT” = DNA mitocondrial; “OE” = orelha esquerda; “OD = orelha direita; “A” = ausência da mutação; “P” = presença da mutação; “(+/-)” = heterozigoto; “(+/+)” = homozigoto; “ - “ = não testada ou não esclarecida; “na” = não se aplica; “nl” = normal; “AR” = herança autossômica recessiva; “AD” = herança autossômica dominante; “MT” = herança mitocondrial; “Cons” = consangüinidade.

Nº	Registro	Grupo étnico	Idade de manifestação	Grau da perda		Evolução	Tipo	História familiar	DNAmT	Conexinas						Conclusão	
				OD	OE					A1555G	35delG	GJB6-18S1830	GJB6-18S1854	167delT	1º SSCP		2º SSCP
261	16910	Pd	pré-lingual	-	-	-	-	familiar	A	A	A	A	A	nl	nl	nl/nl	idiopático com sinais
	16910J	Pd	ouvinte	na	na	na	na	na	A	A	A	A	A	alt	nl	T/C - 15/nl	
262	16929	Br	pós-lingual	grave	grave	progressiva	neurossensorial	familiar	A	A	A	A	A	nl	nl	-	AD ou MT
263	16933	Pd	pré-lingual	grave	grave	-	neurossensorial	familiar	A	A	A	A	A	alt	nl	G79A/nl	AR
264	16935	Br	pós-lingual	moderado	moderado	progressiva	neurossensorial	familiar	A	A	A	A	A	nl	nl	-	AD
265	16941	Br	pós-lingual	moderado	grave	estacionária	-	familiar	A	P(+/-)	A	A	A	alt	nl	35delG/nl	idiopático
266	16946	Br	-	moderado	moderado	-	neurossensorial	familiar	A	A	A	A	A	nl	nl	-	idiopático
267	16963	Pd	pré-lingual	nl	profundo	-	-	isolado	A	A	A	A	A	nl	nl	-	idiopático
268	16964	Pd	pré-lingual	profundo	profundo	estacionária	neurossensorial	familiar	A	A	A	A	A	nl	nl	-	AR
269	16966	Br	pós-lingual	profundo	profundo	progressiva	neurossensorial	familiar	A	A	A	A	A	nl	nl	-	AD
270	16974	Br	pós-lingual	profundo	profundo	progressiva	neurossensorial	familiar	A	A	A	A	A	nl	nl	-	AR
271	16975	Pd	pré-lingual	moderado	moderado	estacionária	neurossensorial	isolado	A	A	A	A	A	nl	nl	-	AR/Cons
272	17001	Br	pós-lingual	leve	leve	-	neurossensorial	familiar	A	A	A	A	A	nl	nl	-	idiopático
273	17002	Pd	pré-lingual	profundo	profundo	-	neurossensorial	isolado	A	A	A	A	A	nl	nl	-	idiopático
274	17005	Br	pré-lingual	profundo	profundo	progressiva	neurossensorial	-	A	A	A	A	A	nl	nl	-	idiopático
275	17013	Br	pré-lingual	profundo	profundo	-	-	isolado	A	A	A	A	A	nl	nl	-	idiopático
276	17016	Pd	pré-lingual	grave	grave	progressiva	neurossensorial	familiar	A	A	A	A	A	alt	nl	T101C/T101C	AR
	17016U	Pd	pré-lingual	grave	grave	-	neurossensorial	familiar	-	A	A	A	A	alt	nl	T101C/nl	
277	17018	Pd	pré-lingual	profundo	profundo	-	neurossensorial	isolado	A	A	A	A	A	nl	nl	-	ambiental
278	17036	Br	pré-lingual	-	-	-	-	familiar	A	A	A	A	-	nl	nl	-	AR/Cons
	17036M	Br	ouvinte	na	na	na	na	na	A	A	A	A	A	nl	nl	-	
	17036F	Br	ouvinte	na	na	na	na	na	A	A	A	A	A	nl	nl	-	
279	17048	Pd	pós-lingual	moderado	nl	-	neurossensorial	isolado	A	A	A	A	A	nl	nl	-	idiopático
280	17050	-	-	-	-	-	-	-	A	A	A	A	A	nl	nl	-	AR
281	17064H	-	pós-lingual	profundo	profundo	-	neurossensorial	familiar	P	A	A	A	A	nl	nl	-	MT

Anexo II - Quadro com resumo da casuística total. Abreviações utilizadas: “Br” = Branco; “Pd” = Pardo; “Ne” = Negro; “Or” = Oriental; “DNAmT” = DNA mitocondrial; “OE” = orelha esquerda; “OD = orelha direita; “A” = ausência da mutação; “P” = presença da mutação; “(+/-)” = heterozigoto; “(+/+)” = homozigoto; “ - ” = não testada ou não esclarecida; “na” = não se aplica; “nl” = normal; “AR” = herança autossômica recessiva; “AD” = herança autossômica dominante; “MT” = herança mitocondrial; “Cons” = consangüinidade.

Nº	Registro	Grupo étnico	Idade de manifestação	Grau da perda		Evolução	Tipo	História familiar	DNAmT	Conexinas						Conclusão	
				OD	OE					A1555G	35delG	GJB6-18S1830	GJB6-18S1854	167delT	1º SSCP		2º SSCP
282	17097	Br	pré-lingual	profundo	profundo	-	-	isolado	A	A	A	A	A	nl	nl	-	idiopático com sinais
283	17098	Br	pré-lingual	profundo	profundo	-	neurossensorial	isolado	A	A	A	A	A	nl	nl	-	idiopático
284	17102	Br	pré-lingual	-	-	-	neurossensorial	isolado	A	A	A	A	A	nl	nl	-	AR
285	17113	Br	pós-lingual	grave	grave	progressiva	neurossensorial	familiar	A	A	A	A	A	nl	nl	-	AD
286	17124	Pd	pós-lingual	profundo	profundo	progressiva	neurossensorial	familiar	A	A	A	A	A	nl	nl	-	idiopático Cons
287	17136	Pd	pré-lingual	profundo	condutivo	-	mista	isolada	A	A	A	A	A	nl	nl	nl/nl	idiopático
288	17146	Pd	pré-lingual	profundo	profundo	-	neurossensorial	isolado	A	A	A	A	A	nl	alt	G503A/nl	idiopático
289	17167	Pd	pré-lingual	-	-	progressiva	-	familiar	A	A	A	A	A	nl	nl	nl/nl	idiopático
290	17177	Br	pós lingual	moderado	moderado	progressiva	neurossensorial	isolado	A	A	A	A	A	nl	nl	-	idiopático
291	17179	Pd	pré lingual	profundo	profundo	progressiva	neurossensorial	isolada	A	A	A	A	A	alt	nl	T101C/ nl	idiopático
292	17187	Br	pré-lingual	grave	grave	-	neurossensorial	familiar	A	A	A	A	A	nl	nl	-	idiopático
293	17224	Br	pré-lingual	-	-	-	-	isolado	A	A	A	A	A	nl	nl	-	idiopático
294	17225	Br	pós-lingual	moderado	profundo	progressiva	neurossensorial	familiar	A	A	A	A	A	alt	nl	G79A/nl	idiopático
295	17226	Br	pós-lingual	profundo	profundo	progressiva	neurossensorial	isolado	A	A	A	A	A	nl	nl	-	idiopático
296	17229	Br	pré-lingual	moderado	moderado	progressiva	-	familiar	A	P(+/-)	A	A	A	alt	nl	35delG/nl	AR
297	17239	Br	pós-lingual	grave	grave	progressiva	neurossensorial	familiar	A	A	A	A	A	nl	nl	nl/nl	idiopático
298	17240	Br	pós-lingual	grave	grave	progressiva	neurossensorial	familiar	A	A	A	A	A	nl	nl	-	idiopático
299	17241	Br	pós-lingual	leve	leve	progressiva	neurossensorial	isolado	A	P(+/-)	A	-	A	alt	nl	35delG/ G109A	AR
	17241 E	Br	ouvinte	na	na	na	na	na	-	A	-	-	-	alt	nl	G109A/ nl	
	17241 T	Br	ouvinte	na	na	na	na	na	-	P(+/-)	-	-	-	alt	nl	35delG/ nl	
300	17254	Br	pré-lingual	grave	grave	estacionária	neurossensorial	familiar	A	A	A	A	A	nl	nl	-	idiopático

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)