

Sueli Matilde da Silva Costa

**“ESTUDO MOLECULAR EM INDIVÍDUOS SURDOS COM
DIAGNÓSTICO GENÉTICO INDEFINIDO”**

CAMPINAS

2013



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
INSTITUTO DE BIOLOGIA

SUELI MATILDE DA SILVA COSTA

**“ESTUDO MOLECULAR EM INDIVÍDUOS SURDOS COM
DIAGNÓSTICO GENÉTICO INDEFINIDO”**

este exemplar corresponde à redação final
da tese defendida pelo(a) candidato (a)
Sueli Matilde da Silva Costa
e aprovada pela Comissão Julgadora.

Tese apresentada ao Instituto de Biologia da UNICAMP para obtenção do Título de Doutora em Genética e Biologia Molecular, na área de Genética Animal e Evolução.

Orientadora: Profa. Dra. EDI LUCIA SARTORATO

CAMPINAS,
2013

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA POR
MARA JANAINA DE OLIVEIRA – CRB8/6972
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA - UNICAMP

Si38e Silva-Costa, Sueli Matilde da, 1962-
Estudo molecular em indivíduos surdos com
diagnóstico genético indefinido / Sueli Matilde da Silva
Costa. – Campinas, SP: [s.n.], 2013.

Orientador: Edi Lucia Sartorato.
Tese (doutorado) – Universidade Estadual de
Campinas, Instituto de Biologia.

1. Perda auditiva. 2. Genes. 3. Conexinas. 4.
Mutaçãõ (Biologia). I. Sartorato, Edi Lúcia. II.
Universidade Estadual de Campinas. Instituto de
Biologia. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em Inglês: Molecular study of deaf individuals with genetically inconclusive diagnostic

Palavras-chave em Inglês:

Hearing loss

Genes

Connexins

Mutation (Biology)

Área de concentração: Genética Animal e Evolução

Titulação: Doutora em Genética e Biologia Molecular

Banca examinadora:

Edi Lucia Sartorato [Orientador]

Andréa Trevas Maciel-Guerra

Monica Barbosa de Melo

Marília Fontenele e Silva Câmara

Renata de Lima

Data da defesa: 20-02-2013

Programa de Pós Graduação: Genética e Biologia Molecular

Campinas, 20 de fevereiro de 2013

BANCA EXAMINADORA


Profa. Dra. Edi Lucia Sartorato (orientadora)


Assinatura


Dra. Monica Barbosa De Melo


Assinatura

Profa. Dra. Andrea Trevas Maciel Guerra


Assinatura

Dra. Renata De Lima


Assinatura

Profa. Dra. Marília Fontenele E Silva Câmara


Assinatura

Dr. Arthur Menino Castilho

Assinatura

Prof. Dr. Adriano Rodrigues Azzoni

Assinatura

Prof. Dr. Lúcio Fabio Caldas Ferraz

Assinatura

“O verdadeiro homem mede a sua força,
quando se defronta com o obstáculo”.

Antoine de Saint-Exupéry

À minha avó Violeta, que superou grandes
desafios sempre com força e coragem.

AGRADECIMENTOS

À Prof^a. Dra. Edi Lucia Sartorato pelas oportunidades, orientação e confiança. Durante estes anos tem contribuído para o meu aprendizado bem como muito, muito sobre a vida. Alcançar desejos não é impossível, basta acreditar. Depende fundamentalmente de esforço e determinação. Muito obrigada pelo carinho e amizade.

Às Prof^{as} Dr^a. Mônica Barbosa de Melo e Dr^a. Andréa Trevas Maciel Guerra por terem aceitado, prontas e gentilmente, a participar da banca avaliadora do exame de qualificação, banca prévia e à defesa da tese. Sempre com sugestões pertinentes e importantes contribuíram para tornar esse trabalho melhor.

À Prof^a. Dr^a. Renata de Lima por ter gentilmente aceito participar como membro da banca examinadora de defesa da tese.

À Prof^a.Dr^a. Marília Fontenele e Silva Câmara que apesar de ter que vir de tão longe, aceitou participar da defesa da tese como membro da banca examinadora.

À Prof^a. Dr^a. Fabiana Alexandrino pela participação na banca avaliadora do exame de qualificação, pela amizade e por importantes contribuições no meu aprendizado em Biologia Molecular. Obrigada Frau!!

Aos colegas Rodrigo Secolin e Thiago Marconi por estarem sempre prontos a ajudar, contribuindo diretamente na realização da tese.

À todos os meus queridos amigos dos Laboratórios de Genética Humana I e II que tornaram o tempo no lab, momentos de muito aprendizado e também de muita diversão: Dra. Adriana, Ana Letícia, Ana Paula, Bella, Carol, Cris, Creyto (Emerson), Débora, Fábio, Fer II, Flor (Flavia), Foca (Érica), Helena, Jéssica, Jhonathan, Laura, Lilian, Luli (Luciana), Mara, Mari, Nathy, Pamela, Paula, Paulo (obrigada por tentar diminuir minhas ansiedades e

nos inúmeros auxílios no computador), Priscila (obrigada pelas correções), Reginaldo, Renata, Rogério, Rose, Taciane e Zélo. Tem sido muito bom trabalhar com vocês.

À Prof^a. Dra. Maricilda pelas conversas na hora do almoço recheadas de estímulos e sabedoria.

À minha querida Vanessa, companheira do começo e amiga de sempre. Obrigada pela sua confiança, amizade e alegria. Você tem sido muito importante na minha vida. Valeu Van!!

À minha irmã Solange mesmo distante esteve sempre presente.

Aos queridos amigos Carla e Francisco, Luisa e José Pallone, Irene e Ulrich, Ivone e Paulo e Célia e Wagner. Obrigada pelo estímulo, amizade e carinho. Obrigada Carla por sempre acreditar em mim.

À querida prima Leda pelas palavras de sabedoria, pela força e paciência nos momentos mais difíceis.

À Oneyde e Isaias, Oneisa e Luiz Carlos, Silvia e Álvaro Luís, família que eu herdei, bênçãos de Deus.

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

Aos professores do CBMEG e as garotas da secretaria Tânia, Sandra e Gabriela.

Às agências financiadoras Capes, CNPq e FAPESP, pela bolsa e auxílios concedidos.

Aos meus pais Célia e José Raphael, a quem devo tudo. Minhas referências de vida.

A todos que de alguma forma, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho.

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

À minha querida família, Afonso José, Amanda e Beatriz, pelo amor incondicional, alegrias, paciência e compreensão. Amo vocês!

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	xvi
LISTA DE TABELAS.....	xxi
ABREVIATURAS.....	xxiii
RESUMO	xxvii
ABSTRACT.....	xxix
1. INTRODUÇÃO	3
1.1 O sistema auditivo	3
1.2 Mecanismo da audição.....	5
1.3 Perda Auditiva	6
1.3.1. Classificação das perdas auditivas.....	7
1.3.1.1 Quanto à localização da anomalia.....	7
1.3.1.2 Quanto ao grau.....	8
1.3.1.3 Quanto aos sinais clínicos.....	8
1.3.2 Etiologia da perda auditiva.....	9
1.3.3. Genética da perda auditiva.....	10
1.3.3.1 Perda auditiva síndrômica.....	11
1.3.3.2 Perda auditiva não-sindrômica	13
1.3.3.3.1 Gene <i>GJB2</i>	20
1.3.3.3.1.2 Indivíduos monoalélicos para mutações na Conexina 26	23
1.3.3.3.2 Gene <i>GJB6</i>	23
1.3.3.4 Gene <i>SLC26A4</i>	26
1.3.3.5 Gene <i>CDH23</i>	29

1.3.3.6	MicroRNAs - <i>Cluster miR-183</i>	31
1.3.3.7	Genes Mitocondriais	34
1.4	Justificativa	36
2-	OBJETIVOS.....	39
3-	METODOLOGIA	43
3.1	Casuística.....	43
3.2	Métodos	46
3.2.1.	Extração do DNA genômico de sangue periférico.....	46
3.2.2.	Triagem de mutações nos principais genes envolvidos na Surdez	48
3.2.2.1	Rastreamento da mutação c.35delG no gene <i>GJB2</i>	48
3.2.2.2.	Rastreamento de mutações no gene <i>GJB2</i> por sequenciamento automático	48
3.2.2.2.1	Amplificação do gene <i>GJB2</i>	48
3.2.2.2.2.	Purificação dos produtos de PCR	49
3.2.2.2.3.	Reação para Sequenciamento.....	50
3.2.2.2.4.	Análise das sequências obtidas	51
3.2.2.3.	Rastreamento da mutação <i>IVS1+1G>A</i> no gene <i>GJB2</i>	51
3.2.2.4.	Rastreamento das deleções <i>del(GJB6-D13S1830)</i> e <i>del(GJB6-D13S1854)</i> no gene <i>GJB6</i>	53
3.2.2.5.	Rastreamento da mutação <i>m.1555A>G</i> no gene mitocondrial <i>MTRNR1</i>	55
3.2.2.6.	Rastreamento da deleção <i>del (CHR13 :19,837,344-19, 968698)</i>	56
3.2.2.7.	Rastreamento de mutações no gene <i>SLC26A4</i> por sequenciamento automático	58
3.2.2.7.1	Amplificação do gene <i>SLC26A4</i>	58
3.2.2.8	Análises das mutações <i>R301Q</i> e <i>R1746Q</i> no gene <i>CDH23</i>	61
3.2.2.8.1	Amplificação de 2 éxons no gene <i>CDH23</i>	61
3.2.2.9	Rastreamento de mutações no <i>cluster miR-183</i>	62

3.2.2.9.1	Amplificação do <i>cluster miR-183</i>	63
3.2.3	Genotipagem utilizando a Técnica de Espectrometria de Massa	64
3.2.3.1	Rastreamento de deleções ou duplicações no <i>locus</i> DFNB1.....	66
3.2.3.1.1	Desenho dos ensaios	66
3.2.3.1.1.1	Seleção dos <i>SNPs</i>	66
3.2.3.1.1.2	Desenho dos <i>Primers</i>	68
3.2.3.2	Rastreamento de mutações nos principais genes, nucleares e mitocondriais, envolvidos na perda auditiva	69
3.2.3.2.1	Desenho dos ensaios	69
3.2.3.2.1.1	Seleção dos genes e mutações.....	69
3.2.3.2.1.2	Desenho dos <i>Primers</i>	76
3.2.3.3.	Análise qualitativa e quantitativa das amostras	77
3.2.3.4.	Reações - iPLEX® Gold Genotyping.....	77
3.2.3.4.1	PCR Captura: Amplificação de fragmentos contendo os <i>SNPs</i> /Mutações.....	79
3.2.3.4.2	Tratamento com SAP	80
3.2.3.4.3	PCR de extensão – iPLEX Gold	80
3.2.3.4.4	Purificação dos produtos de PCR e Reação de espectrometria de massa	81
4-	RESULTADOS	85
4.1	Rastreamento da deleção del(CHR13 :19,837,344-19, 968698)	85
4.2	Rastreamento de mutações no <i>cluster miR-183</i>	86
4.2.1	Amplificação do <i>cluster miR-183</i>	87
4.2.2	Rastreamento de mutações no <i>cluster miR-183</i> nos indivíduos do Grupo I.....	87
4.2.2.1	Análise do <i>miR-96/183</i>	87
4.2.2.2	Análise do <i>miR-182</i>	88

4.2.3 Rastreamento de mutações no <i>cluster miR-183</i> nos indivíduos do Grupo II.....	92
4.2.3.1 Análise do <i>miR-96/183</i>	92
4.2.3.2 Análise do <i>miR-182</i>	94
4.3. Resultados da genotipagem utilizando a Técnica de Espectrometria de Massa	95
4.3.1 Rastreamento de deleções ou duplicações no <i>locus DFNB1</i>	95
4.3.2. Rastreamento de mutações nos principais genes, nucleares e mitocondriais, envolvidos na perda auditiva.	97
4.3.2.1. Mutações identificadas em genes nucleares	98
4.3.2.1.1 Alteração p.V609G – Gene <i>SLC26A4</i>	98
4.3.2.1.2 Alteração p.C282Y - Gene <i>SLC26A4</i>	99
4.3.2.1.3 Alteração p.R1746Q – Gene <i>CDH23</i>	99
4.3.2.1.4 Alteração p.R301Q – Gene <i>CDH23</i>	100
4.3.2.2 Mutações identificadas em genes mitocondriais.....	101
4.3.2.2.1 Alteração m.4363T>C	101
4.3.2.2.2 Alteração m.709G>A	101
4.3.2.2.3 Alteração m.5655T>C	102
4.3.2.2.4 Alteração m.12236G>A	102
4.3.2.2.5 Alteração m.988G>A	103
4.3.2.2.6 Alteração m.5628T>C	104
4.3.2.2.7 Alteração m.1027A>G	104
4.3.2.2.8. Alteração m.1291T>C.....	105
5- DISCUSSÃO	111
6- CONCLUSÕES.....	123
7- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	127

ANEXO 1	147
ANEXO 2	149
ANEXO 3	151
ANEXO 4	153
ANEXO 5	165

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Esquema do sistema auditivo evidenciando as principais partes da orelha externa, média e interna.....	3
Figura 2. Ilustração esquemática da cóclea. Visualização frontal e em secção transversal. A secção transversal da cóclea mostra a escala média entre as escalas vestibular e timpânica.....	4
Figura 3. Representação esquemática da estrutura das conexinas	16
Figura 4. Estrutura cristalográfica do conexon (PDB ID 2ZW3).....	17
Figura 5. Esquema mostrando diferentes tipos de canais intercelulares.	17
Figura 6. Desenho esquemático mostrando regiões de expressão da Cx26 na orelha interna.....	19
Figura 7. Esquema indicando o sítio onde ocorre a mutação IVS1+1G>A no gene <i>GJB2</i>	22
Figura 8. Apresentação esquemática das posições das deleções já descritas no <i>locus</i> DFNB1.	26
Figura 9. Esquema da estrutura secundária da proteína pendrina	27
Figura 10. Diagrama da (a) orelha interna normal e (b) aqueduto vestibular alargado.....	28
Figura 11. Micrografia dos estereocílios das células ciliadas da cóclea.	30
Figura 12. Esquema da estrutura coclear indicando a localização dos <i>miRNAs</i> em camundongos...	32
Figura 13. Alterações encontradas no <i>miR-96</i> e nas células ciliadas da cóclea.	33
Figura 14. Fluxograma mostrando a estratégia de estudo utilizada nas amostras de DNA de pacientes com perda auditiva não-sindrômica.....	44
Figura 15. Fluxograma mostrando a estratégia de estudo das amostras de DNA de pacientes com perda auditiva não-sindrômica com mutações recessivas no gene <i>GJB2</i> ou <i>GJB6</i> em apenas um alelo.	46
Figura 16. Ciclos utilizados na amplificação do gene <i>GJB2</i>	49
Figura 17. Ciclos de amplificação para posterior sequenciamento do gene <i>GJB2</i>	50
Figura 18. Ciclos de amplificação para o estudo da mutação IVS1+1G>A.....	52
Figura 19. Ciclos de amplificação para o estudo das deleções del(<i>GJB6</i> -D13S1830) e del(<i>GJB6</i> -D13S1854).	54

Figura 20. Ciclos de amplificação para o estudo da mutação mitocondrial m.1555A>G.....	55
Figura 21. Ciclos de amplificação para o estudo da mutação del(chr.13: 19,837,344-19,968,698) no gene <i>GJB6</i>	57
Figura 22. Ciclos de amplificação para posterior sequenciamento do gene <i>SLC26A4</i>	60
Figura 23. Ciclos de amplificação dos éxons 9 e 40 do gene <i>SLC26A4</i> para posterior sequenciamento.	62
Figura 24. Esquema do desenho de <i>primers</i> do <i>cluster miR-183/96/182</i> localizado no Crom. 7.	63
Figura 25. Ciclos de amplificação do <i>cluster miR-183</i> para posterior sequenciamento.....	64
Figura 26. Equipamentos utilizados no Sistema MassArray.....	65
Figura 27. Desenho esquemático do <i>locus</i> DFNB1 (Cromossomo 13) mostrando a localização dos genes <i>GJB2</i> e <i>GJB6</i> , região das deleções já descritas e distribuição dos <i>SNPs</i> estudados.	67
Figura 28. Etapas do método <i>iPLEX Gold Sequenom</i>	78
Figura 29. Ciclos de amplificação do PCR captura do método <i>iPLEX Gold - Sequenom</i>	79
Figura 30. Ciclos de amplificação do PCR extensão do método <i>iPLEX Gold - Sequenom</i>	81
Figura 31. Componentes da Técnica de Espectrometria de massa por tempo de voo (TOF MS) através da Ionização/Dessorção a laser, assistido por uma matriz (MALDI).	82
Figura 32. Resultado da pesquisa da del(CHR13 :19,837,344-19, 968698)	85
Figura 33. Representação gráfica dos grupos de pacientes rastreados para mutações no <i>cluster miR-183</i>	86
Figura 34. Gel de agarose apresentando o produto de PCR para sequenciamento do <i>miR-96/183</i> e <i>miR-182</i>	87
Figura 35. Eletroferograma mostrando em destaque a alteração C>T (Crom.7:129414474) referente ao <i>SNP</i> rs74994806.....	88
Figura 36. Eletroferograma mostrando em destaque a alteração C>A (Crom.7: 129414804) referente ao <i>SNP</i> rs72631833.....	88
Figura 37. Sequência mostrando em destaque a localização do polimorfismo rs72631833 no <i>miR-183</i>	88
Figura 38. Eletroferograma mostrando em destaque a alteração G>A em homozigose (Crom.7: 129410144) referente ao <i>SNP</i> rs4467881.....	89

Figura 39. Eletroferograma mostrando em destaque a alteração G>A em homozigose (Crom.7: 129410195) referente ao <i>SNP</i> rs4541843.....	89
Figura 40. Eletroferograma mostrando em destaque a alteração C>T (Crom.7: 129410227) referente ao <i>SNP</i> rs76481776.....	89
Figura 41. Sequência mostrando a localização do polimorfismo rs76481776 no pré- <i>miR-182</i>	90
Figura 42. Eletroferograma mostrando em destaque a alteração G>A (Crom.7: 129414568) referente ao <i>SNP</i> rs73159662.....	92
Figura 43. Eletroferograma mostrando em destaque a alteração A>G (Crom.7: 129414574) referente ao <i>SNP</i> rs41274239.....	93
Figura 44. Eletroferograma mostrando em destaque a alteração G>A (Crom.7: 129414895) referente ao <i>SNP</i> rs77887327.....	93
Figura 45. Eletroferograma mostrando em destaque a alteração A>G identificada na posição 129414878 do Cromossomo 7.....	93
Figura 46. Eletroferograma mostrando em destaque a alteração G>A identificada na posição 129414618 do Cromossomo 7.....	94
Figura 47. Eletroferograma mostrando em destaque a alteração C>T identificada na posição 129410239 do Cromossomo 7 referente ao <i>SNP</i> rs80041074.....	94
Figura 48. Gráficos gerados após normalização das áreas dos picos de amplificação de cada <i>SNP</i> . Cada ponto representa um <i>SNP</i>	96
Figura 49. Análise dos dados baseado no genótipo de cada <i>SNP</i>	97
Figura 50. Detecção da alteração p.V609G. (a) Espectro e (b) gráfico gerados no <i>software</i> <i>Typser Analyser</i>	98
Figura 51. (a) Espectro mostrando a detecção da alteração p.C282Y em heterozigose. (b) Gráfico do ensaio mostrando resultados de todos os pacientes testados.	99
Figura 52. (a) Espectro mostrando a detecção da alteração p.R1746Q. (b) Gráfico do ensaio indicando em destaque o resultado do paciente 03Unif.	100
Figura 53. (a) Espectro mostrando a detecção da alteração p.R301Q. (b) Gráfico indicando em destaque o resultado do indivíduo 574Oto.	100
Figura 54. (a) Espectro e (b) gráfico da alteração m.4363T>C. Todos os indivíduos apresentaram o mesmo genótipo gerando apenas um <i>cluster</i>	101

Figura 55. (a) Espectro mostrando a detecção da alteração m.709 G>A (b) Gráfico da alteração m.709 G>A.Em destaque no gráfico o resultado do indivíduo portador da alteração em homoplasmia. 102

Figura 56. (a) Espectro e (b) gráfico da alteração m.5655T>C. Em destaque no gráfico resultado de um indivíduo portador da alteração em heteroplasmia. 102

Figura 57. (a) Espectro mostrando a detecção da alteração m.12236G>A (b) Em destaque no gráfico o resultado de um indivíduo portador da alteração em homoplasmia. 103

Figura 58. (a) Espectro mostrando a detecção da alteração m.988G>A. (b) Em destaque no gráfico o resultado do indivíduo 118I portador da alteração m.988G>A em homoplasmia. 103

Figura 59. (a) Espectro mostrando a detecção da alteração m.5628T>C. (b) Em destaque no gráfico o resultado de um indivíduo portador da alteração em homoplasmia..... 104

Figura 60. (a) Espectro mostrando a detecção da alteração m.1027A>G. (b) Gráfico indicando em destaque um indivíduo portador da alteração..... 105

Figura 61. (a) Espectro mostrando a detecção da alteração m.1291T>C. (b) Gráfico indicando em destaque um indivíduo portador da alteração m.1291T>C. 105

LISTA DE TABELAS

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Fatores ambientais e genéticos envolvidos na perda auditiva (Modificado de Russo, 2000).	10
Tabela 2. Principais síndromes que apresentam a perda auditiva como sinal clínico (Van Camp Smith, 2012).	11
Tabela 3. Genes associados à perda auditiva não-sindrômica (Modificado de Hilgert <i>et al.</i> , 2009); Baseado em Van Camp & Smith. Hereditary Hearing Loss Homepage. Disponível em < http://hereditaryhearingloss.org >).	13
Tabela 4. Resultados obtidos no rastreamento de mutações nos genes <i>GJB2</i> , <i>GJB6</i> e <i>MT-RNR1</i> em 48 indivíduos selecionados.	45
Tabela 5. Sequências dos <i>primers</i> utilizados para a amplificação do gene <i>GJB2</i> e tamanho dos fragmentos gerados.	48
Tabela 6. Sequências dos <i>primers</i> utilizados na triagem das deleções del(<i>GJB6-D13S1830</i>) e del(<i>GJB6-D13S1854</i>) e tamanho dos fragmentos gerados.	53
Tabela 7. Sequências dos <i>primers</i> utilizados na triagem das deleções del (CHR13 :19,837,344-19, 968698) e tamanho dos fragmentos gerados.	56
Tabela 8. Sequências dos <i>primers</i> utilizados na triagem de mutações no gene <i>SLC26A4</i> , Tm e tamanho dos fragmentos gerados.	58
Tabela 9. Sequências dos <i>primers</i> utilizados na pesquisa de mutações no gene <i>CDH23</i> , Tm e tamanho dos fragmentos gerados.	61
Tabela 10. Sequência de <i>primers</i> para amplificação do <i>cluster miR-183</i>	63
Tabela 11. Identificação e localização dos <i>SNPs</i> no Cromossomo 13.	67
Tabela 12. Mutações selecionadas, seus respectivos genes nucleares e referências.	70
Tabela 13. Mutações selecionadas para o estudo, seus respectivos genes mitocondriais e referências.	74
Tabela 14. Alterações encontradas no <i>cluster miR-183</i> em pacientes monoalélicos DFNB1.	90
Tabela 15. Alterações encontradas em genes nucleares e mitocondriais nos pacientes estudados.	106

ABREVIATURAS

ABREVIATURAS

ATP	Trifosfato de Adenosina
CEPRE	Centro de Pesquisas e Estudo em Reabilitação Prof. Dr. Gabriel Porto
Cx	Conexina
dB	Decibel
delG	Deleção da base nitrogenada guanina
DFN	Deafness
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
dNTP	Desoxinucleotídeo trifosfato
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
g	Gramma
GJB	<i>Gap Junction</i> Beta (Junção Comunicante na conformação Beta)
h	Hora
IVS	<i>Intervinient Sequence</i>
K⁺	Potássio
kb	quilobase
kDa	quilodalton
L	<i>Ladder</i>

min	Minuto
miRNA	MicroRNA
mL	Mililitro
mM	MiliMolar
mRNA	RNA mensageiro
ng	Nanograma
nL	Nanolitro
OMIM	<i>Online Mendelian Inheritance in Man</i>
OMS	Organização Mundial de Saúde
mtDNA	DNA mitocondrial
pb	Par de base
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i> (reação em cadeia da polimerase)
pH	Potencial de hidrogênio iônico
RNA	Ácido Ribonucleico
rpm	Rotações por minuto
rRNA	RNA ribossomal
SDS	Dodecil Sulfato de Sódio
SNP	<i>Single-Nucleotide Polymorphism</i> (Polimorfismo de nucleotídeo único)
Taq	<i>Thermus aquaticus</i> (enzima polimerase)

TBE	Trisborato EDTA
TE	Tris EDTA
tRNA	RNA transportador
Tm	Temperatura de <i>melting</i> (fusão)
U	Unidade
°C	<i>Grau Celsius</i>
µg	Micrograma
µL	Microlitro

RESUMO

A deficiência auditiva é dos defeitos sensoriais o mais comum, afetando cerca de um em cada quinhentos recém-nascidos. Mais de 60% dos casos de perda auditiva congênita são causadas por fatores genéticos. Apesar da grande heterogeneidade da perda auditiva genética, mais de 50% estão associadas a mutações no *locus* DFNB1 no cromossomo 13q12. Este *locus* contém os genes *GJB2* e *GJB6* que codificam as proteínas conexina 26 e 30 respectivamente. A alta prevalência de indivíduos com perda auditiva apresentando mutações recessivas no *locus* DFNB1 em apenas um alelo tem dificultado o diagnóstico molecular e conseqüentemente o aconselhamento genético. Portanto, o principal objetivo deste trabalho foi elucidar a causa genética da perda auditiva em quarenta e oito indivíduos monoalélicos para mutações recessivas no gene *GJB2* (46) ou no gene *GJB6* (2). Prováveis novas deleções no *locus* DFNB1 foram encontradas em quatro indivíduos heterozigotos para mutações no gene *GJB2*. Além disso, entre os quarenta e oito indivíduos estudados foram detectadas duas mutações no gene *SLC26A4* (p.V609G, p.C282Y) em três deles e ainda, duas mutações no gene *CDH23*, p.R1746Q e p.R301Q, em dois indivíduos. As mutações, p.V609G, p.C282Y e p.R1746Q, foram encontradas em heterozigose e, portanto, não é possível afirmar que, de fato, essas alterações sejam a causa da surdez. Contudo, a mutação p.R301Q, encontrada em homozigose em um dos pacientes estudados, trata-se de uma mutação *missense* e poderia explicar o fenótipo. Entre os quarenta e oito indivíduos estudados foram ainda detectadas oito alterações mitocondriais em dezoito casos. Quatro delas podem estar envolvidas com a perda auditiva justificando assim a surdez. Quanto a análise do *cluster miR-183*, nenhuma mutação patogênica foi encontrada em nenhum dos quinhentos e vinte e um indivíduos analisados, o que corrobora com dados da literatura onde mutações nos microRNAs, *miR-96-183-182* não são uma causa comum de surdez. Concluiu-se que, a pesquisa de mutações em outros genes diminui o número de casos com diagnóstico inconclusivo. Entretanto, devido à grande heterogeneidade genética e clínica da perda auditiva muitos permanecem ainda com diagnóstico indefinido.

ABSTRACT

ABSTRACT

Hearing impairment is the most common sensory impairment, affecting approximately one in five hundred newborns. More than 60% of the congenital hearing loss cases are caused by genetics factors. Despite the enormous heterogeneity of genetic hearing loss, up to 50% of the cases are associated with mutations in the DFNB1 locus on chromosome 13q12. This locus contains the *GJB2* and *GJB6* genes, which code for the gap junction (GJ) proteins connexin 26 (Cx26) and connexin 30 (Cx30) respectively. A large number of affected individuals carry only a single identified recessive mutation in locus DFNB1, making the molecular diagnostic and genetic counseling difficult. The aim of this study was to elucidate the genetic cause of hearing loss in forty eight individuals monoallelic for recessive mutations in the *GJB2* gene (46) or in *GJB6* gene (2). Probable new DFNB1 locus deletions were found in four individuals heterozygous for mutations in *GJB2* however. Moreover, among the forty eight heterozygous individuals studied, two mutations were detected in the *SLC26A4* gene (p.V609G, p.C282Y) in three of them and two mutations in *CDH23* gene (p.R1746Q p.R301Q) were identified in two individuals. Mutations, p.V609G, and p.C282Y p.R1746Q were found in heterozygous and therefore could not be considered the cause of deafness in the patients studied. However, the mutation p.R301Q was present as homozygous in one individual. This alteration is a missense mutation, and may explain the deafness in this patient. Among the forty eight subjects studied, we detected eight mitochondrial alterations in eighteen cases. Four of them may be involved with hearing loss, thus justifying deafness. As the analysis of the miR-183 cluster, no pathogenic mutation was found in any of the five hundred twenty-one individuals analyzed, which agrees with literature data where mutations in microRNAs, miR-96-183-182 are not a common cause of deafness. We conclude that the detection of mutations in other genes reduces the number of cases with inconclusive diagnostic. However, due to high clinical and genetic heterogeneity of hearing loss with many still remains undefined diagnosis.

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

1.1 O sistema auditivo

O sistema auditivo é um dos mais complexos e sofisticados mecanismos de transdução existentes na natureza. Ele é responsável por captar e transformar a energia mecânica das ondas sonoras em impulsos elétricos, que são enviados ao cérebro, onde são decodificados e interpretados, permitindo a compreensão dos sons ao nosso redor. O sistema auditivo é composto pela orelha externa, média e interna (Figura 1). A orelha externa é dividida anatomicamente em duas partes: o pavilhão auricular e o canal auditivo externo (meato acústico). A função principal do pavilhão auricular é captar e direcionar as ondas sonoras para o canal auditivo. Já o canal auditivo externo tem a função de transmitir os sons para a membrana timpânica e proteger a orelha média e interna, além de servir de câmara de ressonância ampliando algumas frequências de sons.

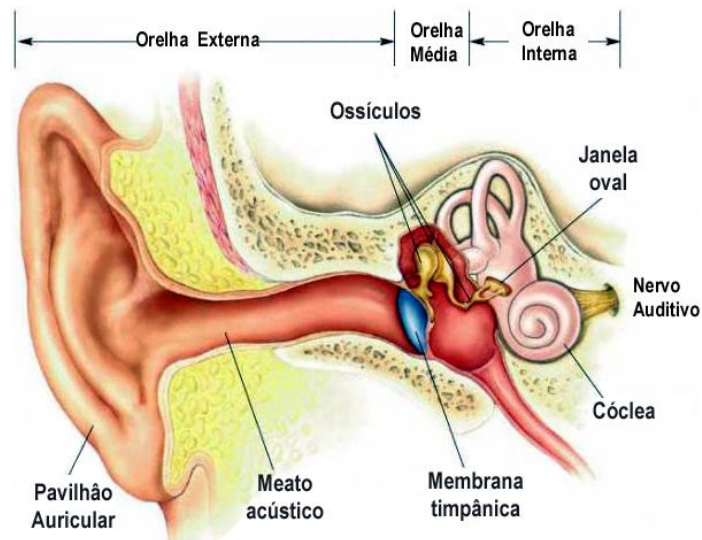


Figura 1. Esquema do sistema auditivo evidenciando as principais partes da orelha externa, média e interna.

A orelha média é composta por três ossículos articulados entre si, martelo, bigorna e estribo, que servem como um elo entre o tímpano e a janela oval da orelha interna. Os ossículos funcionam como alavancas, aumentando a força das vibrações mecânicas e por isso agindo como amplificadores das vibrações das ondas sonoras. A orelha interna é composta pela cóclea, responsável pela audição e vestibulo e canais semicirculares, que controlam o equilíbrio e orientação espacial. A cóclea é um canal ósseo-membranoso em forma de caracol, rodeado pelo osso temporal. É dividida em três compartimentos preenchidos por fluidos: as escalas média, vestibular e timpânica (Figura 2). A escala média é uma cavidade cheia de endolinfa, localizada entre a escala vestibular e timpânica, cavidades preenchidas por perilinfa. A escala média contém o órgão de Corti, que é a porção sensorial propriamente dita do sistema auditivo.

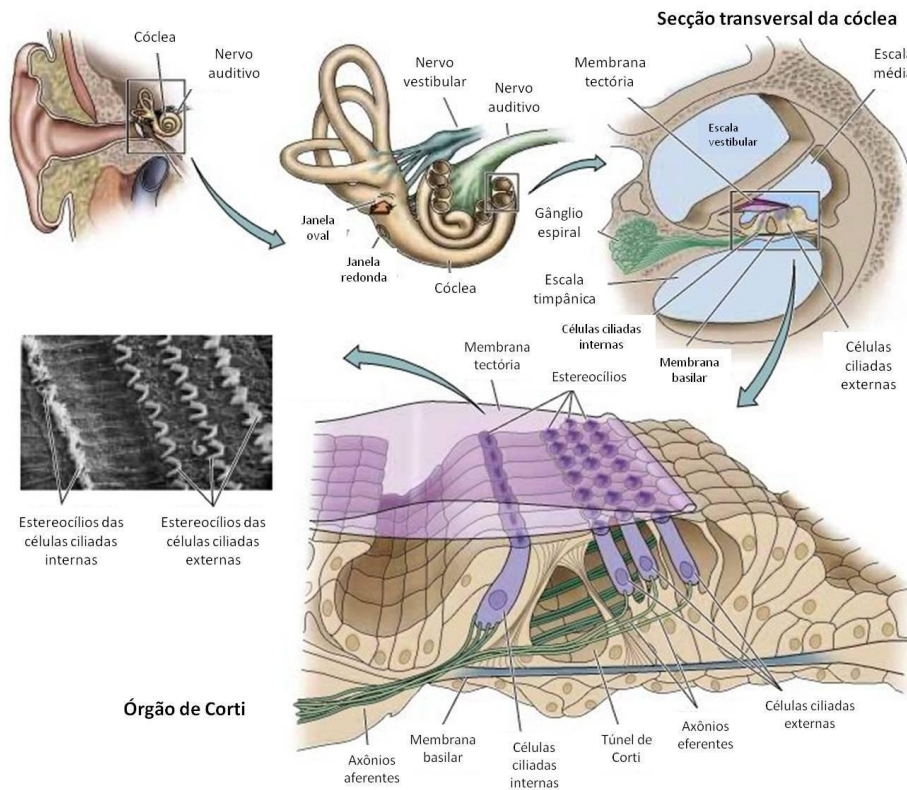


Figura 2. Ilustração esquemática da cóclea. Visualização frontal e em seção transversal. A seção transversal da cóclea mostra a escala média entre as escalas vestibular e timpânica. Em destaque esquema detalhado do órgão de Corti e micrografia dos estereocílios das células ciliadas (Adaptado de: “The inner ear”, capítulo “The Auditory System” do livro “Neuroscience”, editado por Purves e colaboradores (2001) e disponível no *NCBI Bookshelf* – <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/bookshelf/br.fcgi?book=neurosci&part=894>).

O órgão de Corti, situado na membrana basilar, é constituído por células de suporte e células sensoriais, denominadas células ciliadas. A porção apical das células ciliadas contém projeções especializadas ricas em actina, denominadas estereocílios. Uma membrana acelular, chamada membrana tectória, cobre o epitélio de células ciliadas. As células ciliadas internas são capazes de transformar a energia mecânica em impulsos elétricos, que é o princípio básico da audição.

1.2 Mecanismo da audição

O som é produzido por ondas de compressão e descompressão alternadas do ar. O pavilhão auditivo capta e canaliza as ondas para o canal auditivo e para o tímpano. Quando as ondas atingem a membrana timpânica, a pressão e descompressão alternada provoca o deslocamento do tímpano para trás e para frente. Logo, o tímpano vibra com a mesma frequência da onda. Dessa forma o tímpano transforma as vibrações sonoras em vibrações mecânicas que são transmitidas para os ossículos. A movimentação dos ossículos determina um movimento de “vaivém” de encontro com a janela oval da cóclea, transmitindo assim as ondas mecânicas para o líquido coclear. Os movimentos da janela oval são transmitidos para a escala timpânica e em seguida para a membrana de Reissner, que separa a escala vestibular da escala média, sendo então traduzidos em movimentos da endolinfa e consequentemente, da membrana tectória sobre as células sensoriais do órgão de Corti. Simultaneamente, a vibração da membrana basilar faz com que as células ciliares do órgão de Corti se agitem para frente e para trás; isso flexiona os cílios nos pontos de contato com a membrana tectórica. A flexão dos cílios excita as células sensoriais e gera impulsos nas pequenas terminações nervosas filamentosas da cóclea que enlaçam essas células. Esses impulsos são então transmitidos através do nervo coclear até os centros auditivos do tronco encefálico e córtex cerebral.

1.3 Perda Auditiva

A surdez refere-se à perda total da capacidade auditiva em uma ou nas duas orelhas. Já a deficiência ou perda auditiva, referem-se à perda parcial ou completa da capacidade de ouvir (OMS, 2009). A perda auditiva é um dos distúrbios sensoriais humanos mais comuns afetando o desenvolvimento infantil, integração social e a qualidade de vida dos indivíduos afetados com um substancial impacto na saúde pública. Ela pode se manifestar em qualquer faixa etária. Na criança, se a perda ocorre já ao nascimento ou nos primeiros anos de vida, poderá causar distúrbios ou atrasos na aquisição da linguagem, além de problemas no desenvolvimento intelectual, emocional e de aprendizado. No adulto, pode gerar isolamento, levar à depressão, a problemas no trabalho e de relacionamento.

O diagnóstico realizado durante o primeiro ano de vida da criança possibilita a intervenção médica e fonoaudiológica, permitindo um prognóstico mais favorável em relação ao seu desenvolvimento. No Brasil, de modo geral, o diagnóstico das alterações auditivas ocorre muito tardiamente, por volta dos dois ou três anos de idade, o que prejudica o prognóstico. Quanto mais precoce for a reabilitação, melhores são os resultados.

Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS, 2003), a deficiência auditiva afeta cerca de 10% da população mundial, variando segundo o grau de desenvolvimento socioeconômico e hábito local (estado nutricional, ocupação profissional, raça, cultura e grau de informação sobre prevenção). Ainda de acordo com estimativas da OMS, pelo menos 278 milhões de pessoas do mundo inteiro apresentam perda auditiva bilateral moderada ou severa. Em países desenvolvidos 1 em cada 1000 crianças nasce com perda auditiva e 60% da população acima de 60 anos de idade apresentam algum grau de perda auditiva (Dror & Avraham, 2009).

No Brasil, a frequência é estimada em 4 a cada 1000 nascimentos (Piatto & Maniglia, 2001), podendo variar, dependendo da região estudada, de 2 a 7 para cada 1000 recém-nascidos (Simões & Maciel-Guerra, 1992; Russo *et al.*, 2000). Em idosos, um estudo

transversal de base hospitalar, com 101 indivíduos acima de 65 anos participantes do Centro de Estudos do Envelhecimento – Setor de Geriatria e Gerontologia da Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP) – Escola Paulista de Medicina (EPM), foi verificada uma prevalência de perda auditiva de 63,5% (Bilton *et al*, 1997).

No Brasil, 80 a 90% das crianças com deficiência auditiva não completam o ensino fundamental e apenas 5% dos alunos com surdez profunda atingem níveis educacionais semelhantes ao das pessoas sem qualquer deficiência (Santos *et al.*, 2011).

1.3.1. Classificação das perdas auditivas

As deficiências auditivas podem ser classificadas de diferentes formas.

1.3.1.1 Quanto à localização da anomalia

- Perda auditiva condutiva: quando a anomalia afeta a orelha externa ou média, impedindo que as ondas sonoras sejam conduzidas para a orelha interna. É a menos frequente e entre as causas mais comuns estão as otites, otosclerose ou aderências (imobilização de um ou mais ossos da orelha média) e tumores na orelha média. Geralmente as alterações de surdez de condução podem ser resolvidos por tratamento médico ou cirúrgico.
- Perda auditiva sensorineural: quando a anomalia afeta a orelha interna (cóclea), o nervo auditivo, ou regiões auditivas do cérebro. É o tipo de perda mais frequente, chegando a cerca de 90% entre as crianças com déficit permanente da audição (Parving *et al.*, 1994). Entre as causas mais comuns estão: exposição a ruído de alta intensidade ou sons altos; presbiacusia (surdez pela idade), meningite, viroses (citomegalovírus, rubéola, caxumba), fatores genéticos, tumores e uso de medicamentos ototóxicos. Devido a grande diversidade etiológica da perda auditiva sensorineural, em muitos casos, é difícil estabelecer a causa da perda.
- Perda auditiva mista: quando há uma alteração na condução do som associada à lesão do órgão sensorial ou do nervo auditivo.

1.3.1.2 Quanto ao grau

Segundo classificação baseada na OMS (2006), considera-se:

- Perda auditiva leve: limiares entre 26 a 40 dB
- Perda auditiva moderada: limiares entre 41 a 60 dB
- Perda auditiva severa: limiares entre 61 a 80 dB
- Perda auditiva profunda: limiares acima de 81 dB

1.3.1.3 Quanto aos sinais clínicos

- **Sindrômica:** quando a perda auditiva é acompanhada por outros sinais clínicos como: malformações craniofaciais e cervicais, displasias esqueléticas (Osteogênese imperfeita), anomalias cutâneas (Síndrome de Waardenburg), anomalias oculares (Síndrome de Usher), entre outros. Último levantamento realizado mostrou 680 síndromes associadas à perda auditiva, com variadas frequências, tipos e graus (OMIM- *Online Mendelian Inheritance in Man*- julho 2006).
- **Não-sindrômica:** quando a perda auditiva se apresenta isoladamente, ou seja, sem associação a outros sinais clínicos. Causas infecciosas são relativamente frequentes em países em desenvolvimento, porém, a etiologia de origem genética tende a se tornar mais importante à medida que ocorra melhoria nas condições de saúde pública.

Aproximadamente 30% dos casos de perda auditiva pré-lingual, de origem genética, são síndrômicos e, 70% não-síndrômicos (Parker *et al.*, 1999).

As deficiências auditivas podem ainda ser classificadas de acordo com o início da perda auditiva, como congênita, adquirida ou tardia. Se estiver presente ao nascimento, ou antes da aquisição da linguagem, a perda auditiva pode ser pré-lingual e, quando se manifesta após a aquisição da linguagem, pós-lingual (Ito *et al.*, 2010).

1.3.2 Etiologia da perda auditiva

A perda auditiva pode ser causada por fatores ambientais ou genéticos. Dentre os fatores ambientais inclui-se a exposição frequente a ruído de alta intensidade, o uso de drogas ototóxicas, infecções, entre outros (Tabela 1). Quanto aos fatores genéticos, mutações em diferentes genes ou em elementos regulatórios que estão envolvidos no desenvolvimento adequado, na estrutura e na função da orelha podem levar a diferentes graus de perda auditiva (Dror & Avraham, 2009).

Em países desenvolvidos, 60% dos casos de surdez congênita são genéticos, 30% adquiridos e 10% de etiologia idiopática, ou seja, de causa desconhecida (Bitner-Glindzicz *M et al.*, 2002).

No Brasil, devido às condições médico-sanitárias da população, a perda auditiva causada por fatores ambientais ainda predomina, além disso, um grande número de casos (32%) é tido como idiopático (Pupo *et al.*, 2008). Estudos brasileiros relacionados a prevalência da surdez são escassos, contudo, Simões & Maciel-Guerra (1992) encontraram uma proporção de 67% dos casos estudados, com etiologia ambiental, 15% com etiologia genética e 18,5% com etiologia não esclarecida. Nóbrega e colaboradores (2005), estudaram a etiologia da perda auditiva em 442 indivíduos brasileiros e demonstraram que a rubéola é ainda uma importante causa de perda auditiva no Brasil. Acredita-se que com a melhora da atenção materno infantil e com avanços nos estudos genéticos, a proporção de causas genéticas tende a aumentar.

Tabela 1. Fatores ambientais e genéticos envolvidos na perda auditiva (Modificado de Russo, 2000).

Causas de perda auditiva		
Ambiental	Pré-Natal	Infecção materna (rubéola, citomegalovírus, sífilis, toxoplasmose, herpes)
		Uso de medicamentos ototóxicos durante a gestação
		Irradiação durante a gestação
	Peri-Natal	Pré-maturidade, Icterícia grave
		Trauma de parto
		Anóxia
	Pós-Natal	Terapia intensiva neonatal de mais de cinco dias
		Meningites, Otites
		Sarampo, Caxumba
		Exposição contínua a ruídos ou sons muito altos
Ventilação mecânica		
Traumatismos cranianos		
Genética	Sindrômico	Autossômico dominante
		Autossômico recessivo
		Ligada ao X
		Mitocondrial
	Não-Sindrômico	Autossômico dominante
		Autossômico recessivo
		Ligada ao X
		Ligada ao Y
		Mitocondrial

1.3.3. Genética da perda auditiva

O progresso das pesquisas relacionadas à perda auditiva genética tem provocado um importante avanço na identificação das causas da surdez, assim como no entendimento dos mecanismos moleculares que governam o desenvolvimento, a função, a resposta ao trauma e o envelhecimento da orelha interna. Os recentes avanços na biologia molecular e genômica tem contribuído para elucidar a complexa rede de genes envolvidos no mecanismo da audição, que é o primeiro passo para a implementação de uma terapia eficiente para a perda auditiva.

O grande número de genes expressos na cóclea reflete a complexidade dos mecanismos moleculares envolvidos neste órgão de intrincada natureza (Heller *et al.*, 1998). Até o momento já foram descritos 150 *loci* e 103 genes envolvidos com perda auditiva. Estima-se que este número possa atingir a 300 genes (1% do genoma humano), já que muitos *loci* foram mapeados, porém, os genes correspondentes ainda não foram identificados (Van Camp & Smith, 2012; Nance *et al.*, 2003; Brownstein *et al.*, 2012).

1.3.3.1 Perda auditiva sindrômica

Mais de 400 síndromes já foram descritas nas quais a surdez é uma das manifestações clínicas. As perdas auditivas sindrômicas representam cerca de 30% das perdas auditivas de origem genética e podem apresentar todos os tipos de herança. A Síndrome de Waardenburg é o tipo mais comum de perda auditiva sindrômica de herança autossômica dominante, seguida pela Síndrome de Branchio-Oto-Renal e de Stickler. Quanto à perda auditiva sindrômica de herança autossômica recessiva, a Síndrome de Usher é a mais comum, seguida pela Síndrome de Pendred e Síndrome de Jervell & Lange-Nielsen (Van Camp & Smith, 2012). A seguir estão destacadas as principais síndromes que apresentam a surdez como sinal clínico (Tabela 2).

Tabela 2. Principais síndromes que apresentam a perda auditiva como sinal clínico (Van Camp & Smith, 2012).

Síndromes	Genes	Localização	Referência Bibliográfica
Alport	<i>COL4A5</i>	Xq22	Barker <i>et al.</i> , 1990
	<i>COL4A3</i>	2q36-q37	Mochizuki <i>et al.</i> , 1994
	<i>COL4A4</i>		
Branchio-Oto-Renal	<i>EYA1</i>	8q13.3	Abdelhak <i>et al.</i> , 1997
	<i>SIX5</i>	19q13.3	
	Desconhecido	1q31	Kumar <i>et al.</i> , 2000
	<i>SIX1</i>	14q21.3-q.24.3	Ruf <i>et al.</i> , 2004
Jervell & Lange-Nielsen	<i>KCNQ1</i>	11p15.5	Neyroud <i>et al.</i> , 1997
	<i>KCNE1</i>	21q22.1-q.22.2	Schulze-Bahr <i>et al.</i> , 1997
CHARGE	<i>SEMA3E</i>	7q21.11	
	<i>CHD7</i>	19q13.3	Vissers <i>et al.</i> , 2004

Norrie	<i>NDP</i>	Xp11.3	Chen <i>et al.</i> , 1992 Berger <i>et al.</i> , 1992
Pendred	<i>SLC26A4</i>	7q21-q34	Everett <i>et al.</i> , 1997
	<i>FOXII</i>	5q35.1	Yang <i>et al.</i> , 2007
	<i>KCNJ10</i>	1q23.2	Yang <i>et al.</i> , 2009
Stickler	<i>COL2A1</i>	12q13.11-q13.2	
	<i>COL11A1</i>	1p21	Richards <i>et al.</i> , 1996
	<i>COL11A2</i>	6p21.3	Vikkula <i>et al.</i> , 1995
	<i>COL9A1</i>	6q13	Van Camp <i>et al.</i> , 2006
	<i>COL9A2</i>	1p34.2	Baker <i>et al.</i> , 2011
Treacher Collins	<i>TCOF1</i>	5q32-q33.1	Dixon <i>et al.</i> , 1996
Waardenburg	<i>PAX3</i>	2q35	Tassabehji <i>et al.</i> , 1992
	<i>MITF</i>	3p14.1-p13.3	Tassabehji <i>et al.</i> , 1994
	Desconhecido	1p21-p13.3	
	Desconhecido	8p23	
	<i>SNAI2</i>	8q11	Sanchez-Martin <i>et al.</i> , 2002
	<i>PAX3</i>	2q35	
	<i>EDNRB</i>	13q22	Attie <i>et al.</i> , 1995
	<i>EDN3</i>	20q13.2-q13.3	
	<i>SOX10</i>	22q13	Pingault <i>et al.</i> , 1998
Usher	<i>MYO7A</i>	11q13.5	Weil <i>et al.</i> , 1995
	<i>USH1C</i>	11p15.1	Verpy <i>et al.</i> , 2000 Bitner-Glindzicz <i>et al.</i> , 2000
	<i>CDH23</i>	10q22.1	Wayne <i>et al.</i> , 1996 Bork <i>et al.</i> , 2001 Bolz <i>et al.</i> , 2001
	Desconhecido	21q21	Chaib <i>et al.</i> , 1997
	<i>PCDH15</i>	10q21-22	Ahmed <i>et al.</i> , 2001 Alagramam <i>et al.</i> , 2001
	<i>SANS</i>	17q24-25	Mustapha <i>et al.</i> , 2002 Weil <i>et al.</i> , 2003
	Desconhecido	15q22-23	
	<i>USH2A</i>	1q41	Kimberling <i>et al.</i> , 1990 Eudy <i>et al.</i> , 1998
	Desconhecido	3p23-24.2	Hmani <i>et al.</i> , 1999
	<i>VLGR1</i>	5q14.3-q21.3	Pieke-Dahl <i>et al.</i> , 2000 Weston <i>et al.</i> , 2004
	<i>WHRN</i>	9q32	Ebermann <i>et al.</i> , 2007
	<i>USH3A</i>	3q21-q25	Sankila <i>et al.</i> , 1995 Joensuu <i>et al.</i> , 2001
	<i>PDZD7</i>	10q24.31	Ebermann <i>et al.</i> , 2010

1.3.3.2 Perda auditiva não-sindrômica

A perda auditiva não-sindrômica é, na sua maioria, monogênica e representa 70% dos casos de surdez genética. O diagnóstico etiológico nem sempre é fácil de ser estabelecido em função de sua grande heterogeneidade.

Uma nomenclatura padronizada e classificação comum têm sido usadas para *loci* e genes envolvidos com perda auditiva (HUGO Gene Nomenclature Committee, <http://www.genenames.org/>). Os diferentes *loci* da surdez não-sindrômica são designados como *DFN* proveniente do inglês *deafness*, acrescida das letras A ou B, significando forma de transmissão autossômica dominante (DFNA) e recessiva (DFNB), respectivamente. Quando se denomina DFNX trata-se de surdez de transmissão ligada ao cromossomo X. Os números que acompanham essas nomenclaturas são dados sequencialmente de acordo com a ordem cronológica de descoberta da doença.

Em relação aos mecanismos de herança, estima-se que aproximadamente 75 a 80% dos casos de surdez genética não-sindrômica sejam de herança autossômica recessiva, 20 a 25% autossômica dominante e cerca de 1 a 2% ligada ao cromossomo X. Além disso, a frequência da herança mitocondrial é estimada em 1% (Kokotas *et al.*, 2007; Hilgert *et al.*, 2009b). A Tabela 3 lista 64 genes já descritos relacionados à surdez não-sindrômica. Ela está dividida de acordo com o modo de herança: autossômico recessivo, autossômico dominante, ligado ao cromossomo X e mitocondrial. Para cada gene é mencionado o *locus* e a função de seus produtos no processo da audição.

Tabela 3. Genes associados à perda auditiva não-sindrômica (Modificado de Hilgert *et al.*, 2009); Baseado em Van Camp & Smith. Hereditary Hearing Loss Homepage. Disponível em <<http://hereditaryhearingloss.org>>).

Herança autossômica recessiva ou dominante		
Gene	Locus	Função do produto na audição
<i>GJB2</i>	DFNB1/DFNA3A	Homeostase iônica
<i>TMCI</i>	DFNB7/11/DFNA36	Desconhecida
<i>TECTA</i>	DFNB21/DFNA8/12	Proteína da matriz extracelular
<i>MYO7A</i>	DFNB2/DFNA11	Proteína motora dos estereocílios
<i>GJB6</i>	DFNB1/DFNA3B	Homeostase iônica

<i>MYO6</i>	DFNB37/DFNA22	Proteína motora dos estereocílios
<i>GJB3</i>	-/DFNA2B	Homeostase iônica
<i>COL11A2</i>	DFNB53/DFNA13	Proteína da matriz extracelular
Herança autossômica recessiva		
Gene	Locus	Função do produto na audição
<i>SLC26A4</i>	DFNB4	Homeostase iônica
<i>MYO15A</i>	DFNB3	Proteína motora dos estereocílios
<i>OTOF</i>	DFNB9	Exocitose nas vesículas sinápticas das células ciliadas internas
<i>CDH23</i>	DFNB12	Proteína de adesão dos estereocílios
<i>TMPRSS3</i>	DFNB8/10	Desconhecida
<i>TRIOBP</i>	DFNB28	Formação do citoesqueleto dos estereocílios
<i>TMIE</i>	DFNB6	Desconhecida
<i>PJVK</i>	DFNB59	Sinalização de células ciliadas e neurônios
<i>ESPN</i>	DFNB36	Formação do citoesqueleto dos estereocílios
<i>PCDH15</i>	DFNB23	Proteína de adesão dos estereocílios
<i>ESRRB</i>	DFNB35	Fator de transcrição
<i>MARVELD2</i>	DFNB49	Homeostase iônica
<i>LHFPL5</i>	DFNB66/67	Proteína de adesão dos estereocílios
<i>STRC</i>	DFNB16	Proteína da matriz extracelular
<i>CLDN14</i>	DFNB29	Homeostase iônica
<i>RDX</i>	DFNB24	Formação do citoesqueleto dos estereocílios
<i>MYO3A</i>	DFNB30	Proteína motora dos estereocílios
<i>SLC26A5</i>	DFNB61	Motor molecular de células ciliadas externas
<i>WHRN</i>	DFNB31	Proteína do arcabouço protéico dos estereocílios
<i>USH1C</i>	DFNB18	Proteína do arcabouço protéico dos estereocílios
<i>OTOA</i>	DFNB22	Proteína da matriz extracelular
<i>GRXCR1</i>	DFNB25	Desconhecida
<i>LOXHD1</i>	DFNB77	Feixe de estereocílios
<i>TPRN</i>	DFNB79	Feixe de estereocílios
<i>GPSM2</i>	DFNB82	Proteína transmembrânica
<i>PTPRQ</i>	DFNB84	Sinalização celular
<i>HGF</i>	DFNB39	Sinalização celular
<i>LRTOMT</i>	DFNB63	Desconhecida
<i>MSRB3</i>	DFNB74	Óxido-redução mitocondrial
<i>SERPINB6</i>	DFNB91	Inibidor de protease intracelular
<i>ILDRI</i>	DFNB42	Desconhecida
<i>GIPC3</i>	DFNB15/72/95	Feixe de estereocílios
Herança autossômica dominante		
Gene	Locus	Função do produto na audição
<i>WFS1</i>	DFNA6/14/38	Homeostase iônica
<i>KCNQ4</i>	DFNA2A	Homeostase iônica
<i>COCH</i>	DFNA9	Proteína da matriz extracelular
<i>MYO1A</i>	DFNA48	Desconhecida
<i>ACTG1</i>	DFNA20/26	Formação do citoesqueleto dos estereocílios

<i>EYA4</i>	DFNA10	Fator de transcrição
<i>MYH14</i>	DFNA4	Desconhecida
<i>DFNA5</i>	DFNA5	Desconhecida
<i>POU4F3</i>	DFNA15	Fator de transcrição
<i>CRYM</i>	-	Homeostase iônica
<i>TFCP2L3</i>	DFNA28	Fator de transcrição
<i>MYH9</i>	DFNA17	Proteína motora dos estereocílios
<i>CCDC50</i>	DFNA44	Formação do citoesqueleto dos estereocílios
<i>DIAPH1</i>	DFNA1	Formação do citoesqueleto dos estereocílios
<i>MIR-96</i>	DFNA50	Regulação da expressão gênica
<i>TJP2</i>	DFNA51	Manutenção de diferença de potencial elétrico
<i>SMAC/DIABLO</i>	DFNA64	Indução de apoptose
Herança ligada ao X		
Gene	Locus	Função do produto na audição
<i>POU3F4</i>	DFNX2	Fator de transcrição
<i>PRPS1</i>	DFNX1	Metabolismo de purina e biossíntese de nucleotídeos
<i>SMPX</i>	DFNX3	Desconhecida
Herança mitocondrial		
Gene	Locus	Função do produto na audição
<i>12S rRNA</i>	MT-RNR1	RNA ribossômico mitocondrial
<i>tRNA^{Ser}(UCN)</i>	MT-TS1	RNA transportador mitocondrial
<i>tRNA^{His}</i>	MT-TH	RNA transportador mitocondrial
<i>tRNA^{Glu}</i>	MT-TE	RNA transportador mitocondrial

Cerca de 50% dos casos de perda auditiva não-sindrômica autossômica recessiva podem ser atribuídos à alterações no locus DFNB1, causada por mutações nos genes *GJB2* que codifica a proteína conexina 26 e *GJB6* que codifica a proteína conexina 30.

1.3.3.3 Genes de conexinas

As conexinas (Cx) são proteínas transmembrânicas envolvidas nas *gap junctions* ou junções comunicantes. Elas compartilham uma homologia comum, apresentando quatro domínios α -hélice transmembrânicos, domínios citoplasmáticos que incluem as extremidades aminoterminal e carboxiterminal, a alça entre o segundo e o terceiro domínio transmembrânico, e duas alças extracelulares (Beyer *et al.*, 1993). A Figura 3 mostra um esquema que representa a estrutura das conexinas.

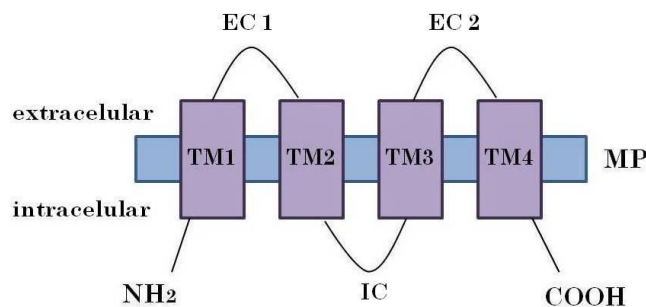


Figura 3. Representação esquemática da estrutura das conexinas, demonstrando os domínios transmembrânicos (TM1-TM4), extremidades aminoterminal (NH₂) e carboxiterminal (COOH), alça intracitoplasmática (IC) e alças extracelulares (EC1 e EC2) (Baseado em: Rabionet *et al.*, 2002).

A primeira conexina foi clonada em 1986 (Kumar & Gilula, 1986; Paul, 1986). Em termos evolucionários, as conexinas podem ser classificadas em pelo menos três subclasses – α , β ou γ – de acordo com o peso molecular ou homologia. Entretanto, a nomenclatura correntemente utilizada faz referência ao tamanho da proteína predita (em kDa) a partir da sequência do cDNA considerado, precedida do termo genérico Cx (Beyer *et al.*, 1993).

Seis moléculas de conexinas formam um hemicanal chamado conexon (Rabionet *et al.*, 2002). Em 2009, Maeda e colaboradores reportaram a análise cristalográfica do canal intercelular formado por Cx26 (Figura 4A e B). O estudo computacional estrutural pode contribuir para o conhecimento do efeito das mutações na estrutura e na função da proteína (Bicego *et al.*, 2006).

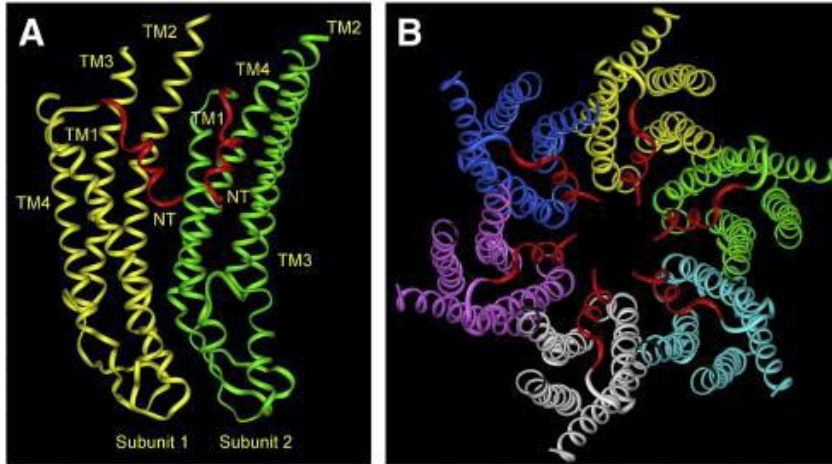


Figura 4. Estrutura cristalográfica do conexon (PDB ID 2ZW3). A= Representação de duas subunidades de conexas adjacentes, ilustradas em amarelo e verde, com os domínios amino terminais (NT) indicados em vermelho, e os quatro domínios transmembrânicos (TM1-TM4) identificados; B= Representação de seis subunidades de conexas, ilustradas em diferentes cores, com seus domínios NT em vermelho, formando um hemicanal (Retirado de: Beyer *et al.*, 2011).

Os conexons de células adjacentes se unem covalentemente para formar os canais intercelulares que constituem as *gap junctions*. Os conexons podem ser compostos por conexas de somente um tipo, chamados homoméricos, ou de diferentes tipos, conhecidos como heteroméricos. Da mesma forma, os canais intercelulares podem ser homotípicos ou heterotípicos (Hilgert *et al.*, 2009b) (Figura 5).

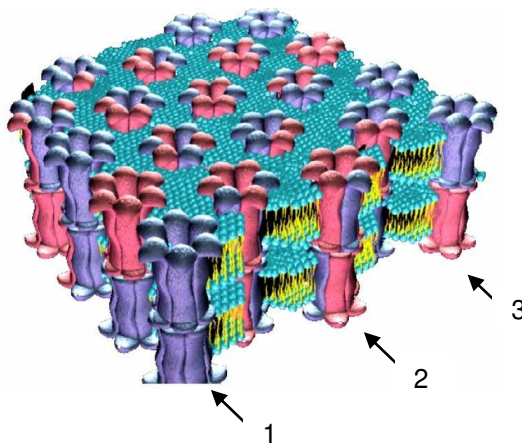


Figura 5. Esquema mostrando diferentes tipos de canais intercelulares. A seta 1 exemplifica um canal homomérico e homotípico. A seta 2 exemplifica um canal heteromérico e heterotípico. A seta 3 exemplifica um canal homomérico e heterotípico. Modificado de Korkiamäki, 2002.

As comunicações intercelulares, mediadas pelas junções comunicantes, permitem a passagem direta de íons e pequenas moléculas entre o citoplasma das células e são fundamentais para homeostase dos tecidos, crescimento e diferenciação celulares (Willecke *et al.*, 2002).

Com a evolução dos estudos do genoma humano, pelo menos 21 conexinas já foram identificadas. Algumas apresentam maior expressão em determinadas células ou tecidos do que outras. Na epiderme e em seus anexos, nos epitélios da orelha interna e da córnea e em outros epitélios derivados do ectoderma, encontram-se cerca de dez conexinas diferentes, que são expressas durante o mesmo período de desenvolvimento embrionário e diferenciação epitelial. Contudo, embora duas ou mais conexinas possam ser co-expressas na mesma célula nem sempre a perda da função de uma conexina alterada é compensada por outro membro da família.

As conexinas são expressas na cóclea, entre as células de suporte das células sensoriais ciliadas, formando um caminho para reciclagem dos íons potássio (K^+) durante a transdução auditiva (Figura 6). Quando os íons potássio entram nas células ciliadas em resposta a estímulos acústicos, ocorre uma onda de despolarização que causa o influxo de íons cálcio e a liberação de neurotransmissores. O acoplamento elétrico facilita a homeostase, em parte, pelo transporte de íons potássio através das *gap junctions* e canais de potássio (Couloigner *et al.*, 2006). Os íons potássio se difundem, passivamente, pelas células de sustentação, pelos fibrócitos do ligamento espiral até a estria vascular e pelos fibrócitos do limbo espiral para as células interdentais, chegando à endolinfa através dos conexons (Alberts *et al.*, 1998) Além disso, essas junções também estão envolvidas no acoplamento metabólico (Beltramello *et al.*, 2005).

Mudanças ocorridas no sistema *gap junction* podem interferir na reciclagem de potássio durante a transdução auditiva ou ainda, na troca de outros íons e pequenas moléculas. Essas alterações resultam em perda de função das células ciliadas e distúrbio do potencial elétrico endococlear ou na sobrevivência das células sensoriais do epitélio coclear levando a perda auditiva sensorioneural (Kikuchi *et al.*, 1995).

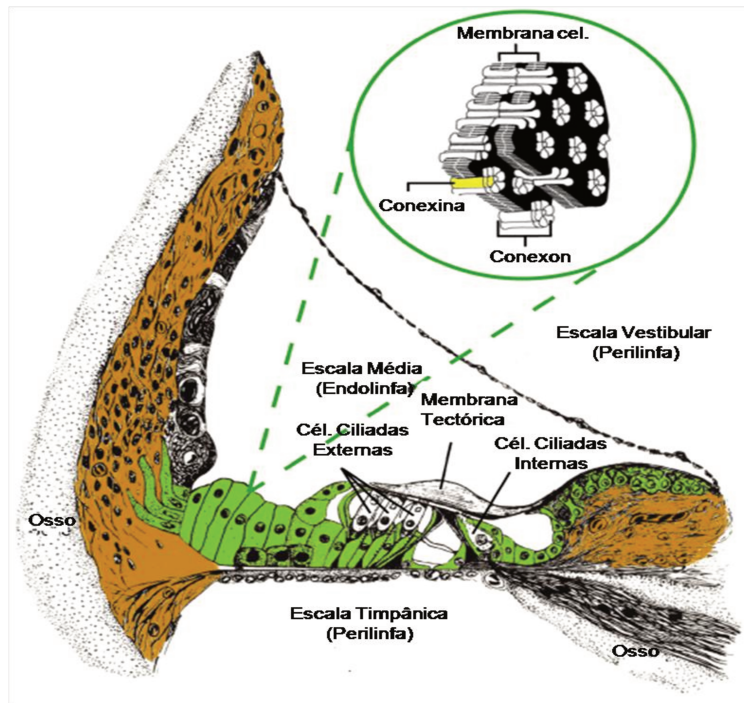


Figura 6. Desenho esquemático mostrando regiões de expressão da Cx26 na orelha interna. A Cx26 é expressa nas células epiteliais (células não-sensoriais do limbo espiral, interior e exterior das células sensoriais do sulco, células de suporte e células do ligamento espiral) mostradas em verde, e no sistema de células de tecido conjuntivo (fibrócitos do ligamento espiral e limbo espiral, células basais e intermediárias da estria vascular) representado em marrom. Seis conexinas (amarelo) se ligam para formar um conexon. Conexons de células vizinhas se unem formando os canais intercelulares. (Modificado de: Smith, 2005; Hildebrand, 2008)

Mutações em genes de conexinas representam a principal causa de perda auditiva de origem genética. Podem determinar a perda apresentando um padrão de herança autossômico recessivo (*GJB2* e *GJB3*) ou autossômico dominante (*GJB2*, *GJB3* e *GJB6*). Além disso, mutações nesses genes são responsáveis tanto por perda auditiva exibindo formas síndrômicas (*GJB2*, queratoderma palmoplantar; *GJB3*, eritrodermia *variabilis*), quanto não-síndrômicas (*GJB2*, *GJB3* e *GJB6*) (Rabionet *et al.*, 2000).

1.3.3.3.1 Gene *GJB2*

Em 1997 foi isolado e clonado o gene *GJB2* que codifica a proteína conexina 26 (Kelsell *et al.*, 1997), sem dúvida essa descoberta representou um grande avanço no diagnóstico molecular da surdez e mudou as perspectivas do aconselhamento genético das famílias afetadas.

O gene *GJB2* foi o primeiro gene nuclear relacionado com perda auditiva sensorineural não-sindrômica de padrão autossômico recessivo. Está localizado no cromossomo 13q11-q12, no *locus* DFNB1. Possui somente dois éxons, um éxon 5' não codificante, e um codificante de aproximadamente 682 nucleotídeos, que gera uma proteína com 226 aminoácidos (*GenBank*, número de acesso: M86849).

Cerca de 310 mutações já foram descritas no gene *GJB2*, das quais algumas são bastante frequentes e outras são raras (Krawczak & Cooper. Human Gene Mutation Database. Disponível em: <www.hgmd.org>). Esse gene está envolvido em 80% dos casos de surdez de herança autossômica recessiva, contudo, mutações no gene da conexina 26 também podem determinar perda auditiva com padrão dominante de herança (Denoyelle *et al.*, 1997). Acredita-se que mutações no gene da conexina 26 sejam responsáveis por 20% de todas as perdas auditivas sensorineurais (Wilcox *et al.*, 2000).

A principal mutação é a c.35delG que trata-se da simples deleção de uma Guanina (G) em uma série de 6 Guaninas, que se estendem da posição 30 à posição 35 do gene *GJB2*. Essa deleção leva à alteração no quadro de leitura de aminoácidos (*frameshift*). Nesse caso, a glicina é convertida para valina no códon 12 e um códon prematuro de terminação (*stop* códon) é formado no códon 13. A mutação ocasiona, portanto, a síntese de um polipeptídeo incompleto, com 12 aminoácidos, ao invés do polipeptídeo normal, com 226 aminoácidos (Cohn *et al.*, 1999; Zelante *et al.*, 1997; Denoyelle *et al.*, 1997). A mutação c.35delG apresenta padrão de herança autossômico recessivo e está envolvida em 70% dos casos de perda auditiva com herança autossômica recessiva (Snoeckx *et al.*, 2005).

De acordo com Van Laer e colaboradores (2003), a mutação c.35delG

provavelmente surgiu na população do norte da Europa, há cerca de 500 gerações ou, aproximadamente, há 10.000 anos. Essa mutação existiu na população caucasóide por algum tempo e depois se propagou por todas as outras populações, alcançando níveis altos de portadores, contudo sua incidência difere significativamente entre populações europeias.

A mutação c.35delG em heterozigose pode ser encontrada em até 4% dos indivíduos em algumas populações (Gasparini *et al.*, 2000). A frequência dos alelos mutados no gene *GJB2* que causam surdez autossômica recessiva na população geral é de aproximadamente 1 em 33, em alguns países europeus (Van Camp & Smith, 2012).

A pesquisa da mutação c.35delG em 620 recém-nascidos de uma cidade do interior do estado de São Paulo revelou a presença de 6 heterozigotos, o que permitiu estimar uma frequência de aproximadamente 1:100 (Sartorato *et al.*, 2000). Estudos posteriores mostraram que entre 100 brasileiros caucasóides dois eram heterozigotos (2%), entre brasileiros de descendência africana a frequência foi de 1%, em brasileiros de origem asiática, a mutação não foi encontrada (Oliveira *et al.*, 2004). Em 2007, Oliveira e colaboradores rastrearam a mutação c.35delG em recém nascidos de 10 cidades brasileiras, de diferentes regiões, encontrando uma frequência média de heterozigotos de 1:74.

Pacientes homozigotos para c.35delG geralmente apresentam uma perda auditiva pré-lingual, não progressiva, prevalentemente severa a profunda, contudo o grau de perda pode variar entre os grupos estudados e até mesmo dentro de famílias afetadas (Denoyelle *et al.*, 1999; Santos *et al.*, 2005). Essa variabilidade sugere que outros fatores possam modificar os efeitos da mutação, possivelmente variações em outros genes de conexinas que compensariam a inatividade da conexina 26 na cóclea (Steel, 1999). Essas prováveis modificações dos efeitos da mutação poderiam também explicar o encontro de indivíduos surdos, que são monoalélicos para mutações no gene *GJB2*, com herança comprovadamente autossômica recessiva.

Tendo em vista a importância e o envolvimento desse gene na deficiência auditiva, mutações no gene *GJB2* constituem o primeiro passo na triagem de mutações relacionadas à perda auditiva.

1.3.3.3.1.1 Outras mutações no gene *GJB2*

Como já mencionado, mais de 300 mutações diferentes têm sido descritas no gene *GJB2*. No entanto, as frequências dessas mutações variam de acordo com a população estudada (Tang *et al.*, 2006). Em populações não caucasóides outras mutações são predominantes, como o caso da alta frequência da mutação 167delT entre judeus Ashkenazitas e 235delC em asiáticos, ambas deleções também causam *frameshift* e geram proteínas não funcionais (Zelante *et al.*, 1997; Kemperman *et al.*, 2002).

A maioria das mutações recessivas no gene *GJB2* ocorre na região codificante do gene, poucos estudos das regiões não codificantes têm sido relatados. A mutação c. IVS1+1G>A no íntron, também chamada -3170 G para A, foi inicialmente detectada por Denoyelle e colaboradores (1999) e tem sido encontrada em várias populações onde é investigada.

Essa mutação consiste na troca da guanina do sítio de *splicing* doador do íntron 1 para uma adenina (Figura 7). Shahin e colaboradores (2002), estudando o efeito da mutação na transcrição do gene, demonstraram que esta troca causa uma alteração no mecanismo de *splicing* levando a um RNA mensageiro não detectável. A mutação IVS1+1G>A é encontrada mais frequentemente em heterozigotos compostos com a mutação c.35delG, causando surdez pré-lingual severa a profunda.

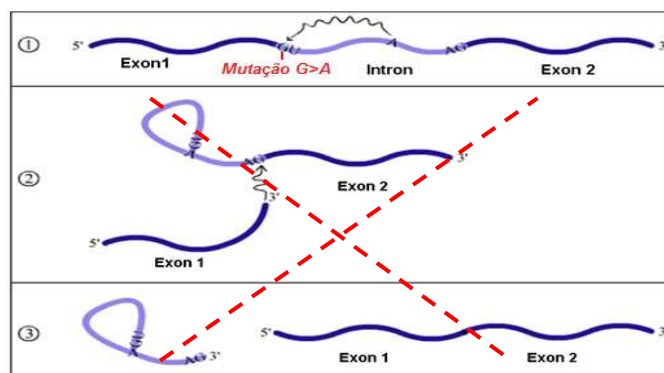


Figura 7. Esquema indicando o sítio onde ocorre a mutação IVS1+1G>A no gene *GJB2*. A mutação impede o mecanismo normal de *splicing*.

1.3.3.3.1.2 Indivíduos monoalélicos para mutações na Conexina 26

Uma das maiores dificuldades com relação ao diagnóstico molecular e aconselhamento genético de indivíduos portadores de mutações no gene da conexina 26, deve-se ao fato de que em aproximadamente 10 a 40% dos casos, mutações patogênicas nesse gene, com padrão de herança autossômico recessivo, são detectadas em apenas um dos alelos. Nesses casos, ao estudar o outro alelo do gene *GJB2*, nenhuma mutação é encontrada na região codificante.

Várias hipóteses foram formuladas para explicar a surdez associada às mutações em somente um dos alelos: (1) existência de mutações em regiões não codificantes do gene *GJB2*, afetando sua expressão; (2) mutações em outros genes (incluindo genes da família das conexinas) interagindo com o alelo normal do gene *GJB2* e, portanto, resultando no fenótipo deficiente. É possível, também, que haja interação entre genes nucleares e/ou mitocondriais, suprimindo a expressão do alelo normal (Wilcox *et al.*, 2000); (3) relação casual, e não causal, da mutação no gene *GJB2*, que não estaria, portanto, relacionado à surdez nesses casos.

Em 2002, um grupo espanhol (Del Castillo *et al.*, 2002) pôde explicar o fenótipo de surdez de parte desses casos, pois encontraram uma deleção próxima ao gene *GJB2*, envolvendo o gene vizinho, *GJB6*, segregando com a perda auditiva em diversas famílias.

1.3.3.3.2 Gene *GJB6*

O gene *GJB6* (GenBank 10804, OMIM 604418) codifica a proteína Cx30 e está localizado no loco DFNB1, a 35 kb do gene *GJB2* em direção ao telômero. Possui 3 éxons codificantes e gera uma proteína de 261 aminoácidos.

Dentre os indivíduos surdos portadores de mutações no gene *GJB2*, aproximadamente 10 a 40% apresentam a alteração em apenas um dos alelos (Wilcox *et al.*,

2000). Desta forma, pesquisadores espanhóis buscaram justificativas em outro gene, da Cx30 (*GJB6*), encontrando duas deleções situadas no cromossomo 13, que se estendiam da região proximal do gene *GJB2* ao gene *GJB6*. Essas deleções foram denominadas del(*GJB6-D13S1830*) e del(*GJB6-D13S1854*), e referem-se à perda de 342 kb e 232 kb, respectivamente (Del Castillo *et al.*, 2002; Del Castillo *et al.*, 2005).

Na Espanha, em indivíduos heterozigotos para o gene da Cx26, 50% dos casos apresentam a del(*GJB6-D13S1830*) e 25% apresentam a del (*GJB6-D13S1854*). No Brasil, um estudo multicêntrico em colaboração com o grupo espanhol, revelou que a del(*GJB6-D13S1830*) foi encontrada em 25,5% dos pacientes heterozigotos para mutações no gene *GJB2*, e a del(*GJB6-D13S1854*) em 6,3%. A porcentagem encontrada no Reino Unido foi de 22,2% e no norte da Itália, 1,9%. Essas deleções não foram encontradas em heterozigotos da França, Bélgica, Israel, Palestina, Estados Unidos e Austrália. Esses dados comprovam a complexidade da epidemiologia genética de perda auditiva não-sindrômica (Del Castillo *et al.*, 2003; Del Castillo *et al.*, 2005). Concordante com esses dados são os resultados do estudo realizado em pacientes com perda auditiva sensorioneural não-sindrômica, em São José do Rio Preto, no qual se determinou a prevalência de 12,12% de heterozigotos para a mutação c.35delG e, dentre estes, foi encontrada a prevalência de 25% para a mutação del(*GJB6-D13S1830*) (Piatto *et al.*, 2004).

A estrutura genômica do gene *GJB6* é muito mais complexa do que em outras conexinas, apresentando éxons 5' não codificantes, que podem sofrer *splicing* de diversas maneiras. Desse modo, vários estudos têm sido realizados para esclarecer a interação entre os dois genes, e algumas hipóteses vêm sendo desenvolvidas. Uma delas explica essa interação como um padrão complexo de herança digênica, determinado pela atuação conjunta dos genes, já que os dois tipos de conexina são expressos nas mesmas estruturas da orelha interna (Lautermann *et al.*, 1998). Supõe-se que a perda da Cx26 ou da Cx30 possa levar à redução do número de hemicanais heterotípicos ou alterar a taxa entre conexons homoméricos e heteroméricos, formados pelas Cx26 e Cx30 (Xia *et al.*, 2001; Forge *et al.*, 2002). Esses canais, com isoformas de conexina 26 e 30, apresentaram

sinalização intercelular catiônica duas vezes mais rápida que a efetuada por canais homotípicos (Sun *et al.*, 2005).

Outra hipótese seria, a inativação do gene *GJB2* pela deleção de hipotéticos elementos regulatórios desse gene presentes nas regiões deletadas do gene *GJB6*. Trabalhos envolvendo ensaios imunohistoquímicos e análises de bioinformática de possíveis elementos regulatórios corroboram com essa teoria (Common *et al.*, 2005; Snoeckx *et al.*, 2005).

Duas outras grandes deleções já foram descritas envolvendo os genes *GJB2* e *GJB6*. Em 2006 Wilch e colaboradores descreveram uma terceira deleção, del (CHR13:19,837,344-19,968698), segregando com perda auditiva sensorineural não-sindrômica profunda bilateral, em quatro membros heterozigotos para a mutação c.35delG de uma família alemã. A deleção determina a perda de 131,4 kb cujo o ponto de quebra fica a mais de 100 kb *upstream* do sítio de início da transcrição dos genes *GJB2* e *GJB6*. Esta deleção resultou na redução da expressão de ambos os genes. Uma hipótese sugerida para explicar tal evento seria a perda de um elemento *cis* regulador não conhecido que controlaria a co-expressão dos dois genes.

A seguir, em 2009, Feldman e colaboradores identificaram uma deleção de aproximadamente 920Kb removendo tanto o gene *GJB2* como o gene *GJB6*. Essa deleção foi observada em um indivíduo heterozigoto para a mutação V84M no gene *GJB2* que apresentava surdez profunda pré-lingual. Interessantemente, no estudo molecular, essa deleção causou uma falsa homozigosidade para essa mutação, no indivíduo afetado.

Essas duas últimas deleções no *locus* DFNB1 ainda não foram encontradas em indivíduos surdos brasileiros. No íntron 2 do gene *GJB6* existe uma sequência *Alu* que parece contribuir para a ocorrência de deleções devido a recombinação homóloga com outras repetições ao longo do *locus* DFNB1 (Del Castillo *et al.*, 2005). Recombinações *Alu/Alu* causam deleções e são um mecanismo comum nos organismos (Deininger *et al.*, 1999).

O grande número de deleções encontradas no *locus* DFNB1 e o fato de que essas alterações não são frequentes na população brasileira, já que, uma porcentagem significativa de indivíduos heterozigotos para mutações no gene da Cx26 não possui nenhuma dessas grandes deleções, indicam a necessidade da investigação de novos rearranjos nesse *locus* que possam justificar a surdez nos nossos casos. A figura 8 abaixo mostra a localização das deleções na região DFNB1.

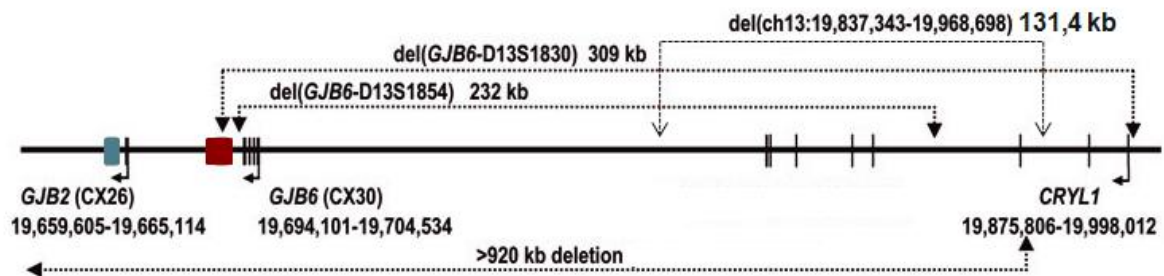


Figura 8. Apresentação esquemática das posições das deleções já descritas no *locus* DFNB1. (Modificado de Wilch, 2006)

1.3.3.4 Gene *SLC26A4*

O gene *SLC26A4* (GanBank 5172) tem sido apontado como o segundo gene mais envolvido na surdez sensorioneural não-sindrômica (Wu *et al.*, 2010). Está localizado no cromossomo 7q22.3-q31.1, possui 21 éxons, sendo 20 codificantes. Este gene codifica uma proteína denominada pendrina composta de 780 aminoácidos. A proteína pendrina possui 12 domínios transmembrânicos com amino-terminal e carboxi-terminal localizados dentro do citosol (Royaux *et al.*, 2000), como mostra a figura 9.

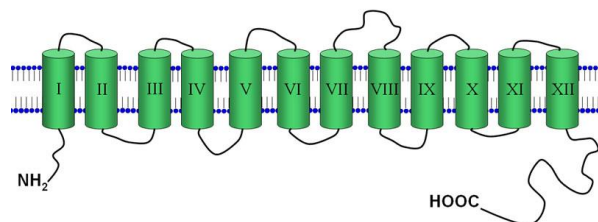


Figura 9. Esquema da estrutura secundária da proteína pendrina (Modificado de Czarnocka *et al.*, 2011).

A proteína pendrina é transportadora de ânions como iodeto, formiato, nitrato e bicarbonato (Scott *et al.*, 1999), sendo abundantemente expressa na tireóide, orelha interna e rim (Everett *et al.*, 1999).

Mutações no gene *SLC26A4* podem estar envolvidas nos casos de surdez não-sindrômica associada com aqueduto vestibular alargado (DFNB4), ou nos casos de Síndrome de Pendred. A síndrome de Pendred é a forma mais comum de surdez sindrômica e geralmente está associada a malformação da orelha interna. A prevalência da síndrome de Pendred é estimada em 4 a 10% dos indivíduos com perda auditiva congênita. Nos casos de pacientes que apresentam esta síndrome, a perda auditiva é tipicamente bilateral, severa a profunda e pré-lingual. Porém, já foram descritos casos em que os pacientes apresentam perda auditiva progressiva e/ou pós-lingual.

Extensivos estudos revelaram que a perda da secreção de bicarbonato na endolinfa, mediada pela pendrina, leva a acidificação do fluido e inibe a atividade de canais sensíveis a pH, TRPV5 e TRPV6, resultando no aumento da concentração do íon cálcio no meio. TRPV5 e TRPV6 (*Transient Receptor Potential types 5 and 6*) são receptores transientes de canais, expressos no sistema vestibular e desempenham um papel importante no transporte de Ca²⁺. A baixa concentração de Ca²⁺ na endolinfa na orelha interna é necessária para a audição normal e equilíbrio (Nakaya *et al.*, 2006).

A malformação da orelha interna nos indivíduos que apresentam síndrome de Pendred pode variar do alargamento do aqueduto vestibular à displasia de Mondini. O aqueduto vestibular é um canal ósseo estreito. Através deste canal ósseo existe um tubo denominado ducto endolinfático que conecta a orelha interna a uma estrutura em forma de

balão, denominada saco endolinfático. Sabe-se que tanto o ducto quanto o saco endolinfático são preenchidos por um fluido denominado endolinfa. Sua composição iônica é fundamental para a transdução mecanoelétrica que ocorre na orelha interna, sendo, portanto, fundamental para o funcionamento normal da audição. O aqueduto vestibular é considerado alargado se apresentar diâmetro maior que 1,5 milímetros, o que chamamos de EVA, do inglês *enlarged vestibular aqueduct*. O aqueduto alargado resulta no aumento de tamanho do ducto e saco endolinfático (Figura 10 a e b). Acredita-se então que a composição iônica da endolinfa seja alterada, interferindo no bom funcionamento da audição.

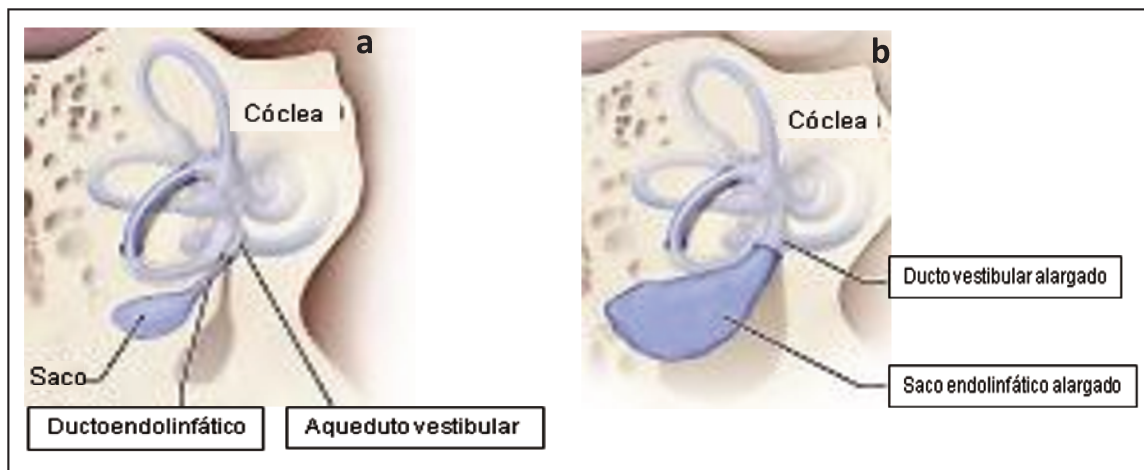


Figura 10. Diagrama da (a) orelha interna normal e (b) aqueduto vestibular alargado <http://www.nidcd.nih.gov/health/hearing/pages/eva.aspx>.

Outra malformação da orelha interna associada a síndrome de pendred é a displasia de Mondini. Neste caso há malformação da cóclea. Em um indivíduo normal, a cóclea possui 2 voltas e meia. Porém, na displasia de Mondini, a cóclea pode apresentar 2 voltas, 1 volta e meia, 1 volta ou mesmo nenhuma, resultando na alteração funcional da cóclea, levando o indivíduo à perda auditiva.

O alargamento do aqueduto vestibular e a displasia de Mondini podem ser diagnosticados por Tomografia Computadorizada dos ossos temporais. Na presença dessas alterações associadas com perda auditiva progressiva, testes genéticos são indicados.

Mais de 200 alterações já foram descritas no gene *SLC26A4*. Uma grande porcentagem de indivíduos com Síndrome de Pendred ou surdez não-sindrômica apresentam mutações recessivas em apenas um alelo sugerindo que a associação de fatores ambientais ou genéticos pode contribuir para a expressão do fenótipo (Pryor *et al.*, 2005). De fato, Yang e colaboradores (2007) identificaram no promotor *SLC26A4* um elemento chave na regulação da transcrição que se liga ao gene *FOXII*, um ativador transcricional de *SLC26A*. Nesse estudo foi demonstrado que a associação de mutações nesse elemento regulador e mutações no *FOXII* (duplo heterozigoto) podem causar síndrome de Pendred ou perda auditiva não-sindrômica. Esse achado indica que nem sempre a síndrome de Pendred ou a perda auditiva DFNB4 apresentam uma herança Mendeliana simples.

1.3.3.5 Gene *CDH23*

Mutações no gene *CDH23* são responsáveis por causar tanto Síndrome de Usher tipo 1 (USH1D) quanto perda auditiva não-sindrômica (DFNB12) (Bolz *et al.*, 2001; Bork *et al.*, 2001). A síndrome Usher se caracteriza por surdez congênita bilateral, seguida por um início mais tardio da perda de visão, causada pela retinite pigmentosa.

O gene *CDH23* está localizado no cromossomo 10 (10q21-q22), possui 69 éxons e codifica a proteína Caderina 23. Esta proteína é composta por 3354 aminoácidos com 27 domínios extracelulares, um único domínio transmembrânico e um domínio citoplasmático. Pertence à família de proteínas transmembrânicas dependentes de íons Ca^{2+} , com mais de 20 membros diferentes.

A Caderina 23 é expressa nas células ciliadas da cóclea, fazendo parte da estrutura molecular das junções intercelulares de adesão denominadas *tip links*, localizadas na região superior dos estereocílios (Figura 11a e b). Essa estrutura promove firme adesão entre as células, mantendo assim, o arranjo dos estereocílios e a polarização da membrana plasmática, sendo dependente também, das junções de oclusão (proteína claudina-14) e do citoesqueleto.

A conexão *tip link* une a extremidade de um estereocílio ao vizinho mais alto

(Figura 11b e c). Próxima a base do *tip link* existe um canal iônico de transdução (Figura 11d). No repouso este canal fica fechado a maior parte do tempo. Se o feixe é defletido, o que ocorre quando as ondas sonoras atingem a orelha interna, cada estereocílio desliza sobre o vizinho, fazendo com que o *tip link* seja esticado, abrindo o canal de transdução e permitindo o influxo de cálcio e principalmente potássio, despolarizando assim a membrana celular e levando a transdução mecânico-elétrica do som. As proteínas miosina 1c (*myo1c*) e protocaderina 15 (*pcdh15*) também fazem parte do aparato necessário para a transdução (Figura 11d).

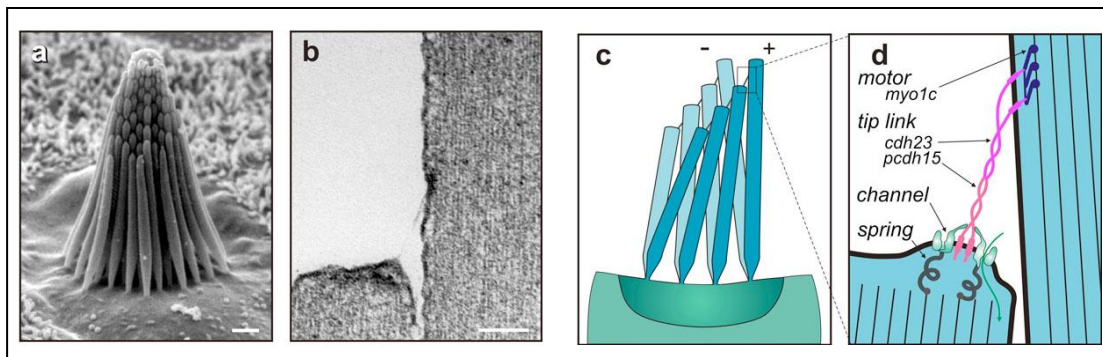


Figura 11. Micrografia dos estereocílios das células ciliadas da cóclea. a- Feixe de estereocílios. b- Destaque para o *tip link* (Strassmaier *et al.*, 2002). c- Esquema mostrando a deflexão em conjunto dos estereocílios. d- Devido a tensão dos *tip links*, canais iônicos na extremidade inferior são abertos. Os *tip links* estão ligados aos núcleos de actina dos estereocílios por proteínas *Myo1c* na sua extremidade superior e pelos canais de transdução na extremidade inferior. (Modificado de Corey, 2009).

Mutações no gene *CDH23* foram detectadas em famílias com DFNB12, que apresentavam deficiência auditiva pré-lingual de grau profundo (Bolz *et al.*, 2001). Mais de 50 mutações já foram associadas a USH1D e 24 associadas a surdez não-sindrômica (Miyagawa, *et al.*, 2012). Segundo estudos correlacionando genótipo-fenótipo, a síndrome de USH1D é geralmente causada por mutações *nonsense*. Por outro lado, a perda auditiva não-sindrômica está associada com mutações *missense* (Ahmed *et al.*, 2003). As mutações *nonsense* resultam de alterações pontuais do DNA que convertem um códon que codifica para um aminoácido, em *stop* códon, levando a uma proteína truncada e, portanto, sem função. As mutações *missense* ocorrem por substituição de uma base nucleotídica o que vai

fazer com que o códon resultante codifique um aminoácido diferente. As consequências patogênicas deste tipo de mutação pontual podem ser graves ou moderadas, dependendo da intensidade com que afeta a atividade funcional da proteína que o gene codifica. Portanto, o tipo de mutação pode ter um papel crucial na expressão fenotípica.

1.3.3.6 MicroRNAs - *Cluster miR-183*

Além dos genes codificadores de proteínas, os genes reguladores de expressão desempenham um importante papel no mecanismo da audição. Entre esses genes estão os microRNAs.

MicroRNAs (miRNA) são uma classe de pequenos RNAs não-codificantes, com comprimento de 18-24 nucleotídeos, que são processados a partir de transcritos de genes endógenos. Eles estão envolvidos em diversos processos fisiológicos, de desenvolvimento, e patológicos, através da regulação da expressão de RNAs alvo mensageiro (mRNA).

A primeira molécula de miRNA foi descoberta em 1993 em *C. elegans* (Lee *et al.*, 1993), chamada *lin-4*. Na ocasião, acreditava-se que era uma anormalidade. Entretanto, quase uma década depois, no ano de 2000, foi descoberta a segunda molécula, *let-7*, no mesmo organismo (Reinhart *et al.*, 2000). Desde então houve um rápido avanço no estudo dessas pequenas estruturas, mas a sua função específica em mamíferos permanece ainda desconhecida. Sabe-se que genes de miRNAs constituem aproximadamente 1% do transcriptoma e regulam a produção de proteína de 10% ou mais genes humanos. Já foram relatados 1.600 precursores humanos e 2042 microRNAs maduros até agosto de 2012 (<http://microrna.sanger.ac.uk/sequences/>). Os miRNAs são expressos diferentemente nos diversos estágios de desenvolvimento, tipos celulares e tecidos (Bartel *et al.*, 2004).

O papel funcional de um miRNA depende da identidade do seu mRNAs alvo. Geralmente eles se ligam em regiões 3'UTR mas também podem parear em regiões 5'UTRs (Lee *et al.*, 1993). Durante a interação mRNA / miRNA, emparelhamento de bases

ocorre entre o mRNA e a região *seed* do miRNA, que consiste em 7 ou 8 nucleótidos da sequência do miRNA, responsável pelo reconhecimento do mRNA alvo. O mecanismo de regulação negativa da expressão do mRNA depende do grau de complementaridade entre miRNA e seus mRNAs alvo. Quando ocorre um pareamento perfeito ou próximo ao perfeito, a via de interferência de RNA (RNAi) é ativada, resultando na clivagem do mRNA alvo por ribonucleases associadas ao complexo RISC, mecanismo este comumente encontrado em plantas. Apesar de esta atuação ter sido descrita em mamíferos, a maioria dos miRNAs encontrados em animais atua por um segundo mecanismo que não envolve a degradação do mRNA alvo (Matinez et al., 2002). Assim, os miRNAs regulam a expressão gênica por pareamento imperfeito com a região 3'UTR, resultando na inibição da tradução. O pareamento imperfeito possibilita que um único miRNA regule a expressão de vários mRNA alvos diferentes e ainda que, diferentes miRNAs controlem cooperativamente a expressão de um único mRNA alvo, configurando assim uma complexa rede regulatória exercida pelos miRNAs.

Centenas de miRNAs se expressam na orelha interna. As pesquisas de microRNAs na orelha interna revelaram que a expressão de vários miRNAs é tecido ou tipo celular específico, e que está correlacionada com o estágio de diferenciação celular (Figura 12). Muitos desses estudos tem focado principalmente na expressão do *cluster miR-183*, composto pelos *miRNAs- 96, 183, 182*.

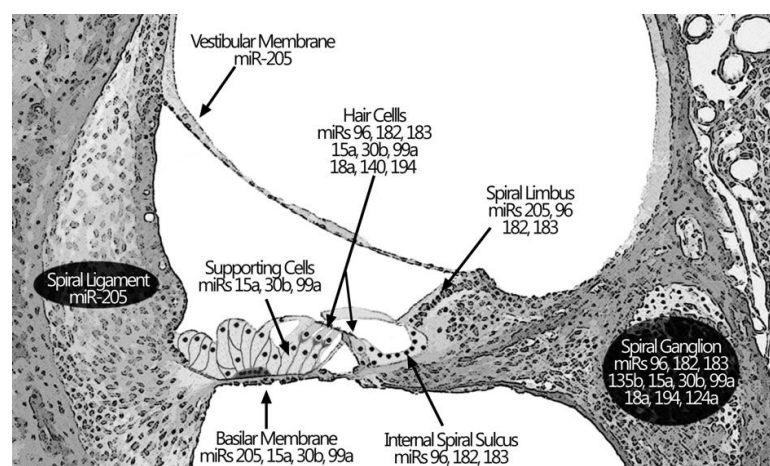


Figura 12. Esquema da estrutura coclear indicando a localização dos *miRNAs* em camundongos (Patel et al., 2012).

Este *cluster* tem expressão específica em células sensorineurais, está localizado no cromossomo 7q32.2 em humanos e são originados de um pri-miRNA policistrônico. A hipótese de que esse *cluster* de mi-RNA possui um importante papel nos órgãos sensoriais é comprovada pela análise de predição de mRNAs alvo, os quais incluem genes importantes nas funções de vários órgãos sensoriais, tais como, *PAX6*, *MITF*, *GJB2*, entre outros (Xu et al., 2007).

O papel funcional de *miR-96*, membro do *cluster miR-183* foi documentado em um modelo de rato mutante com uma mutação de ponto (15 A>T) na região *seed* desse miRNA (Figura 13a) (Kuhn et al, 2011; Lewis et al., 2009). Este mutante submetido à mutagênese induzida pela N-etil-N-nitrosurea (ENU), apresentava perda auditiva progressiva em heterozigotos e perda auditiva completa em homozigotos. Uma suspensão no desenvolvimento ocorre em homozigotos com morfologias anormais em feixes de estereocílios no 4º e 5º dia após o nascimento. Nos heterozigotos, em 4 a 6 semanas, os ratos mutantes exibem degeneração das células ciliadas externas. Estes estudos forneceram evidência adicional para determinar o envolvimento do *miR-96* no desenvolvimento de estruturas do ouvido interno e, contribuiu para o entendimento dos efeitos de mutações encontradas nesse miRNA em humanos, descrita por Mencía e colaboradores (2009) (Figura 13b e c).

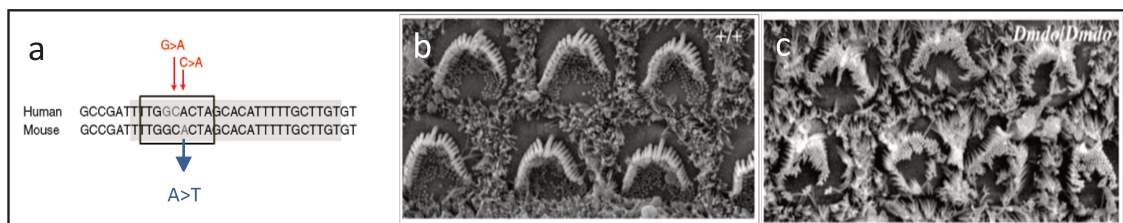


Figura 13. Alterações encontradas no *miR-96* e nas células ciliadas da cóclea. a- Sequência da região seed, destaque para as duas mutações (vermelho) encontradas segregando com surdez em duas famílias (Mencia, et al., 2009) e a mutação identificada em camundongo mutante (azul). b- Microscopia eletrônica de varredura de células ciliadas sensoriais de camundongo normal. c- Células ciliadas sensoriais de camundongo mutante homozigoto (Diminuendo).

Estes pesquisadores identificaram, em uma família espanhola com perda auditiva não-sindrômica (DFNA50) pós-lingual progressiva, uma mutação no *miR-96* (13 G> A), na

região conservada da sequência *seed* do *miR-96* maduro, segregando com a deficiência auditiva nessa família. Outra mutação na região *seed* do *miR-96* (14 C> A) foi encontrada em uma família espanhola com perda auditiva progressiva de herança autossômica dominante. O fato de que em ambas famílias a perda auditiva foi pós-lingual, sugere que o *miR-96* pode ter um papel regulador na manutenção da expressão do gene, requerida para a função normal. Notavelmente, este é o primeiro estudo que mostra uma substituição de nucleótidos na região *seed* de um miRNA, que é responsável por uma doença humana de herança mendeliana.

1.3.3.7 Genes Mitocondriais

As deficiências auditivas causadas por mutações no DNA mitocondrial (mtDNA) correspondem de 0,5% a 1% de todas as deficiências auditivas de origem genética. A mitocôndria é uma organela citoplasmática encontrada em todas as células dos mamíferos, tem a função de transformar a energia química dos metabólitos encontrados no citoplasma em energia facilmente acessível à célula. Esta energia é acumulada principalmente em componentes como o trifosfato de adenosina (ATP), que será utilizado quando a célula necessitar de energia para trabalho osmótico, mecânico, elétrico ou químico. O mtDNA é uma molécula circular, semi-autônoma, composta por 16.569 pares de bases e 37 genes que codificam 13 RNA-mensageiros (mRNA), 2 RNA-ribossômicos (rRNA) e 22 RNA-transportadores (tRNA). As mutações do mtDNA são transmitidas pela linhagem materna, mas podem ocorrer mutações espontâneas. Cada célula contém de 2 a 100 mitocôndrias, que tendem a se acumular em locais do citoplasma onde existe intensa atividade metabólica, como o pólo apical das células ciliadas. Os órgãos que requerem grande quantidade de energia são mais comumente acometidos em casos de mutações do mtDNA, como células nervosas, musculares, endócrinas, ópticas e auditivas. Como a cóclea é grande consumidora de energia, uma mutação no mtDNA de células ciliadas causa deficiência auditiva do tipo sensorineural, bilateral, simétrica e progressiva.

O fenótipo, ou expressão clínica da mutação mitocondrial vai depender da quantidade de mtDNA mutante existente na célula, situação conhecida como heteroplasmia, que pode levar a evidente variabilidade na gravidade do fenótipo dentro da mesma família. Fatores genéticos e ambientais podem também modular o fenótipo.

A primeira alteração genética associada à perda auditiva hereditária não-sindrômica foi descrita em 1993 e era uma mutação mitocondrial (Fishel-Ghodsian *et al.*, 1993). Desde então, várias alterações no mtDNA foram identificadas, associadas tanto à surdez síndrômica quanto não-sindrômica (Finsterer & Fellingner, 2005).

Mutações mitocondriais podem ser herdadas ou adquiridas. O MITOMAP (<http://www.mitomap.org>) é um banco de dados do genoma mitocondrial humano, criada recentemente, que dá uma visão geral da maioria das mutações identificadas até o momento.

Algumas mutações são associadas à perda auditiva não-sindrômica, estando envolvidas em pelo menos 1% das crianças com surdez pré-lingual e em pelo menos 5% dos casos pós-linguais em caucasianos (Kokotas *et al.*, 2007). O gene *MTRNR1*, que codifica a subunidade 12S do RNA ribossômico (rRNA), e o *MTTS1*, que codifica RNAs transportadores de serina (tRNA^{Ser}(UCN)), são os principais genes associados à perda auditiva não-sindrômica de herança mitocondrial. Ambos são importantes para a síntese de proteínas mitocondriais (Kokotas *et al.*, 2007).

A patogenicidade de quatro mutações mitocondriais tem sido claramente estabelecida e relacionada à perda auditiva não-sindrômica, m.1555A>G (Prezant *et al.*, 1993), m.1494C>T (Zhao *et al.*, 2005), m.7511T>C (Sue *et al.*, 1999) e m.7445A>G (Hyslop *et al.*, 1997). A primeira a ser associada à surdez não-sindrômica foi a m.1555A>G no gene *MTRNR1*, descrita em uma grande família árabe-israelense. Trata-se da substituição de uma adenina por uma guanina na posição 1555 do gene (Prezant *et al.*, 1993). Essa mutação também está associada à susceptibilidade à perda auditiva induzida por aminoglicosídeos, devido à semelhança entre a subunidade 12S rRNA humano que apresenta a mutação e seu homólogo, a subunidade 16S do rRNA bacteriano, o alvo destes

antibióticos (Prezant *et al.*, 1993; Lu *et al.*, 2010). A frequência da m.1555A>G foi estimada em 2% na população brasileira (Abreu-Silva *et al.*, 2006).

1.4 Justificativa

Apesar do grande avanço no estudo genético da surdez, o diagnóstico molecular da perda auditiva ainda é um grande desafio. Isso se deve a vários fatores, como a grande heterogeneidade genética, a grande heterogeneidade clínica, já que, na maioria das vezes, não é possível através do fenótipo prever o gene envolvido, e ainda devido a limitações tecnológicas. Até o momento, não há técnicas que permitam o rastreamento simultâneo de várias mutações em tantos genes de forma rápida e com baixo custo. Além disso, a alta prevalência de mutações recessivas, levando a um significativo número de heterozigotos surdos, causa grande dificuldade na determinação da etiologia molecular e, por consequência, complicam o aconselhamento genético.

Devido à grande complexidade do mecanismo da audição há um grande número de genes envolvidos e, por sua vez, muitas mutações que podem levar à perda auditiva. Contudo, apenas alguns genes e um pequeno número de mutações são investigados na rotina diagnóstica molecular, e assim, uma grande quantidade de indivíduos permanece com a etiologia genética indefinida.

Já há algum tempo, nosso grupo tem trabalhado na tentativa de esclarecer o diagnóstico molecular de um maior número possível de indivíduos com perda auditiva (anexos 1 e 2). Dessa forma, o presente estudo, que abrangeu um grande número de genes e mutações investigadas, teve o intuito de indicar quais genes ou quais mutações podem ser incluídos na rotina diagnóstica, com o objetivo de diminuir os casos sem etiologia definida, principalmente no grupo de heterozigotos, além de, identificar novas alterações que podem estar envolvidas na causa da perda auditiva desses pacientes.

OBJETIVOS

Geral

O principal objetivo desse trabalho foi o estudo molecular em indivíduos surdos com diagnóstico genético indefinido após o rastreamento das mutações mais comuns associadas à perda auditiva.

Específicos

- I** - Rastreamento de mutações no *cluster miR-183*.
- II** - Determinação de alterações moleculares no *locus DFNB1* em indivíduos surdos com mutações em apenas um alelo nos genes *GJB2* ou *GJB6*.
- III** - Rastreamento de mutações em diferentes genes envolvidos na surdez.

METODOLOGIA

3.1 Casuística

De acordo com as normas regulamentadoras de pesquisa em seres humanos, resolução 196/96 do Ministério da Saúde, este projeto foi aprovado, em forma de adendo (Anexo 3), pelo Comitê de Ética da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP.

Fizeram parte desse estudo pacientes com perda auditiva sensorineural não-sindrômica atendidos em ambulatórios de Otorrinolaringologia do Hospital de Clínicas da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), do Hospital de Anomalias Craniofaciais de Bauru (HACF), do Centro de Pesquisas e Estudo em Reabilitação Prof. Dr. Gabriel Porto (CEPRE) e de ambulatórios de outras regiões do Brasil. Todos os pacientes foram avaliados clinicamente a fim de excluir a influência de fatores ambientais na etiologia da perda auditiva assim como também foram submetidos a exames físicos e audiológicos que comprovaram a perda auditiva sensorineural não-sindrômica.

Posteriormente, foram coletadas amostras de sangue de cada paciente e encaminhadas diretamente ao Laboratório de Genética Molecular Humana do Centro de Biologia Molecular e Engenharia Genética (CBMEG), da UNICAMP, onde foram realizados os exames genéticos.

Todas as amostras foram inicialmente analisadas quanto à presença de mutações mais frequentemente investigadas na rotina do diagnóstico genético da surdez não-sindrômica, sendo elas: mutação c.35delG, mutação intrônica IVS1+1G>A e outras mutações na região codificante do gene *GJB2*; deleções del(*GJB6*-D13S1830) e del(*GJB6*-D13S1854) no gene *GJB6*; e a mutação mitocondrial m.A1555G. O fluxograma de análises e as técnicas utilizadas são mostrados no esquema abaixo (Figura 14).

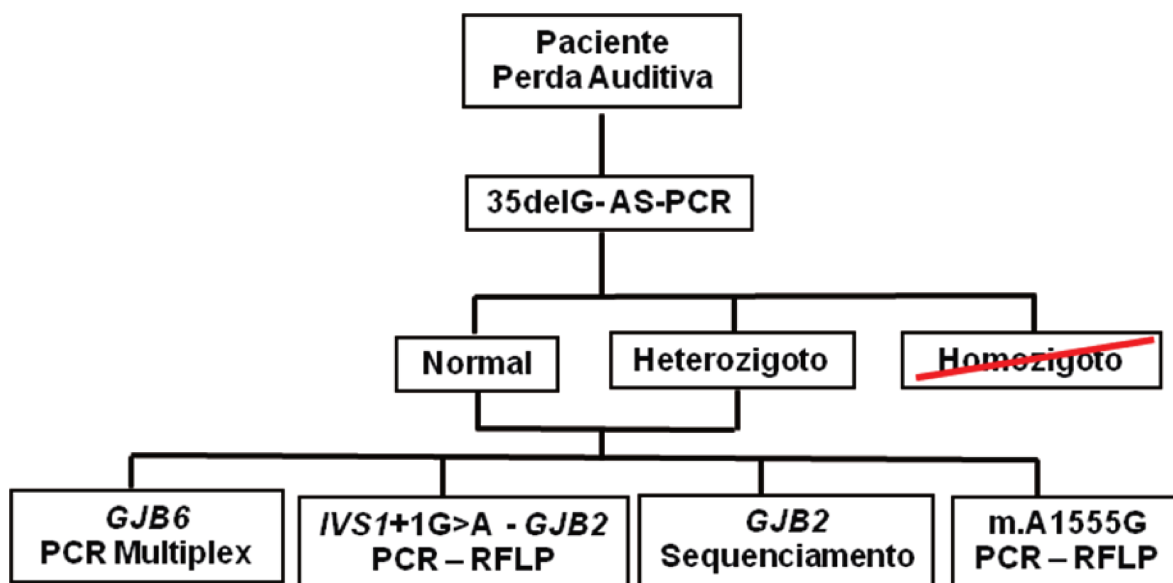


Figura 14. Fluxograma mostrando a estratégia de estudo utilizada nas amostras de DNA de pacientes com perda auditiva não-sindrômica. As técnicas utilizadas na primeira triagem são: AS-PCR (PCR alelo-específico), PCR multiplex, PCR-RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*), Sequenciamento (Método de Sanger). As amostras positivas em homozigose para a mutação 35delG foram excluídas da casuística.

Após essa primeira triagem, alguns indivíduos permaneciam com a etiologia genética não esclarecida. Entre eles, alguns apresentavam mutações recessivas em apenas um alelo (heterozigotos), não justificando, portanto, o fenótipo.

Desta forma, fizeram parte desse estudo 48 indivíduos que após a triagem das mutações mais comuns, apresentaram mutações recessivas nos genes *GJB2* ou *GJB6* em heterozigose, mas que, no entanto, continuavam com diagnóstico molecular indefinido (Tabela 4).

Tabela 4. Resultados obtidos no rastreamento de mutações nos genes *GJB2*, *GJB6* e *MT-RNR1* em 48 indivíduos selecionados.

INDIVÍDUO	IDENTIFICAÇÃO	GENE <i>GJB2</i>	DELEÇÕES ENVOLVENDO GENE <i>GJB6</i>		GENE <i>MT-RNR1</i>
			Del(<i>GJB6</i> -D13S1830)	Del(<i>GJB6</i> -D13S1854)	m.A1555G
1	1B	c.35delG/N	Normal	Normal	Normal
2	16B	c.35delG/N	Normal	Normal	Normal
3	54B	c.35delG/N	Normal	Normal	Normal
4	71B	c.35delG/N	Normal	Normal	Normal
5	103B	c.35delG/N	Normal	Normal	Normal
6	27E	c.35delG/N	Normal	Normal	Normal
7	58E	c.35delG/N	Normal	Normal	Normal
8	146C	c.35delG/N	Normal	Normal	Normal
9	29L	c.35delG/N	Normal	Normal	Normal
10	219Oto	c.35delG/N	Normal	Normal	Normal
11	232Oto	c.35delG/N	Normal	Normal	Normal
12	257Oto	c.35delG/N	Normal	Normal	Normal
13	261Oto	c.35delG/N	Normal	Normal	Normal
14	275Oto	c.35delG/N	Normal	Normal	Normal
15	276Oto	c.35delG/N	Normal	Normal	Normal
16	391Oto	IVS1+1G>A/N	Normal	Normal	Normal
17	396Oto	c.35delG/N	Normal	Normal	Normal
18	449Oto	c.35delG/N	Normal	Normal	Normal
19	503Oto	c.35delG/N	Normal	Normal	Normal
20	508Oto	c.35delG/N	Normal	Normal	Normal
21	509Oto	c.35delG/N	Normal	Normal	Normal
22	539Oto	c.35delG/N	Normal	Normal	Normal
23	571Oto	c.35delG/N	Normal	Normal	Normal
24	574Oto	c.35delG/N	Normal	Normal	Normal
25	578Oto	c.35delG/N	Normal	Normal	Normal
26	628Oto	Normal	Normal	Hetero	Normal
27	660Oto	c.35delG/N	Normal	Normal	Normal
28	683Oto	c.35delG/N	Normal	Normal	Normal
29	39I	c.35delG/N	Normal	Normal	Normal
30	56I	c.35delG/N	Normal	Normal	Normal
31	118I	c.35delG/N	Normal	Normal	Normal
32	119I	c.35delG/N	Normal	Normal	Normal
33	23PM	c.35delG/N	Normal	Normal	Normal
34	56PM	c.35delG/N	Normal	Normal	Normal
35	72 PM	K168R/N	Normal	Normal	Normal
36	74PM	c.35delG/N	Normal	Normal	Normal
37	90 PM	c.35delG/N	Normal	Normal	Normal
38	113PM	c.35delG/N	Normal	Normal	Normal
39	138PM	c.35delG/N	Normal	Normal	Normal
40	69A	K168R/N	Normal	Normal	Normal
41	87A	K168R/N	Normal	Normal	Normal
42	92A	E147K	Normal	Normal	Normal
43	72Ex	c.35delG/N	Normal	Normal	Normal

44	1A.	V37I/N	Normal	Normal	Normal
45	01 Unif	c.35delG/N	Normal	Normal	Normal
46	03 Unif	Normal	Normal	Hetero	Normal
47	08 Unif	c.35delG/N	Normal	Normal	Normal
48	17 Unif	c.35delG/N	Normal	Normal	Normal

Nessas amostras foram investigadas: possíveis alterações como pequenas deleções ou duplicações no *locus* DFNB1, onde já foram descritas várias deleções; um grande número de mutações em diferentes genes nucleares, incluindo mutações em microRNAs e ainda, mutações mitocondriais (Figura 15).

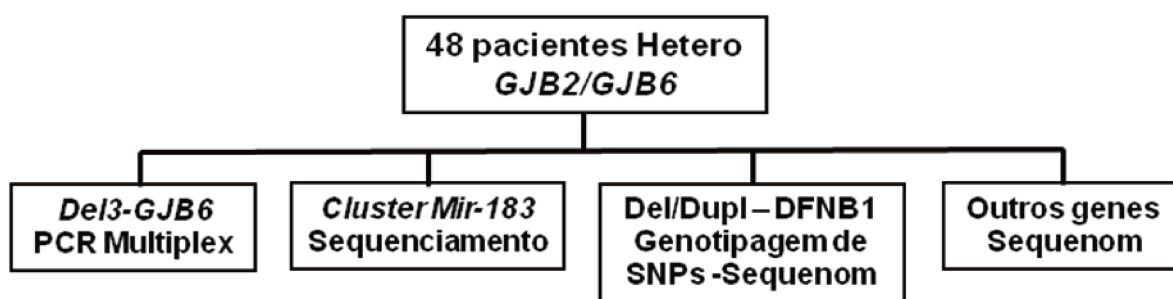


Figura 15. Fluxograma mostrando a estratégia de estudo das amostras de DNA de pacientes com perda auditiva não-sindrômica com mutações recessivas no gene *GJB2* ou *GJB6* em apenas um alelo.

3.2 Métodos

3.2.1. Extração do DNA genômico de sangue periférico

A extração do DNA genômico foi realizada a partir de leucócitos obtidos em 10 a 15mL de sangue periférico, coletado em tubos *Vacutainer* contendo 10% do anticoagulante EDTA (ácido etilenodiamino tetra-acético dissódico 2H₂O 0,5 M pH 8,0). Foi empregado o

método de extração com fenol e clorofórmio, padronizado no Laboratório de Genética Molecular Humana do CBMEG, descrito a seguir:

Inicialmente, para lise das hemácias, foi adicionada a Solução A (Triton-X 100 a 1%; MgCl₂ 5 mM; Sacarose 0,32 M; Tris-HCl 10 mM pH 8,0) ao sangue coletado, até atingir o volume de 50 mL. Após ser homogeneizado, o material foi mantido em gelo por 30 min. Posteriormente, foi centrifugado a 2000 rpm por 15 min a 4°C. O sobrenadante foi então descartado e o precipitado (*pellet*) foi ressuspensão em 35 mL de Solução A. Esta última operação foi repetida até a obtenção de um *pellet* branco, livre de hemácias. Posteriormente, foi adicionado 1 mL da solução B 1X (Na₂EDTA 20 mM; NaCl 20 mM; Tris-HCl 20 mM pH 8,0) e 250 µL de solução C (para 1 mL de solução C: 0,5mL de solução B 1X, 1 mg de Proteinase K [Boehringer Mannheim GmbH, Mannheim, Alemanha] e 0,5 mL de SDS 10%). O material foi incubado em banho-maria a 56 °C por aproximadamente 2 h, ou em alguns casos, a 37 °C por 18h.

Após esse período de incubação, foi iniciada a etapa de purificação do DNA genômico com fenol-clorofórmio que permite a remoção de peptídeos e proteínas de soluções aquosas. Foi então adicionado 1 mL de TE 1X (Tris-HCl 10 mM, pH 8,0; EDTA 1 mM) e quantidade suficiente de fenol saturado com Tris-HCl 10 mM pH 8,0 até dobrar o volume da amostra. Foi realizada a homogeneização por inversão lenta dos tubos durante 5 min, e para a separação e recuperação da fase aquosa (sobrenadante) o tubo foi centrifugado a 2.500 rpm por 15 min à temperatura ambiente. O precipitado foi descartado e o sobrenadante foi passado para outro tubo. O procedimento foi repetido por duas vezes, primeiro substituindo o fenol por uma solução de fenol:clorofórmio:álcool isoamílico (25:24:1; v:v:v) e por último com uma solução clorofórmio:álcool isoamílico (24:1; v:v).

Para a precipitação do DNA, foi acrescentado 0,1 do volume da amostra de acetato de sódio 3 M pH 5,5 e 2,5 volumes de etanol absoluto gelado. O DNA precipitado foi recuperado com auxílio de uma haste plástica esterilizada e lavado com etanol 70%, para a retirada do excesso de sal, antes de ser ressuspensão em um volume de 200 µL de TE 1X. As amostras de DNA foram mantidas a 4°C.

3.2.2. Triagem de mutações nos principais genes envolvidos na Surdez

3.2.2.1 Rastreamento da mutação c.35delG no gene *GJB2*

A mutação c.35delG no gene *GJB2* foi rastreada pela técnica de PCR alelo-específico. Os *primers* normal (NOR) e mutante (MUT) foram utilizados, em reações diferentes, para amplificar os alelos sem e com a mutação, respectivamente. O *primer* comum (COM) foi usado como *primer* reverso. Com essas duas reações (NOR e MUT) é possível identificar cada indivíduo como sendo homozigoto normal, homozigoto mutante ou heterozigoto para a mutação c.35delG. Os *primers* A e B foram usados como controles internos de amplificação para as reações. Esta técnica foi desenvolvida no Laboratório de Genética Molecular Humana do CBMEG, a qual se encontra patenteada (Patente N° P10005340-6; Método de teste para surdez de origem genética – UNICAMP, 2002).

3.2.2.2. Rastreamento de mutações no gene *GJB2* por sequenciamento automático

3.2.2.2.1 Amplificação do gene *GJB2*

O éxon codificante do gene *GJB2*, com 681 pb, foi dividido para a amplificação pela técnica de PCR, de acordo com as condições previamente descritas por Kelsell *et al.* (1997) e Denoyelle *et al.* (1997). As sequências dos *primers* e o tamanho dos fragmentos resultantes são mostrados na Tabela 5.

Tabela 5. Sequências dos *primers* utilizados para a amplificação do gene *GJB2* e tamanho dos fragmentos gerados.

PAR	PRIMERS 5' →3'	TAMANHO (pb)
1	Cx1F – CTC CCT GTT CTG TCC TAG Cx1R – GAC ACG AAG ATC AGC TGC	284
2	Cx2F – GCT ACG ATC ACT ACT TCC C Cx2R – GGT TGC CTC ATC CCT C	520

Para um volume de 50 μ L de reação, foram utilizados: 200 a 500 ng de DNA genômico, 200 μ M de cada desoxinucleotídeo trifosfato (dATP, dCTP, dGTP e dTTP), 20 pmol de cada *primer* (direto e reverso), 2,5 U da enzima *Taq* DNA polimerase em tampão de PCR 10X (Tris-HCl 10mM pH 8,8), 25 mM de MgCl₂, completando com água até o volume final.

As amplificações foram realizadas em aparelho termociclador Veriti® 96-Well Thermal Cycler (Applied Biosystems), sendo realizados 30 ciclos de aquecimento a 94°C para a desnaturação do DNA, seguido da temperatura de 60°C para o anelamento dos *primers*, e então de 72°C para a extensão das novas fitas. As condições da PCR estão resumidas na figura 16.

Os produtos de amplificação foram visualizados em gel de agarose 1%, após coloração com brometo de etídio (Sigma). Os fragmentos do gene foram amplificados para posterior rastreamento de mutações por sequenciamento.

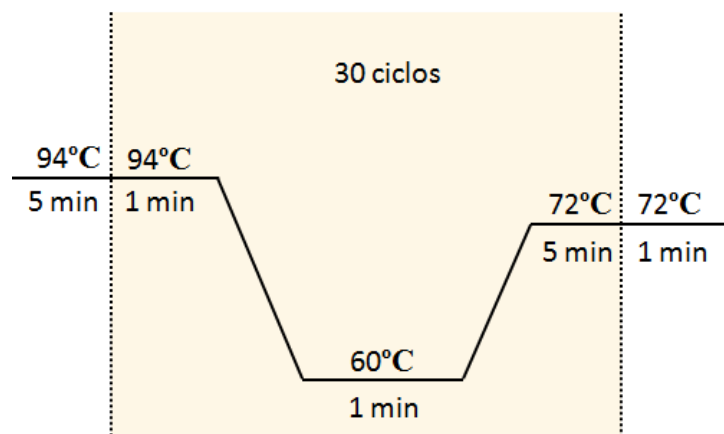


Figura 16. Ciclos utilizados na amplificação do gene *GJB2*.

3.2.2.2.2. Purificação dos produtos de PCR

Os fragmentos amplificados pela técnica de PCR foram purificados utilizando-se o kit *Wizard SV Gel and PCR Clean-UP System* (Promega Corporation, EUA). Após a

purificação, a quantidade e a pureza das amostras de DNA foram determinadas por densidade óptica em espectrofotômetro NanoDrop® ND-8000 (Thermo Scientific).

3.2.2.2.3. Reação para Sequenciamento

As reações de sequenciamento foram realizadas no sequenciador automático ABI PRISM® 3700 DNA Analyzer utilizando-se o *BigDye™ Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit* (Applied Biosystem, EUA), de acordo com o protocolo recomendado pelo fabricante. Para o preparo das reações foram utilizados:

40-80ng de DNA

2µL do *mix BigDye*

1µL do *primer* direto ou reverso (5pmol/µL)

H₂O deionizada para completar 10µL

As condições de amplificação estão especificadas na figura 17.

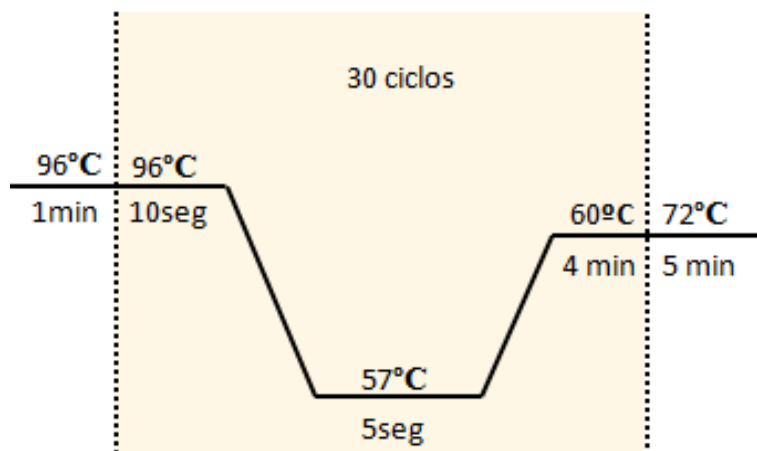


Figura 17. Ciclos de amplificação para posterior sequenciamento do gene *GJB2*.

Após a amplificação, as reações de sequenciamento foram purificadas. Primeiramente foram adicionados 2,5 µL de EDTA 125 mM e 25 µL de etanol 100%, após 15 min de incubação à temperatura ambiente (protegido da luz), a placa foi centrifugada por 45 min a 3.700 rpm (4°C). O etanol foi descartado e, posteriormente, foram adicionados 30 µL de etanol 70%. Foi realizada uma nova centrifugação, por 10 min a 3.700 rpm, sendo o etanol novamente descartado. Antes da colocação da placa no sequenciador, foram adicionados 10 µL de formamida seguida de homogeneização e centrifugação rápida. A amostra foi desnaturada (5 min a 95 °C) e em seguida colocada no gelo por 10min.

3.2.2.2.4. Análise das sequências obtidas

As sequências obtidas foram analisadas e comparadas com as sequências normais dos genes, com o auxílio dos programas *Chromas Lite*® (http://www.technelysium.com.au/chromas_lite.html) e *CLC Sequence Viewer* 6.1 (CLC bio A/S).

3.2.2.3. Rastreamento da mutação *IVS1+IG>A* no gene *GJB2*

A mutação *IVS1+IG>A* foi rastreada pela técnica de RFLP-PCR (*Restriction Fragment Length Polymorfism*). Para amplificação foram utilizadas as condições previamente descritas por Denoyelle *et al.*(1999) com o par de *primers* Cx26Ex1 F (5'-TCC GTA ACT TTC CCA GTC TCC GAG GGA AGA GG – 3') e Cx26Ex1 R (5'-CCC AAG GAC GTG TGT TGG TCC AGC CCC – 3').

Para um volume final de 50 µL, foram utilizados: 200 a 500 ng de DNA genômico, 200 µM de cada desoxinucleotídeo trifosfato (dATP, dCTP, dGTP e dTTP), 20 pmol de cada *primer* (direto e reverso), 2,5 U de enzima *Taq* DNA polimerase (Invitrogen, Brasil) em tampão de PCR 10X (Tris-HCL 10 mM pH 8,8), 1,5 mM de MgCl₂, 2,5 µL de DMSO,

completando com água até o volume final. As ampliações foram realizadas em aparelho termociclador Veriti® 96-Well Thermal Cycler (Applied Biosystems). O ciclo utilizado foi o apresentado na figura 18 abaixo.

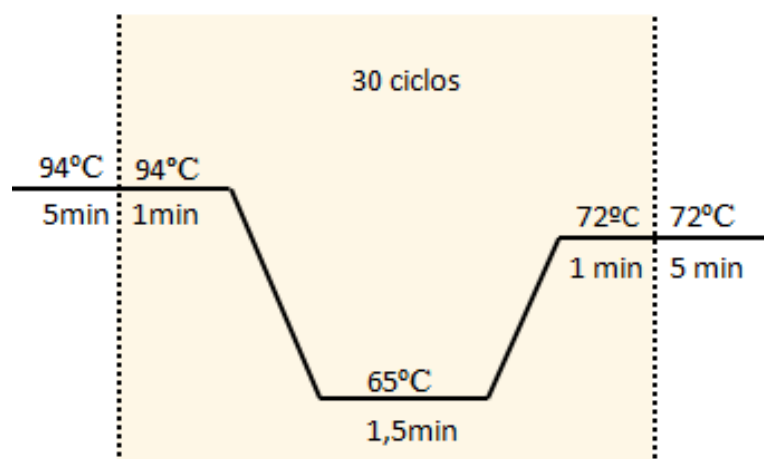


Figura 18. Ciclos de amplificação para o estudo da mutação IVS1+1G>A.

Após a amplificação pela técnica de PCR, foram gerados fragmentos de 361 pb. Posteriormente, os produtos de amplificação foram submetidos à análise de restrição utilizando a enzima *Hph* I (Invitrogen) por 3 horas a 37°C. Para o preparo da reação de digestão foram utilizados: 17,5 µL do produto de PCR, 2,0 µL do tampão da enzima e 0,5 µL da enzima *Hph* I (5000U/µL). Para análise dos produtos gerados, os fragmentos foram submetidos a eletroforese em gel de agarose 1,5%, corados e visualizados sob luz ultravioleta.

Em indivíduos que não são portadores da mutação *IVS1+1G>A* são gerados 2 fragmentos: um de 117pb e outro de 244pb. Em indivíduos portadores da mutação, um dos sítios de restrição é abolido, sendo gerado apenas um fragmento de 361 pb. Para confirmar a presença da mutação, os produtos de PCR dos pacientes portadores da mutação

IVS1+1G>A foram sequenciados utilizando os mesmos *primers* usados na PCR. A reação de sequenciamento e análise das sequências obtidas seguiram o protocolo já descrito acima.

3.2.2.4. Rastreamento das deleções *del(GJB6-D13S1830)* e *del(GJB6-D13S1854)* no gene *GJB6*

A análise das deleções *del(GJB6-D13S1830)* e *del(GJB6-D13S1854)* foi realizada de acordo com os protocolos previamente descritos por Del Castillo e colaboradores, 2005. O rastreamento das mutações foi realizado através de uma PCR *multiplex*, que investiga a presença de ambas as deleções em apenas uma reação. As sequências dos *primers* e o tamanho dos fragmentos resultantes são mostrados na Tabela 6. Os fragmentos de DNA resultantes da amplificação contêm os pontos de quebra de ambas as deleções, assim como um segmento do éxon 1 do gene *GJB6*, que é usado como controle para checar a eficiência da reação e distinguir os alelos heterozigotos e homozigotos para qualquer uma das duas deleções.

Tabela 6. Sequências dos *primers* utilizados na triagem das deleções *del(GJB6-D13S1830)* e *del(GJB6-D13S1854)* e tamanho dos fragmentos gerados.

Par	Posição	PRIMERS 5' → 3'	Tamanho (pb)
1	ponto de quebra da <i>del(GJB6-D13S1830)</i>	GJB6 – TTT AGG GCA TGA TTG GGG TGA TTT BKR1 – CAC CAT GCG TAG CCT TAA CCA TTT T	460
2	ponto de quebra da <i>del(GJB6-D13S1854)</i>	DelBK1 – TCA TAG TGA AGA ACT CGA TGC TGT TT DelBK2 – CAG CGG CTA CCC TAG TTG TGG T	564
3	éxon 1 do gene <i>GJB6</i>	Ex1A – CGT CTT TGG GGG TGT TGC TT Ex1B – CAT GAA GAG GGC GTA CAA GTT AGAA	333

Para um volume de 30 μ L de reação, foram utilizados: 200 a 500 ng de DNA genômico, 200 μ M de cada desoxinucleotídeo trifosfato (dATP, dCTP, dGTP e dTTP), 20 pmol de cada *primer* (direto e reverso), 2,5 U de *Taq* DNA polimerase em tampão de PCR 10X (Tris-HCl 10mM pH 8,8), 25 mM de MgCl₂, completando com água até o volume final.

As amplificações foram realizadas em aparelho termociclador Veriti® 96-Well Thermal Cycler (Applied Biosystems). As condições da PCR estão resumidas na figura 19.

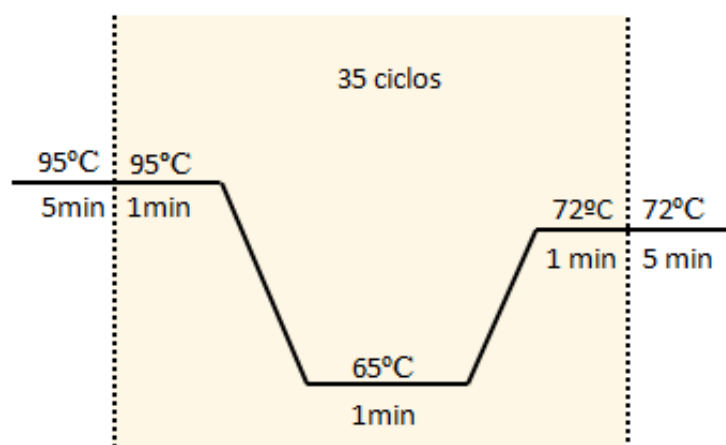


Figura 19. Ciclos de amplificação para o estudo das deleções del(*GJB6*-D13S1830) e del(*GJB6*-D13S1854).

Os produtos de amplificação foram visualizados em gel de agarose 1,5%, após coloração com brometo de etídio (Sigma). Indivíduos que não são portadores das deleções exibem a banda controle de 333 pb referente ao éxon 1 do gene *GJB6*. Indivíduos com a del(*GJB6*-D13S1830) em heterozigose apresentam, além da banda controle, uma banda de 460 pb. Já a del(*GJB6*-D13S1854) em heterozigose gera um fragmento de 564 pb, além da banda controle.

3.2.2.5. Rastreamento da mutação m.1555A>G no gene mitocondrial *MTRNR1*

Para o rastreamento da mutação m.1555A>G foram utilizadas as condições previamente descritas por Friedman e colaboradores (1999) e Iwasaki e colaboradores (2000), com o par de *primers* MIT-F (5' – GTC GAA GGT GGA TTT AGC AGT – 3') e MIT-R (5' – CAG AAG GTA TAG GGG TTA GTC – 3').

Para um volume de 50 µL de reação foram utilizados: 200 a 500 ng de DNA genômico, 200 µM de cada desoxinucleotídeos trifosfato (dATP, dCTP, dGTP e dTTP), 20 pmol de cada *primer* (direto e reverso), 2,5 U de *Taq* DNA polimerase em tampão de PCR 10X (Tris-HCl 10mM pH 8,8), 25 mM de MgCl₂, completando com água até o volume final. As amplificações foram realizadas em aparelho termociclador Veriti® 96-Well Thermal Cycler (Applied Biosystems). As condições da PCR estão resumidas na figura 20.

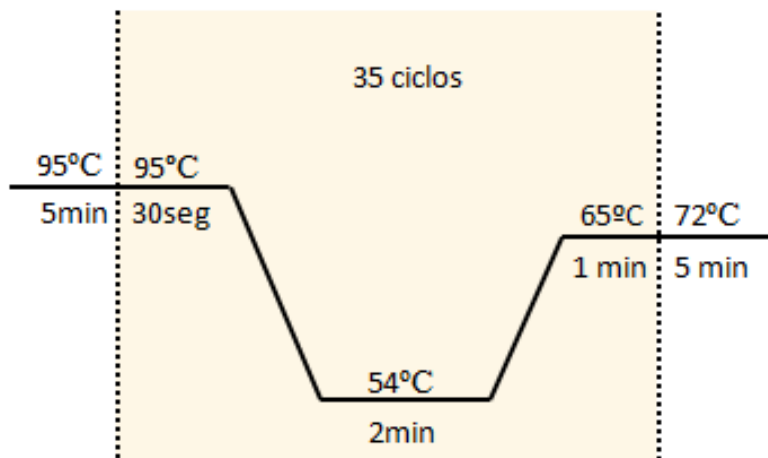


Figura 20. Ciclos de amplificação para o estudo da mutação mitocondrial m.1555A>G.

Após a amplificação pela técnica de PCR, foram gerados fragmentos de DNAm de 2060pb. Posteriormente, os produtos de amplificação foram submetidos à análise de restrição utilizando a enzima *BsmAI* (Invitrogen), por 2 h a 55°C. Para o preparo da reação

de digestão foram utilizados: 17,5 µL do produto de PCR, 2,0 µL do tampão da enzima e 0,5 µL da enzima *BsmAI* (5000U/µL).

A análise dos produtos gerados foi realizada em gel de agarose 1,5%, após coloração com brometo de etídio (Sigma). Em indivíduos que não são portadores da mutação m.1555A>G são gerados 3 fragmentos: de 1100, 516 e 444 pb. E em indivíduos portadores da mutação, um dos sítios de restrição é abolido, sendo gerados apenas 2 fragmentos: de 1616 e 444 bp.

3.2.2.6. Rastreamento da deleção del (CHR13 :19,837,344-19, 968698)

Para rastreamento da del(chr.13: 19,837,344-19,968,698) utilizamos a técnica de PCR Multiplex segundo Wilch e colaboradores, 2010. *Primers* direto e reverso próximos à região de quebra amplificam um fragmento de 628 pb, e *primers* internos, na ausência da mutação, amplificam um fragmento de 836 pb. As sequências dos *primers* e o tamanho dos fragmentos resultantes são mostrados na Tabela 7.

Tabela 7. Sequências dos *primers* utilizados na triagem das deleções del (CHR13 :19,837,344-19, 968698) e tamanho dos fragmentos gerados.

PAR	PRIMERS 5' → 3'	TAMANHO (pb)
1	Del3F – TGG GAC CAG GTC TGT TGT T Del3R – ATT GCG ACT TGC TTT TCG TT	628
2	Del3IntF – GCA GCC ATC TCA TGG TCT CT Del3IntR – CCA ACA CAA TTG GGT CAC TCT	836

Para um volume de 20 µL de reação foram utilizados: 200 a 500 ng de DNA genômico, 200 µM de cada desoxinucleotídeo trifosfato (dATP, dCTP, dGTP e dTTP), 20 pmol de cada *primer* (direto e reverso), 1,5 mM de MgCl₂ e 2,5U de enzima *Taq* DNA

polimerase (Invitrogen) em tampão de PCR 10X (Tris-HCL 10mM pH 8,8) completando com água até o volume final. As ampliações foram realizadas em aparelho termociclador Veriti® 96-Well Thermal Cycler (Applied Biosystems). As condições da PCR estão resumidas na figura 21.

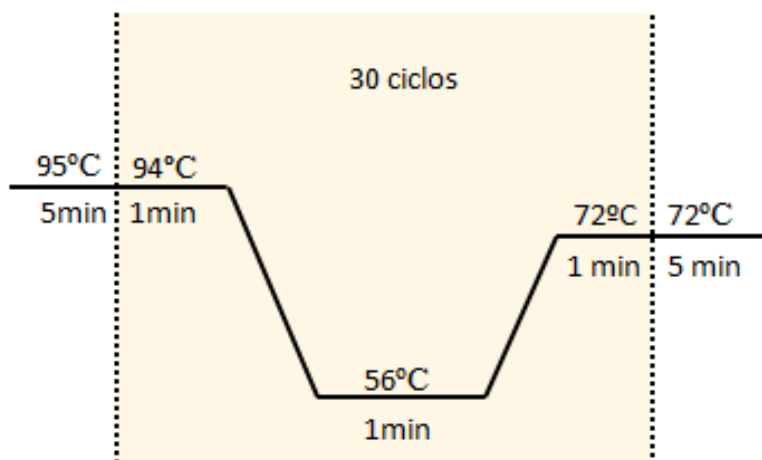


Figura 21. Ciclos de amplificação para o estudo da mutação del(chr.13: 19,837,344-19,968,698) no gene *GJB6*.

Os produtos de amplificação foram visualizados em gel de agarose 1,5%, após coloração com brometo de etídio (Sigma). Indivíduos que não são portadores das deleções exibem a banda controle de 836 pb referente a região que é suprimida quando a deleção está presente. Indivíduos com a del(chr.13: 19,837,344-19,968,698) em heterozigose apresentam, além da banda controle, uma banda de 628 pb, e em homozigose, apresentam apenas a banda de 628 pb.

3.2.2.7. Rastreamento de mutações no gene *SLC26A4* por sequenciamento automático

O rastreamento de mutações no gene *SLC26A4* foi realizado em apenas 3 pacientes que apresentaram as mutações p.V609G (2) e p.C282Y (1) em heterozigose. O objetivo dessas análises foi confirmar a presença dessas mutações no gene *SLC26A4*, detectadas pela técnica de espectrometria de massa em pacientes heterozigotos para a mutação c.35delG, assim como procurar outras mutações no gene *SLC26A4* que não foram investigadas anteriormente por outras técnicas. A associação de mutações neste gene poderia explicar o fenótipo dos indivíduos estudados.

3.2.2.7.1 Amplificação do gene *SLC26A4*

O gene *SLC26A4* consiste em 20 éxons codificantes. Cada éxon codificante foi amplificado pela técnica de PCR, de acordo com as condições previamente descritas por Coyle *et al.*, 1998. Na amplificação dos fragmentos foram utilizados os ciclos de amplificação determinados de acordo com a T_m (temperatura de *melting*) de cada *primer*. As sequências dos *primers* de cada éxon, suas respectivas T_m e o tamanho dos fragmentos resultantes são mostrados na Tabela 8.

Tabela 8. Sequências dos *primers* utilizados na triagem de mutações no gene *SLC26A4*, T_m e tamanho dos fragmentos gerados.

Éxons	PRIMERS 5' → 3'	T_m °C	TAMANHO (pb)
PDS 2	F – CAGGACGCGGACCAGACT R – CGAGACTGATGGAGCCACCCTC	65	509
PDS 3	F – GCAAATTGGTTGTGACTGAG R – GTAAACTGCTGCCAACATC	60	294

PDS 4	F – TAATCACTTTGCATGTGCTTT R – GCCAAAACACTTTAAACATGA	60	270
PDS 5	F – CCTATGCAGACACATTGAACATTTG R – ACCTGTATAAATCCAACCAGCA	60	442
PDS 6	F – GGTTTCTATCTCAGGCAAACAT R – ATTGTTTCTGGAATGAACAGTGACC	60	270
PDS 7	F – CATGGTTTTTCATGTGGGAAGATTC R – AATGGCAGTAGCAATTATCG	60	388
PDS 8	F – ACACAAAATCCCAGTCCC R – CAAATGGCTTGACGTTTATCTACACAC	60	410
PDS 9	F – GTGGTCAAATCTTCACAGCA R – CCCTTCTTTAGCTGACACCA	62	267
PDS 10	F – AAATACTCAGCGAAGGTCTTGC R – CGAGCCTTCCTCTGTTGC	60	250
PDS 11/12	F – ACACATCCAGTGAGCTGGAA R – AGGTGGTAGGTGACTTACAGCA	60	536
PDS 13	F – TTGTTTGTGGATCATTGATCTT R – TCTGGGTTTTACGTTACTCACA	58	226
PDS 14	F – CAAAATACGGCTGTTCCAAA R – AATGGAGCTGCTGAAACTTC	58	186
PDS 15	F – CCCAGACAATTTCTTTTATGC R – TTGGACCCCAGTAAATACTTGT	60	210
PDS 16	F – TTGAGAAATAGCCTTTCCAGAT R – GACCCTCTAACTGCTCTCATCA	58	250
PDS 17	F – TCTTCGTTTAGAATGGCATCA R – ATTGCCAAAGCTCCAAATGT	58	423

PDS 18	F – TGAATGCTACTGAATTATGGGC R – AGATAGGAGAAAGGGCTTACGG	58	184
PDS 19	F – GGTAGGGTGTGCCCTGTAGT R – CGTTTCTAAAATGGAACCTTGA	58	409
PDS 20	F – ACCCTGTGTTCTCTTTTTCAAG R – GCATTTGGGGGAATTATGTT	58	220
PDS 21	F – ACACTTTGTTTTCCCCTTGC R – GACTTGAGGAGTTTTGTCTTG	56	110

Para um volume de 50 μ L de reação foram utilizados: 200 a 500 ng de DNA genômico, 200 μ M de cada desoxinucleotídeo trifosfato (dATP, dCTP, dGTP e dTTP), 20 pmol de cada *primer* (direto e reverso), 1,5 mM de MgCl₂ e 2,5U de enzima *Taq* DNA polimerase (Invitrogen) em tampão de PCR 10X (Tris-HCL 10mM pH 8,8) completando com água até o volume final. As amplificações foram realizadas em aparelho termociclador Veriti® 96-Well Thermal Cycler (Applied Biosystems). As condições da PCR estão resumidas na figura 22.

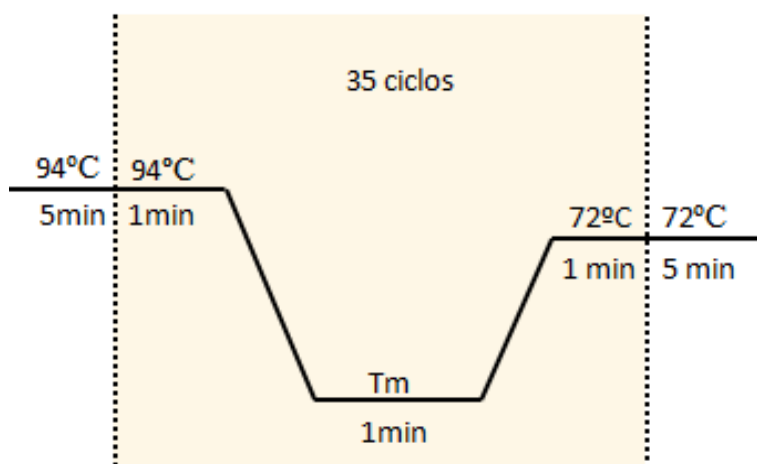


Figura 22. Ciclos de amplificação para posterior sequenciamento do gene *SLC26A4*.

Os produtos de amplificação foram visualizados em gel de agarose 1,5%, após coloração com brometo de etídio (Sigma). Os éxons codificantes do gene foram amplificados para posterior rastreamento de mutações por sequenciamento. Os fragmentos gerados foram purificados, sequenciados e analisados seguindo os protocolos já descritos (3.2.2.2.3 - 3.2.2.2.4).

3.2.2.8 Análises das mutações R301Q e R1746Q no gene *CDH23*

A presença das mutações p.R301Q e p.R1746Q no gene *CDH23* foi investigada por sequenciamento automático para confirmar os resultados obtidos por espectrometria de massa, que detectou essas mutações em dois pacientes heterozigotos para mutações no *locus* DFNB1, incluídos nesse trabalho.

3.2.2.8.1 Amplificação de 2 éxons no gene *CDH23*

O gene *CDH23* consiste em 69 éxons. As mutações p.R301Q e p.R1746Q ocorrem nos éxons 9 e 40 respectivamente. Apenas esses 2 éxons foram amplificados pela técnica de PCR em amostras de DNA de pacientes positivos para essas mutações, detectadas pela técnica de espectrometria de massa. Na amplificação dos fragmentos foram utilizados os ciclos de amplificação determinados de acordo com a T_m (temperatura de *melting*) de cada *primer*. As sequências dos *primers* de cada éxon, suas respectivas T_m e o tamanho dos fragmentos resultantes são mostrados na tabela 9.

Tabela 9. Sequências dos *primers* utilizados na pesquisa de mutações no gene *CDH23*, T_m e tamanho dos fragmentos gerados.

Éxons	PRIMERS 5' → 3'	T_m	TAMANHO (pb)
9	R301Q-F – GCA GGG AAT ACC AAC AGC ATC R301Q-R – GCC CTC GGA CAC TGC TGG	62	198
40	R1746Q-F – ACG TTG GAT GCT CAG GTG CTT GTG AAT GTG R1746Q-R – ACG TTG GAT GGT GAC TTC AAA TGG TCC CTC	58	105

Para um volume de 50 μ L de reação foram utilizados: 200 a 500 ng de DNA genômico, 200 μ M de cada desoxinucleotídeo trifosfato (dATP, dCTP, dGTP e dTTP), 20 pmol de cada *primer* (direto e reverso), 1,5 mM de $MgCl_2$ e 2,5U de enzima *Taq* DNA polimerase (Invitrogen) em tampão de PCR 10X (Tris-HCL 10mM pH 8,8) completando com água até o volume final. As amplificações foram realizadas em aparelho termociclador Veriti® 96-Well Thermal Cycler (Applied Biosystems). As condições da PCR foram as mesmas para a análise das duas mutações e estão resumidas na figura 23.

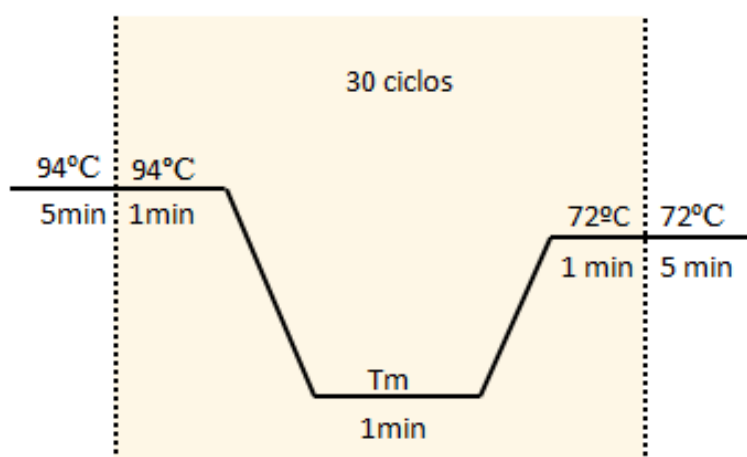


Figura 23. Ciclos de amplificação dos éxons 9 e 40 do gene *SLC26A4* para posterior sequenciamento.

Os produtos de amplificação foram visualizados em gel de agarose 1,5%, após coloração com brometo de etídio (Sigma). Os fragmentos gerados foram purificados, sequenciados e analisados seguindo os protocolos já descritos (3.2.2.2.3 - 3.1.2.2.4).

3.2.2.9 Rastreamento de mutações no *cluster miR-183*

Para o rastreamento de mutações no *cluster miR-183/96/182* utilizamos a técnica de sequenciamento automático.

3.2.2.9.1 Amplificação do *cluster miR-183*

O *cluster* foi dividido para amplificação pela técnica de PCR. Foram desenhados 2 pares de *primers* que permitiram a amplificação de 2 fragmentos, um contendo o *miR-182* e o outro contendo o *miR-183* e o *miR-96*, de acordo com a figura 24.

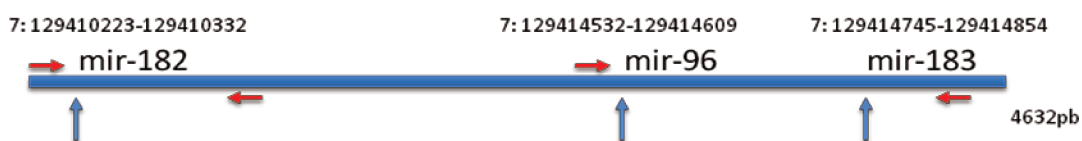


Figura 24. Esquema do desenho de *primers* do *cluster miR-183/96/182* localizado no Crom. 7.

As sequências dos *primers* e o tamanho dos fragmentos resultantes são mostrados na Tabela 10.

Tabela 10. Sequência de *primers* para amplificação do *cluster miR-183*.

microRNA	PRIMERS 5' → 3'	Tamanho (pb)
mir-182	F- GGA TGC AGG GAA ACA CAG AG R- CCT GGA CCA TCC TAA CTG TC	321
mir-96/183	F- CAC AGC AGC TGA GCC AGA TG R- GCA TGT GGA TCT TGT GAA GAG	590

Para um volume de 50 μ L de reação foram utilizados: 200 a 500 ng de DNA genômico, 200 μ M de cada desoxinucleotídeo trifosfato (dATP, dCTP, dGTP e dTTP), 20 pmol de cada *primer* (direto e reverso), 1,5 mM de $MgCl_2$ e 2,5U de enzima *Taq* DNA polimerase (Invitrogen) em tampão de PCR 10X (Tris-HCL 10mM pH 8,8) completando com água até o volume final. As amplificações foram realizadas em aparelho termociclador Veriti® 96-Well Thermal Cycler (Applied Biosystems). As condições da PCR foram iguais para os dois fragmentos e estão resumidas na figura 25.

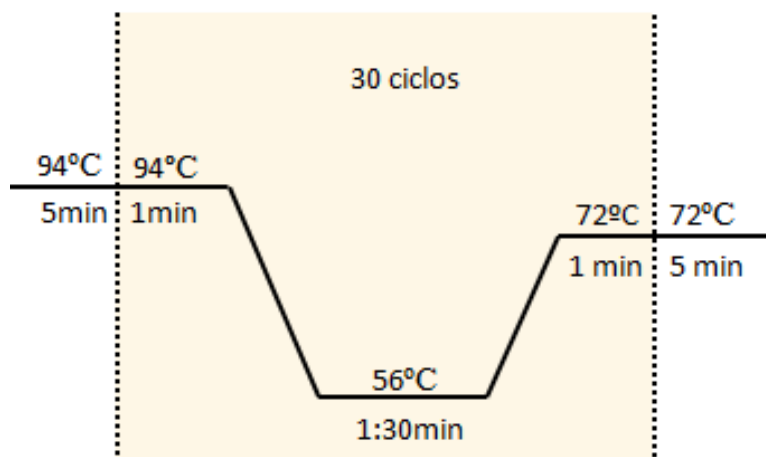


Figura 25. Ciclos de amplificação do *cluster miR-183* para posterior sequenciamento.

Os produtos de amplificação foram visualizados em gel de agarose 1,5%, após coloração com brometo de etídio (Sigma). Os fragmentos gerados foram purificados, sequenciados e analisados seguindo os protocolos já descritos (3.2.2.2.3 - 3.2.2.2.4).

3.2.3 Genotipagem utilizando a Técnica de Espectrometria de Massa

Nesse estudo foi utilizado o ensaio *iPLEX® Gold Genotyping - MALDI-TOF /MS - MassArray-System* (Sequenom, Inc.).

O ensaio *iPlex Gold* é um método que combina as vantagens da técnica de PCR *Multiplex*, com extensão de uma única base, com a sensibilidade e precisão do sistema *MALDI-TOF/MS (Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-Of-Flight Mass Spectrometry)*. A tecnologia baseia-se em uma reação de extensão de base única para discriminação alélica e utiliza terminadores com massa modificada que não são

fluorescentes. Os produtos amplificados são detectados pelo sistema *MALDI-TOF* que diferencia cada alelo pela sua massa. Esse método permite a genotipagem de até 40 *SNPs* simultaneamente e quantidades de ensaios que podem variar de 96 a 384 amostras, oferecendo um alto nível de flexibilidade e baixo custo por genótipo.

O sistema é composto por um robô (*MassArray® Liquid Handler Station*), utilizado no preparo das reações de PCR; por um dispensador de amostras (*MassArray® Nanodispenser*), utilizado na transferência dos produtos das reações de PCR para *SpectroChips*, que são avaliados no espectrômetro de massa; e por um espectrômetro de massa (*MassArray® Compact System*), utilizado na medida das massas das moléculas associadas à matriz do SpectroChip (Figura 26). O sistema é acompanhado de um pacote de softwares que realizam a transferência dos dados em tempo real e geram relatórios com as informações de cada *SNP* para as amostras analisadas (*MassArray® Typer 3.4*).



Figura 26. Equipamentos utilizados no Sistema MassArray.

Nesse estudo, a técnica de espectrometria de massa foi utilizada em duas abordagens:

1. Rastreamento de pequenas deleções ou duplicações no *locus* DFNB1 utilizando *SNPs* como marcadores.
2. Rastreamento de mutações nos principais genes, nucleares e mitocondriais, envolvidos na perda auditiva.

3.2.3.1 Rastreamento de deleções ou duplicações no *locus* DFNB1

3.2.3.1.1 Desenho dos ensaios

3.2.3.1.1.1 Seleção dos *SNPs*

A seleção de *SNPs* utilizados como marcadores na busca por pequenas deleções ou duplicações no *locus* DFNB1 foi realizada utilizando-se a ferramenta *SNP*Tagger do programa Haploview 4.2 a partir do banco de dados das populações CEU+TSI (Caucasianos residentes em UTA no leste Europeu + Toscanos da Italia) estudadas pelo projeto HapMap (Hapmap, Phase 3 <http://hapmap.ncbi.nlm.nih.gov/>). Utilizando o Mapa de Ligação do programa Haploview foi possível selecionar 41 *SNPs* (grau de desequilíbrio de ligação $r^2 < 0,8$), localizados entre as posições 19.650.000 – 20.000.000 do Cromossomo 13. Nessa região já foram encontradas várias deleções associadas à perda auditiva como mostra a figura 27.

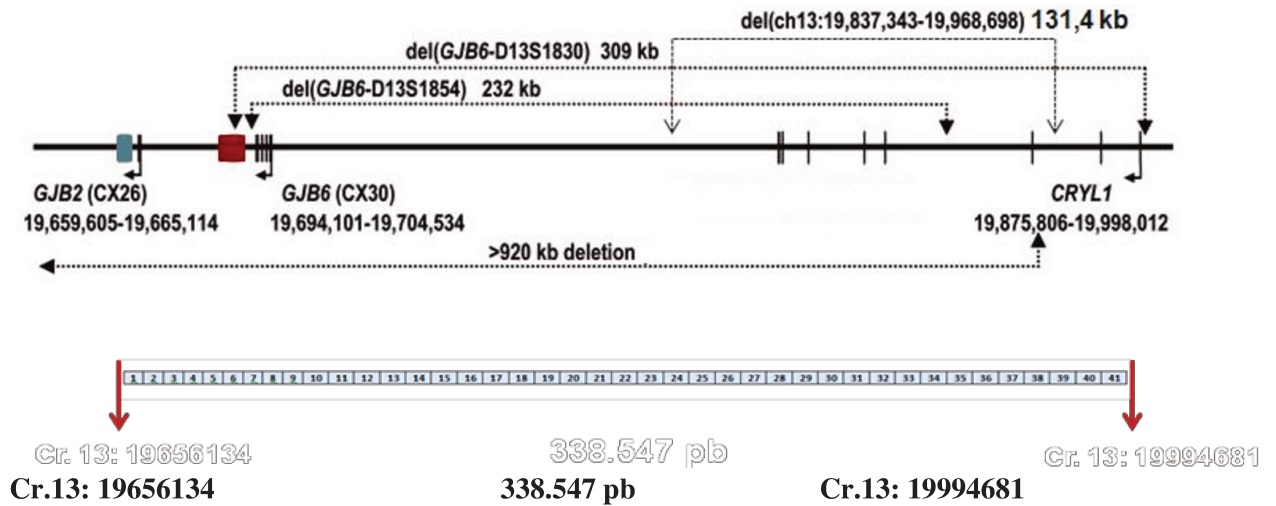


Figura 27. Desenho esquemático do *locus* DFNB1 (Cromossomo 13) mostrando a localização dos genes *GJB2* e *GJB6*, região das deleções já descritas e distribuição dos *SNPs* estudados.

A distância entre os *SNPs* foram de aproximadamente 5000pb. A identificação de cada *SNP* e sua localização no Cromossomo 13 de acordo com o banco de dados do programa Haploview/ HapMap são mostradas na tabela 11.

Tabela 11. Identificação e localização dos *SNPs* no Cromossomo 13.

Nº	Identificador	Localização Cr:13	Nº	Identificador	Localização Cr:13
1	rs4272877	19656034	22	rs9509191	19853331
2	rs7987144	19666044	23	rs4331204	19859929
3	rs7981756	19688642	24	rs6650231	19870622
4	rs945366	19699744	25	rs7332444	19890731
5	rs9509119	19721943	26	rs9506487	19896837
6	rs10492508	19727482	27	rs9552183	19913115
7	rs7319601	19736119	28	rs7337130	19919243
8	rs9652061	19744072	29	rs3936015	19928792
9	rs9509128	19756675	30	rs9315607	19939554

10	rs7327522	19769195	31	rs9506494	19945758
11	rs7323769	19775766	32	rs7321826	19951266
12	rs9550633	19784809	33	rs9509249	19965945
13	rs9578271	19790442	34	rs7335998	19970994
14	rs11147641	19795428	35	rs9552217	19979196
15	rs12868032	19807948	36	rs2314232	19985235
16	rs9315492	19817958	37	rs9509266	19994581
17	rs9550638	19824453	38	rs9506498	19958733
18	rs9552152	19831435	39	rs4770027	19905242
19	rs944015	19836905	40	rs9315384	19681918
20	rs4770014	19842243	41	rs945372	19713171
21	rs17081227	19847971			

3.2.3.1.1.2 Desenho dos *Primers*

Oligonucleotídeos de captura dos *SNPs* (*primers* de amplificação) e oligonucleotídeos de extensão de bases únicas (*primers* de extensão) foram desenhados a partir das sequências obtidas no banco de dados HapMap. O desenho dos ensaios foi realizado com o auxílio do software *MassArray® Assay Design* (versão 3.1, Sequenom Inc., San Diego - USA). Após inserção do ID (identificador) dos *SNPs* no programa, são geradas as sequências de *primers* referentes a cada *SNP* assim como também os grupos de *SNPs* (*multiplex*) a serem avaliados em conjunto. Como se trata de uma plataforma de alta escala, existe a possibilidade de avaliar até 40 *SNPs* simultaneamente em uma única reação para uma dada amostra. Contudo, nesse estudo, dada a complexidade genética da perda auditiva, os *SNPs* foram divididos em 2 grupos: 26 *SNPs* foram analisados em uma reação (1° *well*) e 15 *SNPs* em outra reação (2° *well*). Dessa forma, para cada paciente foram

necessários 2 *wells* para a análise dos 41 *SNPs*. As sequências dos *primers* e distribuição nos *wells* são mostrados no Anexo 4.

3.2.3.2 Rastreamento de mutações nos principais genes, nucleares e mitocondriais, envolvidos na perda auditiva

3.2.3.2.1 Desenho dos ensaios

3.2.3.2.1.1 Seleção dos genes e mutações

Quanto aos genes nucleares, a escolha foi baseada na tabela dos mais importantes genes envolvidos na perda auditiva, selecionados com base na frequência das mutações reportadas (Hilgert, Smith e Van Camp ,2009). Ao todo 104 mutações em 21 genes foram selecionadas para este estudo. As mutações, seus respectivos genes e referências estão descritos na tabela 12.

As mutações no gene *GJB2* foram selecionadas com base nos arquivos de mais de 2500 indivíduos com perda auditiva encaminhados ao Laboratório de Genética Humana-CBMEG, Unicamp entre os anos 2000 e 2012. Para os demais genes, as mutações foram selecionadas com base na frequência em que eram reportadas na literatura, e apenas foram incluídas mutações que tivessem sido encontradas em dois ou mais estudos independentes. Em relação aos genes *OTOF*, *SLC26A4* e *MYO15A*, todas as mutações que foram identificadas na população brasileira foram incluídas (Romanos et al., 2009; Kopp et al., 1999; Lezirovitz et al., 2008). Ensaios para as deleções no gene *GJB6*, del(*GJB6*-D13S1830) e del(*GJB6*-D13S1854), não puderam ser sintetizados por se tratarem de deleções muito grandes. Então, na tentativa de representar essas alterações, foram escolhidos dois *SNPs* (polimorfismos de nucleotídeo único) localizados dentro da região deletada.

Tabela 12. Mutações selecionadas, seus respectivos genes nucleares e referências.

<i>Gene</i>	Mutação	Alteração na Proteína	Referência
<i>GJB2</i>	c.283G>A	p.V95M	Kelley <i>et al.</i> , 1998
	c.339T>G	p.S113R	Kelley <i>et al.</i> , 1998
	c.279G>A	p.M93I	Wu <i>et al.</i> , 2002
	c.286G>A	p.W24X	Kellsell <i>et al.</i> , 1997
	c.439G>A	p.E147K	Murgia, <i>et al.</i> , 1999
	c.617A>G	p.N206S	Kenna <i>et al.</i> , 2001
	c.385G>A	p.E129K	Kenna <i>et al.</i> , 2001
	c.109G>A	p.V37I	Kelley <i>et al.</i> , 1998
	c.269T>C	p.L90P	Murgia, <i>et al.</i> , 1999
	c.550C>G	p.R184W	Wilcox <i>et al.</i> , 2000
	c.551G>C	p.R184P	Denoyelle <i>et al.</i> , 1997
	c.516G>A	p.W172X	Posukh <i>et al.</i> , 2005
	c.224G>A	p.R75Q	Uyguner <i>et al.</i> , 2002
	c.101T>C	p.M34T	Feldmann <i>et al.</i> , 2003
	c.457G>A	p.V153I	Marlin <i>et al.</i> , 2001
	c.503A>G	p.K168R	Samanich <i>et al.</i> , 2007
	c.c.35delG	G12Vfs	Zelante <i>et al.</i> , 1997
	c.167delT	p.L56Rfs	Zelente <i>et al.</i> , 1997
	c.235delC	p.L79Cfs	Fuse <i>et al.</i> , 1999
	c.139G>T	p_E47X	Denoyelle <i>et al.</i> , 1997
	IVS1+1G>A	Splicing defect	Green <i>et al.</i> , 1999
<i>GJB6</i>	rs11843171	NA	
	rs144457142	NA	
<i>MIR96</i>	c.13G>A	NA	Mencía <i>et al.</i> , 2009
	c.14C>A	NA	Mencía <i>et al.</i> , 2009

<i>MT-TSI</i>	m.7445A>G	NA	Hyslop et al., 1997
<i>MT-RNR1</i>	m.1555A>G	NA	Fischel-Ghodsian <i>et al.</i> , 1993
	m.1494C>T	NA	Prezant <i>et al.</i> , 1993
<i>SLC26A4</i>	279delT	p.Ser93ArgfsX3	Palos <i>et al.</i> , 2008
	c.412G>T	p.V138F	Van Hauwe <i>et al.</i> , 1998
	c.425C>T	p.P142L	Park <i>et al.</i> , 2005
	c.446G>A	p.G149R	
	c.578C>T	p.T193I	Adato <i>et al.</i> , 2000
	c.1226G>A	p.R409H	Van Hauwe <i>et al.</i> , 1998
	c.1229C>T	p.T410M	Coyle <i>et al.</i> , 1998
	c.1238A>G	p.Q413R	
	c.1334T>G	p.L445W	Van Hauwe <i>et al.</i> , 1998
	c.1707+5 G>A	p.IVS15+5G>A	Park <i>et al.</i> , 2005
	c.1826T>G	p.V609G	Pryor <i>et al.</i> , 2005
	c.2326C>T	p.R776C	Pryor <i>et al.</i> , 2005
	c.445G>A	p.G149R	
	c.IVS8+1G-A	Splicing defect	Chen <i>et al.</i> , 2007
	c.845G>A	p.C282Y	
<i>MYO15A</i>	c.10573delA	p.Ser3525fs	Lezirovitz <i>et al.</i> , 2008
	c.9957_9960delTGAC	p.Asp3320fs	Lezirovitz <i>et al.</i> , 2008
	c.3313G>T	p.E1105X	Nal <i>et al.</i> , 2007
	c.3334delG	p.G1112fsX1124	Nal <i>et al.</i> , 2007
	c.6796G>A	p.V2266M	Nal <i>et al.</i> , 2007
<i>OTOF</i>	c.2485C>T	p.Q829X	Migliosi <i>et al.</i> , 2002
	c.2905-2923del19ins11	p.A969fs	Rodríguez-Ballesteros <i>et al.</i> , 2008
	c.1552-1567del16	p.R518fs	Romanos <i>et al.</i> , 2009
	c.3400C>T	p.R1134X	Rodríguez-Ballesteros <i>et al.</i> , 2008

	c.4960G>A	p.G1654S	Romanos <i>et al.</i> , 2009
	c.2348delG	p.G783fs	Varga <i>et al.</i> , 2003
	c.5800-5801insC	p.L1934fs	Rodríguez-Ballesteros <i>et al.</i> , 2008
	1841G>A	p.G614E	Romanos <i>et al.</i> , 2009
	c. 3239G>C	p.R1080P	Romanos <i>et al.</i> , 2009
	c.5431A>T	p.K1811X	Romanos <i>et al.</i> , 2009
	c.5785A>C	p.N1929H	Romanos <i>et al.</i> , 2009
	c.4491T>A	p.Y1497X	Yasunaga <i>et al.</i> , 1999
	c.4227_1G>T	Splicing defect	Rodríguez-Ballesteros <i>et al.</i> , 2008
	c.3413T>C	p.L1138P	Rodríguez-Ballesteros <i>et al.</i> , 2008
	c.1601delC		Rodríguez-Ballesteros <i>et al.</i> , 2008
	c.2122C>T	p.R708X	Rodríguez-Ballesteros <i>et al.</i> , 2003
<i>TMCI</i>	c.100C>T	p.R34X	Kurima <i>et al.</i> , 2002
	c.1334G>A	p.R445H	Santos <i>et al.</i> , 2005
	c.1165C>T	p.R389X	Meyer <i>et al.</i> , 2005
	c.1939 T>C	p.S647P	Brownstein <i>et al.</i> , 2011
<i>TMPRSS3</i>	c.IVS4-6G>A	Splicing defect	Scott <i>et al.</i> , 2001
	c.1221C>T	p.P404L	Masmoudi <i>et al.</i> , 2001
	c.207delC	p.Thr70fs	Wattenhofer <i>et al.</i> , 2001
	c.413C>A	p.A138E	Hutchin <i>et al.</i> , 2005
	c.916G>A	p.A306T	Elbracht <i>et al.</i> , 2007
<i>TECTA</i>	c.3107G>A	p.C1036Y	Hildebrand <i>et al.</i> , 2011
	c.5509T>G	p.C1837G	Moreno-Pelayo <i>et al.</i> , 2001
	c.5597C>T	p.T1866M	Sagong <i>et al</i> 2010
	c.5668C>T	p.R1890C	Plantinga <i>et al.</i> , 2006
<i>CDH23</i>	c.6442G>A	p.D2148N	Astuto <i>et al.</i> , 2002
	c.719C>T	p.P240L	Wagatsuma <i>et al.</i> , 2007

	c.902G>A	p.R301Q	Wagatsuma <i>et al.</i> , 2007
	c.5147A>C	p.Q1716P	Wagatsuma <i>et al.</i> , 2007
	c.6085C>T	p.R2029W	Wagatsuma <i>et al.</i> , 2007
	c.2968G>A	p.D990N	Bork <i>et al.</i> , 2001
	c.6133G>A	p.D2045N	Bork <i>et al.</i> , 2001
	c.4756G>C	p.A1586P	Astuto <i>et al.</i> , 2002
	c.6604G>A	p.D2202N	Bork <i>et al.</i> , 2001
	c.5237G>A	p.R1746Q	Bolz <i>et al.</i> , 2001
	c.6050-9G>A	Splicing defect	Von Brederlow <i>et al.</i> , 2002
TMIE	c.241C>T	p.R81C	Naz <i>et al.</i> , 2002
	c.250C>T	p.R84W	Naz <i>et al.</i> , 2002
TRIOBP	c.1039C>T	p.R347X	Shahin <i>et al.</i> , 2006
DFNB59	c.547C>T	p.R183W	Delmaghani <i>et al.</i> , 2006
WFS1	c.2146G>A	p.A716T	Bespalova <i>et al.</i> , 2001
KCNQ4	c.827G>C	p.W276S	Coucke <i>et al.</i> , 1999
COCH	c.151C>T	p.P51S	de Kok <i>et al.</i> , 1999
CIB2	c.272T>C	p.F91S	Riazuddin <i>et al.</i> , 2012
	c.297C>G	p.C99W	Riazuddin <i>et al.</i> , 2012
	c.368T>C	p.I123T	Riazuddin <i>et al.</i> , 2012
KCNJ10	c.581C>A	p.P194H	Yang <i>et al.</i> , 2009
	c.1042C>T	p.R348C	Yang <i>et al.</i> , 2009
FOXI1	c.772G>C	p.G258R	Yang <i>et al.</i> , 2007
	c.773G>A	p.G258E	Yang <i>et al.</i> , 2007
	c.800G>A	p.R267Q	Yang <i>et al.</i> , 2007
	c.1004G>T	p.G335V	Yang <i>et al.</i> , 2007

Quanto ao rastreamento de mutações em genes mitocondriais, a seleção das alterações foi baseada no banco de dados MITOMAP (<http://www.mitomap.org/MITOMAP>). Foram incluídas nesse estudo todas as mutações reportadas na literatura como possíveis causa de perda auditiva não-sindrômica. Ao todo 50 mutações em 14 genes foram selecionadas. As mutações, seus respectivos genes e referências estão descritos na tabela 13.

Tabela 13. Mutações selecionadas para o estudo, seus respectivos genes mitocondriais e referências.

Gene	Alteração	RNA	Referencia
<i>MT-TF</i>	m.622A>G	tRNA Phe	Deschauer et al., 2006
	m.636 A>G	tRNA Phe	Konings et al., 2008
	m.642 T>C	tRNA Phe	Valente et al., 2009
<i>MT-RNR1</i>	m.669 T>C	12S rRNA	Rydzanicz et al., 2010
	m.709 G-A	12S rRNA	Wei et al., 2009
	m.735 A>G	12S rRNA	Mkaouar-Rebai et al., 2010
	m.745 A>G	12S rRNA	Lu et al., 2010
	m.792 A>G	12S rRNA	Lu et al., 2010
	m.801 A>G	12S rRNA	Lu et al., 2010
	m.827 A>G	12S rRNA	Li et al., 2004
	m.839 A>G	12S rRNA	Lu et al., 2010
	m.856 A>G	12S rRNA	Lu et al., 2010
	m.988 G>A	12S rRNA	Rydzanicz et al., 2010
	m.990 T>C	12S rRNA	Konings et al., 2008
	m.1005 T>C	12S rRNA	Yao et al., 2006
	m.1027 A>G	12S rRNA	Lu et al., 2010
	m.1116 A>G	12S rRNA	Li et al., 2005
	m.1180 T>G	12S rRNA	Li et al., 2004

	m.1192 C>A	12S rRNA	Lu et al., 2010
	m.1226 C>G	12S rRNA	Li et al., 2004
	m.1291 T>C	12S rRNA	Ballana et al., 2006
	m.1310 C>T	12S rRNA	Lu et al., 2010
	m.1331 A>G	12S rRNA	Lu et al., 2010
	m.1374 A>G	12S rRNA	Lu et al., 2010
	m.1452 T>C	12S rRNA	Lu et al., 2010
	m.1453 A>G	12S rRNA	Rydzanicz et al., 2010
	m.1494 C>T	12S rRNA	Wang et al., 2006
	m.1537 C>T	12S rRNA	Lévêque et al., 2007
	m.1555 A>G	12S rRNA	Fischel-Ghodsian et al., 1993
<i>MT-TI</i>	m.4316 A>G	tRNA Ile	Chamkha et al., 2011
<i>MT-TQ</i>	m.4336 T>C	tRNA Gln	Jacobs et al., 2005
	m.4363 T>C	tRNA Gln	Wong et al., 2002
<i>MT-TW</i>	m.5540 G>A	tRNA Trp	Guan 2004
	m.5568 A>G	tRNA Trp	Jacobs et al., 2005
<i>MT-TA</i>	m.5587 T>C	tRNA Ala	Tang et al., 2010
	m.5628 T>C	tRNA Ala	Han et al., 2007
	m.5655 T-C	tRNA Ala	Li et al., 2004
<i>MT-TC</i>	m.m.5802 T>C	tRNA Cys	Chen et al., 2008
	m.5821 G>A	tRNA Cys	Young et al., 2006
<i>MT-TS1</i>	m.7445 A>C	tRNA Ser (UCN)	Chen et al., 2008
	m.7456 A>G	tRNA Ser (UCN)	Jacobs et al., 2005
	m.7462 C>T	tRNA Ser (UCN)	Uehara et al., 2010
<i>MT-TK</i>	m.8363 G>A	tRNA Lys	Santorelli et al., 1996
<i>MT-TR</i>	m.10454 T>C	tRNA Arg	Young et al., 2006
<i>MT-TH</i>	m.12183 G>A	tRNA His	Crimi et al., 2003

<i>MT-TS2</i>	m.12224 C>T	tRNA Ser (AGY)	Lu et al., 2010
	m.12236 G>A	tRNA Ser (AGY)	Lévêque et al., 2007
<i>MT-TE</i>	m.14693 A>G	tRNA Glu	Young et al., 2006
<i>MT-TT</i>	m.15908 T>C	tRNA Thr	Young et al., 2006
	m.15927 G>A	tRNA Thr	Chen et al., 2008

3.2.3.2.1.2 Desenho dos *Primers*

Para o desenho dos *primers* de captura e de extensão, sequências de aproximadamente 250 nucleotídeos, contendo a variação entre colchetes, foram inseridas no programa *MassArray® Assay Design* (versão 3.1, Sequenom Inc., San Diego - USA). Dessa forma, foram gerados arquivos Excel contendo todos os dados do ensaio. As sequências dos *primers* foram enviadas para a empresa Exxtend (www.exxtend.com.br), que sintetizou todos os *primers* utilizados na técnica de espectrometria de massa nesse estudo.

As 104 mutações/*SNPs* dos genes nucleares foram agrupadas em 6 grupos ou “*wells*” pelo software *MassArray® Assay Design*, o primeiro e o segundo grupo ficaram com 26 ensaios cada um, o terceiro ficou com 22, o quarto ficou com 20, o quinto com 11 e o sexto com 5 ensaios.

As 50 alterações dos genes mitocondriais foram agrupadas em 5 *wells* assim distribuídos: primeiro well com 12, segundo com 8, terceiro com 15, quarto com 10 e o quinto com 5 ensaios. As sequências dos *primers* e distribuição nos *wells* são mostrados no Anexo 4.

3.2.3.3. Análise qualitativa e quantitativa das amostras

A pureza das amostras de DNA foram determinadas por densidade óptica em espectrofotômetro NanoDrop® ND-8000 (Thermo Scientific), através da razão de absorbância 260/280nm, sendo valores entre 1.8 e 2.0 referências para DNA “puro”.

Quanto à quantificação, foi utilizado o Qubit® 2.0 Fluorometer devido a sua precisão, em conjunto com o Qubit® Assay Kit dsDNA BR Assay (Invitrogen), uniformizando as amostras na concentração de 10 ng/μL através de simples diluições.

3.2.3.4. Reações - iPLEX® Gold Genotyping

Após determinação do desenho dos ensaios e preparação das amostras de DNA de cada paciente a ser analisado, quatro passos foram envolvidos no desenvolvimento da genotipagem de mutações ou *SNPs* pelo método iPLEX Gold Sequenom. Estes passos podem ser visualizados na figura 28, que resume as etapas do processo.

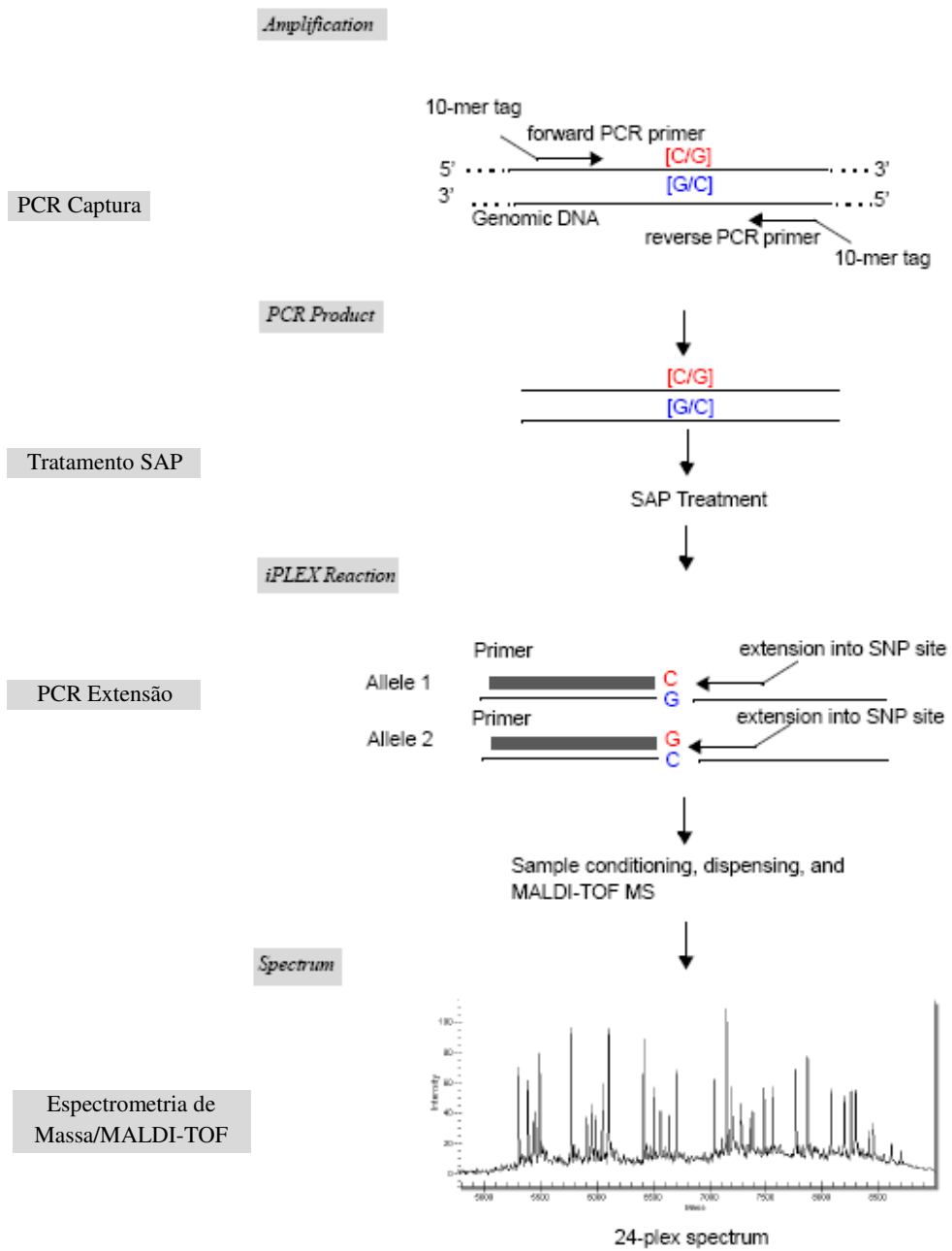


Figura 28. Etapas do método *iPLEX Gold Sequenom*.

3.2.3.4.1 PCR Captura: Amplificação de fragmentos contendo os *SNPs*/Mutações

Uma vez definidos os conjuntos de *SNPs* ou mutações a serem analisados, os *primers* de captura foram empregados na amplificação de produtos de aproximadamente 100pb, englobando a região que apresenta o sítio polimórfico (Figura 26). Nesta etapa os fragmentos contendo os *SNPs* são capturados seguindo protocolo descrito pela Sequenom (*iPLEX Gold Application Guide*).

Para um volume final de 5 μ L de reação foram utilizados: 10 ng de DNA genômico, 500 μ M de desoxinucleotídeo trifosfato (dATP, dCTP, dGTP e dTTP), 100 nM de *primer* (direto e reverso), 2 mM de $MgCl_2$ e 1 U *HotStar Taq* DNA polimerase e tampão iPlex completando com água até o volume final. As amplificações foram realizadas em aparelho termociclador Veriti® 386-Well Thermal Cycler (Applied Biosystems). As condições da PCR estão resumidas na figura 29.

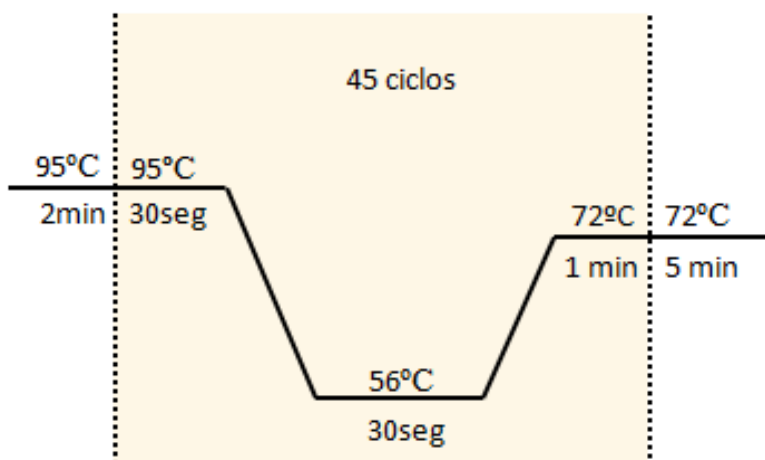


Figura 29. Ciclos de amplificação do PCR captura do método iPLEX Gold - Sequenom.

3.2.3.4.2 Tratamento com SAP

Após a reação de PCR, os produtos de amplificação passaram por um tratamento para neutralização dos dNTPs não incorporados, utilizando a enzima *shrimp alkaline phosphatase* (SAP). A SAP corta os fosfatos dos dNTPs não incorporados durante a reação de amplificação, convertendo-os em dNTPs não fosforilados e tornando-os inviáveis para futuras reações.

Para um volume final de 2 μL da reação SAP, foram utilizados: 1,53 μL de água, 0,17 μL de tampão SAP (10x), 0,30 μL de enzima SAP (1,7 U/ μL). Adicionou-se a cada amostra 2 μL da reação de SAP, a placa foi incubada a 37°C durante 40 minutos e a 85° C por 5 minutos para ação da enzima.

3.2.3.4.3 PCR de extensão – iPLEX Gold

Aos produtos de amplificação tratados são adicionados 2 μL do mix de extensão (*iPLEX Gold reaction*). Durante a reação, o *primer* se anela imediatamente *upstream* ao sítio polimórfico a ser genotipado. Na reação *iPLEX Gold Extend* os nucleotídeos utilizados apresentam massas modificadas (dideoxynucleotídeos-*iPLEX Terminator Mix*), levando a extensão de apenas uma base (SEB - *single extended base process*). A Reação *iPLEX Gold* gera produtos estendidos alelo-específicos de massas diferentes, dependendo do nucleotídeo que foi adicionado, ou seja, dependendo da forma alélica presente naquela amostra (Figura 26).

Mix de Extensão: para um volume final de 2 μL foram utilizados: 0,619 μL de água, 0,2 μL de tampão (*iPLEX Buffer Plus 10x*), 0,2 μL de *iPLEX Terminator Mix*, 0,94 μL de mix dos *primers* de extensão e 0,041 μL de enzima (*iPLEX enzyme*). As amplificações foram realizadas em aparelho termociclador Veriti® 386-Well Thermal Cycler (Applied Biosystems). As condições da PCR estão resumidas na Figura 30.

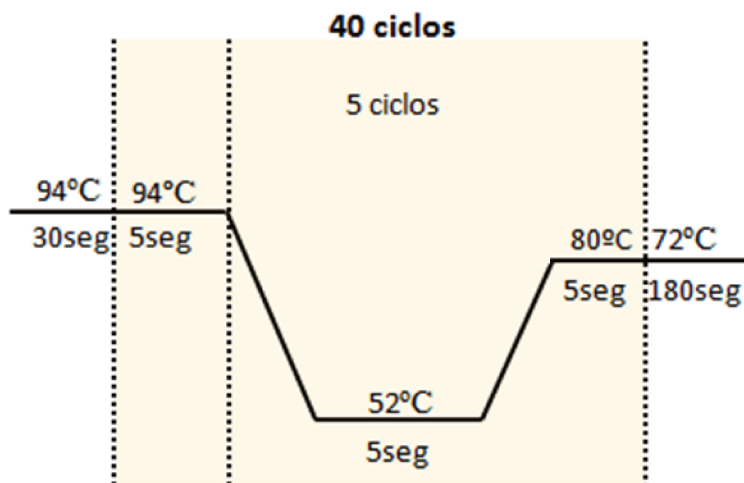


Figura 30. Ciclos de amplificação do PCR extensão do método *iPLEX Gold - Sequenom*.

3.2.3.4.4 Purificação dos produtos de PCR e Reação de espectrometria de massa

Antes da reação de espectrometria de massa, os produtos das reações de *iPLEX* foram submetidos a uma purificação com uma resina (*Clean Resin*) que removeu o excesso de íons, que poderiam interferir na leitura do laser. Foram adicionados 6mg de resina a cada poço da placa de 384 e a seguir foram acrescentados 16 μ L de água para completar um volume final de 25 μ L em cada amostra.

Após homogeneização e centrifugação as reações foram transferidas das placas de 384 para um SpectroCHIP, com o auxílio do *MassArray Nanodispenser* (Sequenom Inc., San Diego – USA). O SpectroCHIP foi analisado a partir do *MassArray Analyzer Compact* (Sequenom Inc., San Diego – USA), através da técnica de *MALDI-TOF MS* (*Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry*).

O processo *MALDI-TOF* é iniciado por uma desorção a laser da mistura analito-matrix (Irwin 2008), sendo o analito o produto de amplificação gerado e selecionado durante a reação *iPLEX*. Os subsequentes processos físicos resultam na predominante formação de íons carregados positivamente ou de íons carregados negativamente. Esses

íons são extraídos com um campo elétrico e separados em função de suas massas moleculares e de suas cargas. As massas dos compostos de ácidos nucleicos são calculadas através do “tempo de voo” (TOF), que reflete o tempo que o composto laser-ionizado e acelerado requer para ser levado através do tubo de voo (1-2m de comprimento) do analisador TOF e alcançar o detector do instrumento. No detector, os compostos ionizados geram um sinal elétrico que fica gravado por um sistema de dados e é finalmente convertido em um espectro de massa (Irwin 2008).

O software *MassArray TyperAnalyzer 3.4* acumula as informações geradas durante o processo descrito acima e fornece relatórios que descrevem todos os resultados das análises de cada uma das amostras avaliadas: genótipos e frequências são as principais informações resultantes deste sistema. Os componentes básicos de um espectrômetro de massa consistem de uma fonte de ionização (*laser UV*), um analisador e um detector, que estão mostrados na figura 31. O tempo total de processamento de uma placa contendo 384 amostras pode ser de 2 a 3 dias. O processo pode ser interrompido nas etapas pós-PCR, pós-SAP ou pós-Extend.

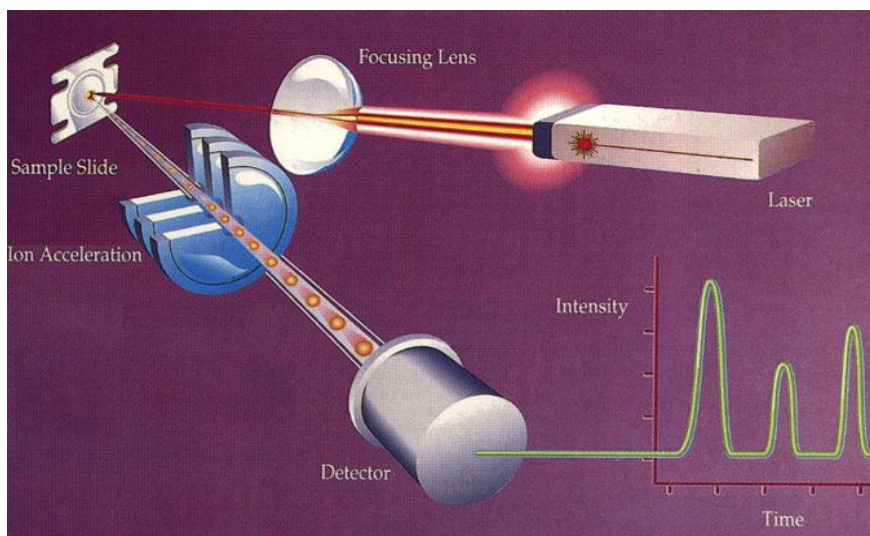


Figura 31. Componentes da Técnica de Espectrometria de massa por tempo de voo (TOF MS) através da Ionização/Dessorção a laser, assistido por uma matriz (MALDI).

RESULTADOS

4- RESULTADOS

Após o rastreamento das mutações mais frequentemente investigadas, foram selecionados 48 indivíduos monoalélicos para mutações no gene *GJB2* ou no gene *GJB6*.

Posteriormente, esses indivíduos foram analisados quanto a presença da deleção del(CHR13 :19,837,344-19, 968698) no gene *GJB6*, mutações no *cluster miR-183*, alterações como deleções ou duplicações no *locus* DFNB1 e mutações já descritas em 21 genes nucleares e 14 genes mitocondriais. Os resultados são descritos a seguir.

4.1 Rastreamento da deleção del(CHR13 :19,837,344-19, 968698)

A deleção del(CHR13 :19,837,344-19, 968698) no gene *GJB6* não foi identificada em nenhum dos indivíduos analisados. A figura 32 abaixo, ilustra o resultado obtido após a realização da técnica de PCR-*multiplex* para detecção da deleção del(CHR13 :19,837,344-19, 968698). Na ausência da mutação são gerados fragmentos de 836pb e na presença são amplificados fragmentos de 628pb.

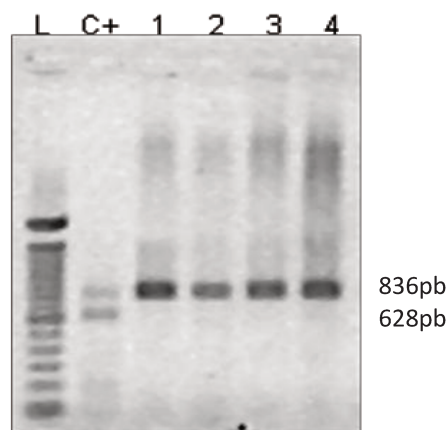


Figura 32. Resultado da pesquisa da del(CHR13 :19,837,344-19, 968698) por PCR dos indivíduos 1, 2, 3 e 4. L= Ladder; C= controle heterozigoto enviado pela Dra.Friderici (Michigan-EUA).

4.2 Rastreamento de mutações no *cluster miR-183*

Inicialmente mutações no *cluster miR-183* foram investigadas em 48 indivíduos heterozigotos para mutações no gene *GJB2* ou no gene *GJB6*.

Além disso, para estimar a frequência de mutações no *cluster miR-96,183,182* foram analisados 473 indivíduos com perda auditiva não-sindrômica, não relacionados, que não apresentavam nenhuma mutação nos genes *GJB2* ou *GJB6* e permaneciam sem diagnóstico molecular esclarecido.

Dessa forma, a análise do *cluster miR-183* foi realizada em um total de 521 indivíduos com surdez sensorineural não-sindrômica. Esses indivíduos foram divididos em dois grupos:

Grupo I: 48 indivíduos heterozigotos para mutações no gene *GJB2* ou no gene *GJB6*.

Grupo II: 473 indivíduos que não apresentaram alterações no gene *GJB2* e ou as deleções *del(GJB6-D13S1830)* e *del(GJB6-D13S1854)* no gene *GJB6* (Figura 33).

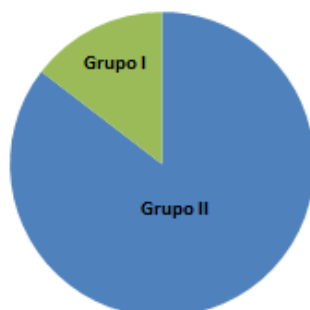


Figura 33. Representação gráfica dos grupos de pacientes rastreados para mutações no *cluster miR-183*.

4.2.1 Amplificação do *cluster miR-183*

Foram desenhados 2 pares de *primers* para análise do *cluster miR-183/96/182*. O *miR-96* e *miR-183* foram analisados na mesma amplificação. A figura 34 abaixo, apresenta o gel de agarose exemplificando o resultado da amplificação do *miR-96/183* nos indivíduos 1 a 11, e *miR-182* nos indivíduos 1 a 8.

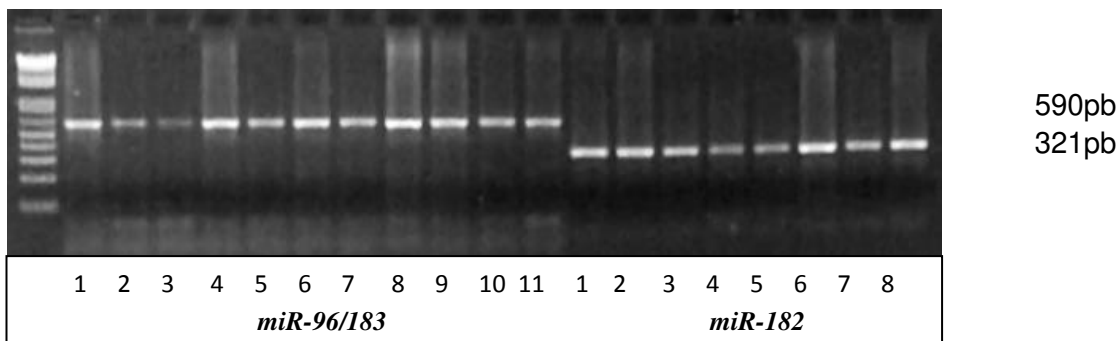


Figura 34. Gel de agarose apresentando o produto de PCR para sequenciamento do *miR-96/183* e *miR-182*.

4.2.2 Rastreamento de mutações no *cluster miR-183* nos indivíduos do Grupo I.

4.2.2.1 Análise do *miR-96/183*

No Grupo I, na região envolvendo os *miR-96/183*, analisada por sequenciamento, foram detectados dois polimorfismos conhecidos em banco de dados. O *SNP* rs74994806 no *miR-96* foi detectado em heterozigose em 2 indivíduos heterozigotos para a mutação c.35delG, e em 1 indivíduo heterozigoto para a deleção del(*GJB6-D13S1854*) (Figura 35). O *SNP* rs72631833 no *miR-183* foi detectado em 1 indivíduo heterozigoto para a mutação c.35delG (Figura 36).

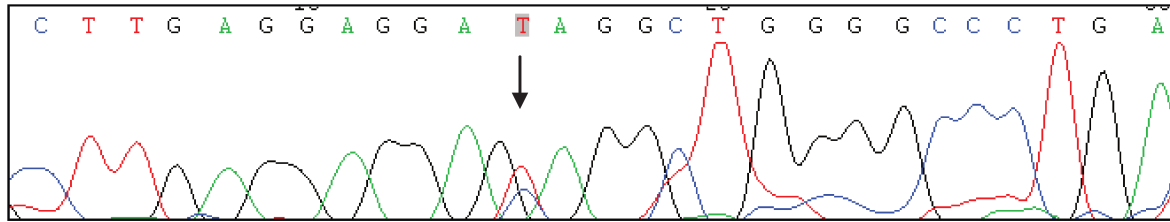


Figura 35. Eletroferograma mostrando em destaque a alteração C>T (Crom.7:129414474) referente ao *SNP* rs74994806.

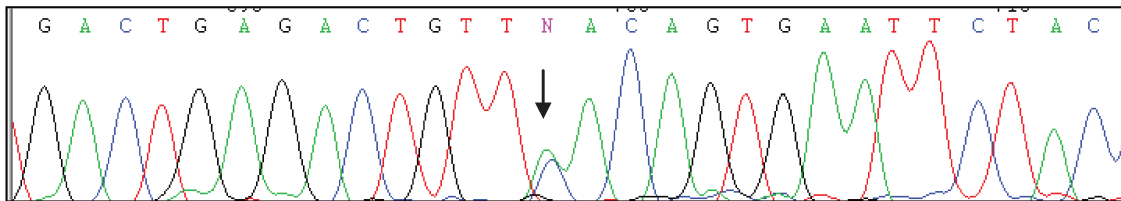


Figura 36. Eletroferograma mostrando em destaque a alteração C>A (Crom.7: 129414804) referente ao *SNP* rs72631833.

O polimorfismo rs72631833 está localizado na posição 51 da sequência madura do pré-*miR-183*, próxima a região *seed*, como mostra a figura 37.

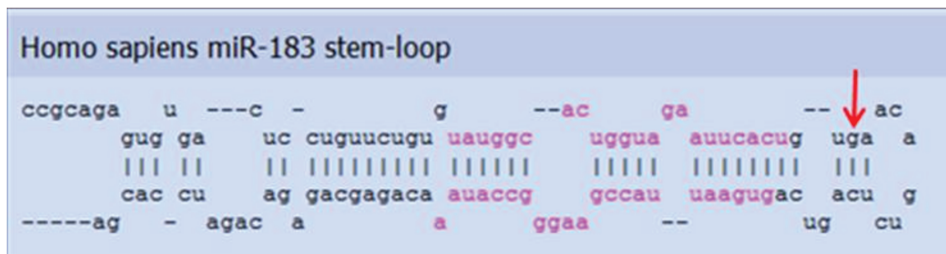


Figura 37. Sequência mostrando em destaque a localização do polimorfismo rs72631833 no *miR-183*. A região em rosa indica a sequência *seed*, importante para o reconhecimento do mRNA alvo.

4.2.2.2 Análise do *miR-182*

Ainda no Grupo I, na região envolvendo o *miR-182* foram detectados 3 polimorfismos, sendo dois *SNPs* conhecidos em banco de dados, rs4467881 e rs4541843 mostrados nas figuras 88

38 e 39 respectivamente, e o polimorfismo rs76481776 (Figura 40) identificado anteriormente por Mência e colaboradores (2009), na posição 106 do pré-*miR-182*, fora da sequência *seed* do microRNA. A localização é mostrada na figura 41. Os *SNPs* rs4467881 e rs4541843 foram encontrados na maioria dos indivíduos analisados, e o *SNP* rs76481776 foi encontrado em 9 indivíduos heterozigotos para a mutação c.35delG e em 1 indivíduo heterozigoto para a mutação K168R no gene *GJB2*.

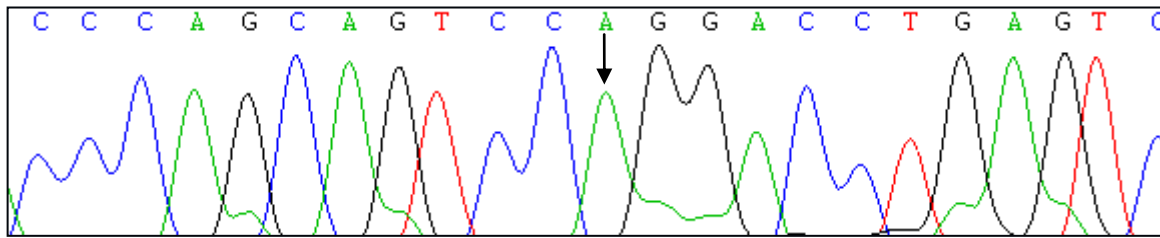


Figura 38. Eletroferograma mostrando em destaque a alteração G>A em homozigose (Crom.7: 129410144) referente ao *SNP* rs4467881.

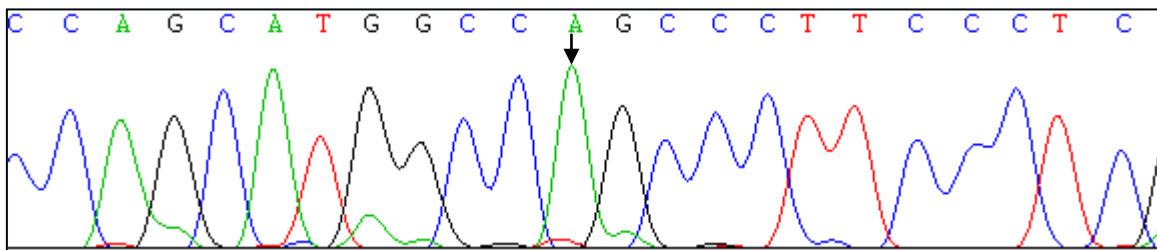


Figura 39. Eletroferograma mostrando em destaque a alteração G>A em homozigose (Crom.7: 129410195) referente ao *SNP* rs4541843.

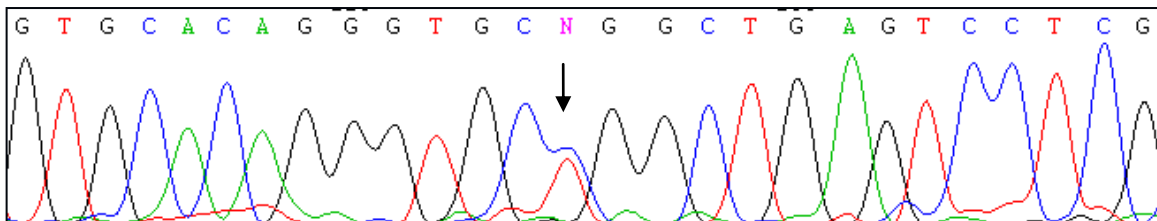


Figura 40. Eletroferograma mostrando em destaque a alteração C>T (Crom.7: 129410227) referente ao *SNP* rs76481776.

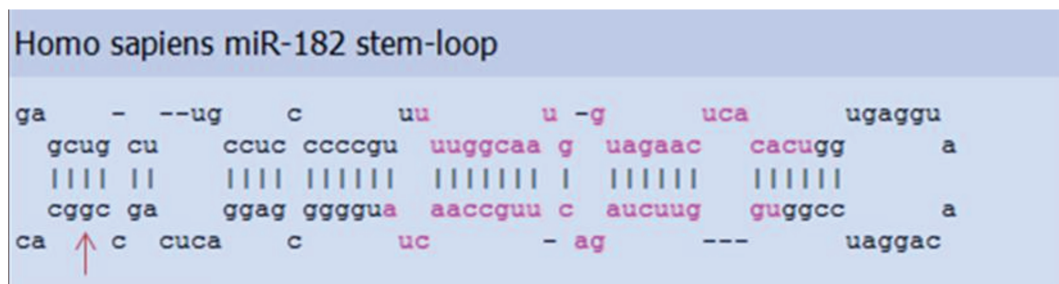


Figura 41. Sequência mostrando a localização do polimorfismo rs76481776 no pré-miR-182.

A tabela 14 a seguir apresenta os resultados dos polimorfismos encontrados no *cluster miR-183* nos indivíduos do Grupo I, monoalélicos para mutações no *locus* DFNB1 (gene *GJB2* e *GJB6*).

Tabela 14. Alterações encontradas no *cluster miR-183* em pacientes monoalélicos DFNB1.

INDIVÍDUO	ID	GENÓTIPO	Mir-96	Mir-183	Mir-182
1	1B	c.35delG/N	Normal	Normal	rs76481776
2	16B	c.35delG/N	Normal	Normal	rs4467881; rs4541843
3	54B	c.35delG/N	Normal	Normal	rs4467881; rs4541843
4	71B	c.35delG/N	Normal	Normal	rs4467881; rs4541843; rs76481776
5	103B	c.35delG/N	Normal	Normal	rs4467881; rs4541843; rs76481776
6	27E	c.35delG/N	Normal	Normal	rs4467881; rs4541843
7	58E	c.35delG/N	Normal	Normal	rs4467881; rs4541843
8	146C	c.35delG/N	Normal	Normal	rs4467881; rs4541843
9	29L	c.35delG/N	rs74994806	Normal	rs4467881
10	219Oto	c.35delG/N	Normal	Normal	rs4467881; rs4541843
11	232Oto	c.35delG/N	Normal	Normal	rs4467881; rs4541843
12	257Oto	c.35delG/N	Normal	Normal	rs4467881
13	261Oto	c.35delG/N	Normal	Normal	rs4467881
14	275Oto	c.35delG/N	Normal	Normal	rs4467881; rs4541843

15	276Oto	c.35delG/N	Normal	Normal	rs4467881; rs4541843; rs76481776
16	391Oto	IVS1+1G>A/N	Normal	Normal	rs4467881; rs4541843
17	396Oto	c.35delG/N	Normal	Normal	rs4467881; rs4541843
18	449Oto	c.35delG/N	Normal	Normal	rs4467881; rs4541843
19	503Oto	c.35delG/N	Normal	Normal	rs4467881; rs4541843
20	508Oto	c.35delG/N	Normal	Normal	Normal
21	509Oto	c.35delG/N	Normal	Normal	rs4467881; rs4541843
22	539Oto	c.35delG/N	Normal	Normal	Normal
23	571Oto	c.35delG/N	Normal	Normal	rs4467881; rs4541843
24	574Oto	c.35delG/N	Normal	Normal	rs4467881; rs76481776
25	578Oto	c.35delG/N	Normal	Normal	rs76481776
26	628Oto	Del(<i>GJB6</i> -D13S1854)	Normal	Normal	rs4467881; rs4541843
27	660Oto	c.35delG/N	Normal	Normal	rs4467881; rs4541843
28	683Oto	c.35delG/N	Normal	Normal	rs4467881; rs4541843
29	39I	c.35delG/N	Normal	Normal	rs4467881; rs4541843
30	56I	c.35delG/N	Normal	Normal	rs4467881; rs76481776
31	118I	c.35delG/N	Normal	Normal	rs4467881; rs76481776
32	119I	c.35delG/N	Normal	Normal	rs4467881; rs4541843
33	23PM	c.35delG/N	Normal	Normal	rs4467881; rs4541843
34	56PM	c.35delG/N	Normal	Normal	rs4467881; rs4541843
35	72 PM	K168R/N	Normal	Normal	rs4467881; rs4541843
36	74PM	c.35delG/N	Normal	Normal	rs4467881; rs4541843
37	90 PM	c.35delG/N	Normal	Normal	rs4467881; rs4541843
38	113PM	c.35delG/N	Normal	Normal	rs4467881; rs4541843
39	138PM	c.35delG/N	Normal	Normal	rs4467881; rs4541843
40	69A	K168R/N	Normal	Normal	rs76481776, rs4467881, rs4541843

41	87A	K168R/N	Normal	Normal	rs4467881; rs4541843
42	92A	E147K	Normal	Normal	rs4467881; rs4541843
43	72Ex	c.35delG/N	Normal	Normal	rs76481776
44	1A.	V37I/N	Normal	Normal	rs4467881; rs4541843
45	01 Unif	c.35delG/N	rs74994806	Normal	rs4467881; rs4541843
46	03 Unif	Del(<i>GJB6</i> -D13S1854)	rs74994806	Normal	rs4467881; rs4541843
47	08 Unif	c.35delG/N	Normal	Normal	rs4467881; rs4541843
48	17 Unif	c.35delG/N	Normal	rs72631833	Normal

4.2.3 Rastreamento de mutações no *cluster miR-183* nos indivíduos do Grupo II.

4.2.3.1 Análise do *miR-96/183*

Dentre os 473 indivíduos com surdez não-sindrômica do Grupo II, na região envolvendo os *miR-96/183* foram detectados 3 polimorfismos já descritos em banco de dados. O *SNP* rs73159662 foi encontrado em 4 indivíduos, o *SNP* rs41274239 em 1 indivíduo e o *SNP* rs77887327 também em 1 indivíduo. Essas alterações são mostradas nas figuras 42, 43 e 44 respectivamente.

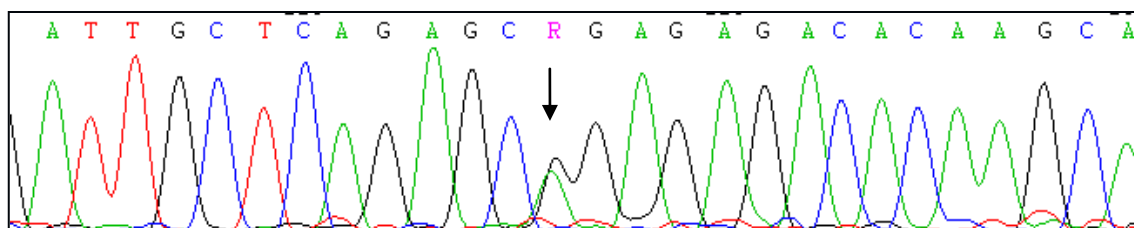


Figura 42. Eletroferograma mostrando em destaque a alteração G>A (Crom.7: 129414568) referente ao *SNP* rs73159662.

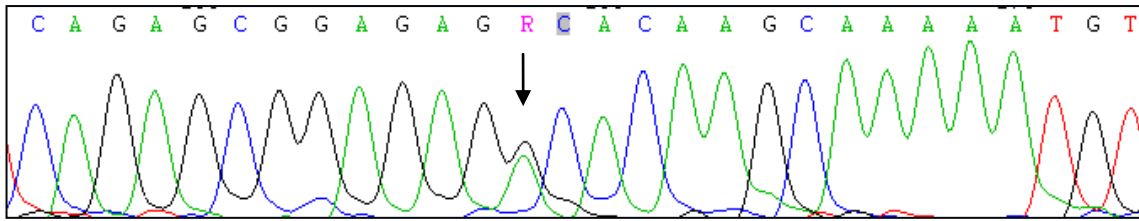


Figura 43. Eletroferograma mostrando em destaque a alteração A>G (Crom.7: 129414574) referente ao *SNP* rs41274239.

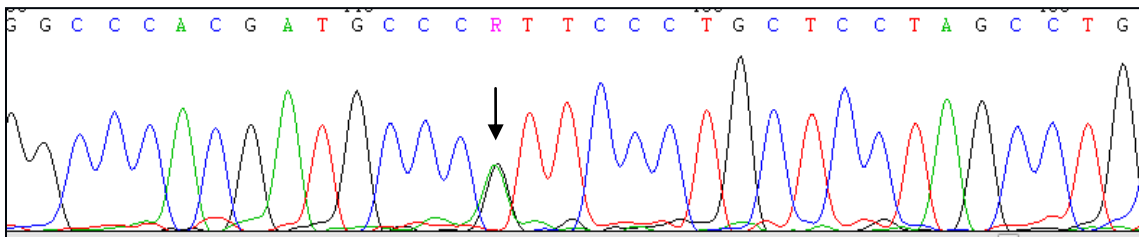


Figura 44. Eletroferograma mostrando em destaque a alteração G>A (Crom.7: 129414895) referente ao *SNP* rs77887327.

Ainda no Grupo II, foram detectadas duas alterações ainda não descritas. Em 1 indivíduo foi encontrada uma troca de uma Adenina por uma Guanina na posição 129414878 do Cromossomo 7, localizada a 24 nucleotídeos *upstream* do gene *miR-183* (Figura 45). Em outro indivíduo foi encontrada uma troca de uma Guanina por uma Adenina na posição 129414618 do Cromossomo 7 (Figura 46), localizada a 9 nucleotídeos *upstream* do gene *miR-96* e a 127 nucleotídeos *downstream* do gene *miR-183*.

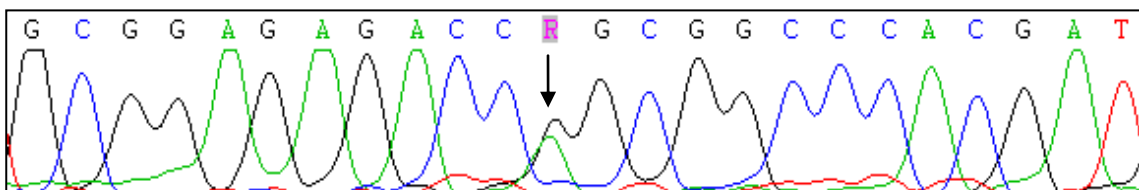


Figura 45. Eletroferograma mostrando em destaque a alteração A>G identificada na posição 129414878 do Cromossomo 7.

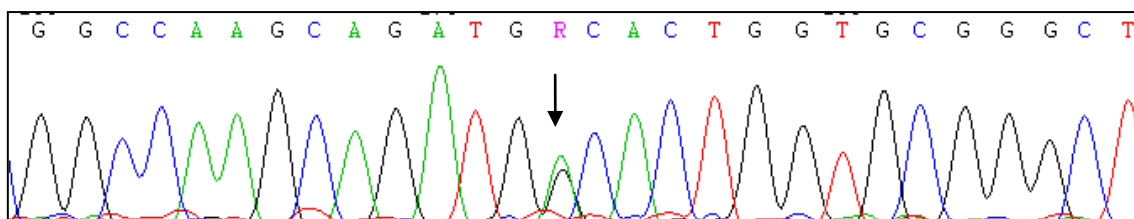


Figura 46. Eletroferograma mostrando em destaque a alteração G>A identificada na posição 129414618 do Cromossomo 7.

- No grupo II nenhuma alteração foi encontrada no *miR-183*.

4.2.3.2 Análise do *miR-182*

Quanto as alterações encontradas na região do *miR-182*, em 1 indivíduos do Grupo II foi encontrada uma troca de uma Citosina por uma Guanina na posição 129410239 do Cromossomo 7, que se trata do polimorfismo rs80041074 já conhecido em banco de dados (Figura 47). Além desse *SNP*, os polimorfismos rs4467881, rs4541843, rs76481776, que já haviam sido identificadas no Grupo I, foram encontradas na maioria dos indivíduos estudados.

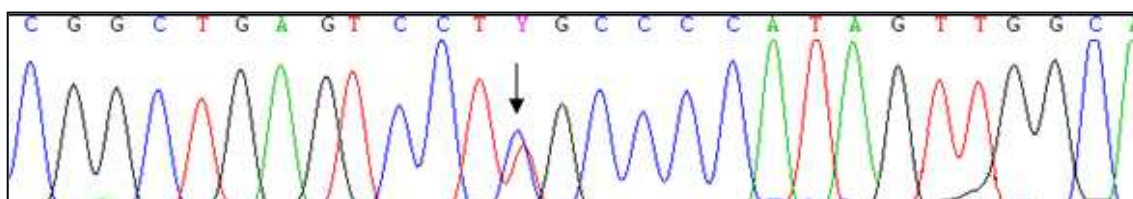


Figura 47. Eletroferograma mostrando em destaque a alteração C>T identificada na posição 129410239 do Cromossomo 7 referente ao *SNP* rs80041074.

4.3. Resultados da genotipagem utilizando a Técnica de Espectrometria de Massa

4.3.1 Rastreamento de deleções ou duplicações no *locus* DFNB1

Utilizando ensaios iPLEX® Gold Genotyping da técnica de espectrometria de Massa-Sequenom, foram rastreadas pequenas deleções ou duplicações no *locus* DFNB1 em 48 indivíduos heterozigotos. Para cada indivíduo foram necessários 2 *wells* do *SpectroCHIP*® *arrays* para a análise dos 41 *SNPs* utilizados como marcadores nesse estudo. Dessa forma, foram realizadas 108 reações (48 amostras + 6 controles x 2 *wells*) de genotipagem gerando 2.214 resultados.

Para a análise dos dados foram utilizados 2 métodos, um deles baseado nas áreas dos picos obtidas pela amplificação dos *SNPs* e o outro na análise do genótipo de cada *SNP* dos indivíduos estudados.

Inicialmente, todos os dados de área de cada pico de amplificação dos 41 *SNPs* de cada indivíduo, foram anotados em uma planilha específica utilizando o software Microsoft® Office Excel®. Planilha Excel. A planilha é composta pela identificação de cada *SNP*, identificação dos indivíduos estudados, posição sequencial dos *SNPs* no cromossomo 13, alelos identificados em cada ensaio, além dos dados de área dos picos de amplificação dos *SNPs*.

Apenas os resultados dos 3 controles negativos e 3 controles positivos são mostrados no anexo 5, já que, a descrição de todos os resultados nesta apresentação seria inviável. Os controles positivos são amostras de indivíduos que apresentam as deleções já descritas no gene *GJB6*, dois deles a deleção del(*GJB6*-D13S1854) e o outro a deleção del(*GJB6*-D13S1830). Controles negativos são amostras de indivíduos ouvintes sem deleções no gene *GJB6*. Quatro *SNPs* apresentaram problemas de amplificação, e por terem falhado em todas as amostras foram excluídos das análises.

Após normalização dos dados foram gerados gráficos baseados em programa *Excel Microsoft Office 2007* para uma melhor visualização e comparação entre os controles positivos e negativos, como mostrados abaixo na figura 48. Tecnicamente, os dados são normalizados

dividindo-se a área do pico de cada *SNP*, pela média das áreas dos picos dos controles negativos do *SNP* correspondente.

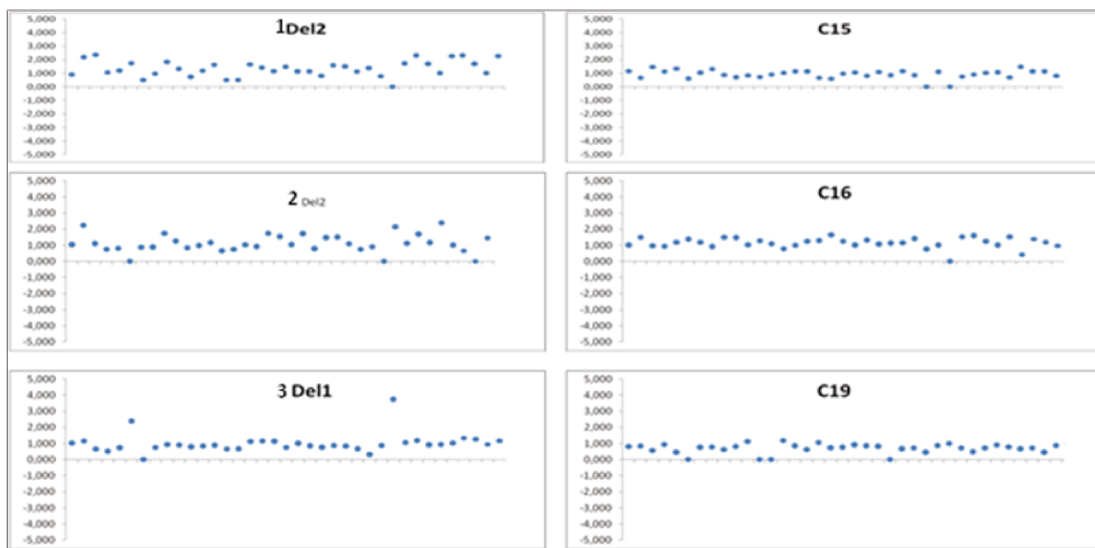


Figura 48. Gráficos gerados após normalização das áreas dos picos de amplificação de cada *SNP*. Cada ponto representa um *SNP*.

Analisando os gráficos não foram observadas diferenças relevantes entre os resultados dos controles positivos e negativos.

No segundo método de análise dos dados, foram observados *SNPs* em homozigose sequencial em um mesmo indivíduo. Para melhor visualização cada indivíduo foi representado pelo desenho de uma barra como mostra a figura 46. Cada barra foi dividida pelo número de *SNPs* analisados. Os ensaios que apresentaram problemas não foram considerados. Todos os *SNPs* que foram observados em homozigose foram destacados pela cor laranja, e os heterozigotos em branco. Por este tipo de análise foi possível observar nos controles positivos a presença de um grande número de *SNPs* sequencialmente em homozigose, nas regiões da deleção. Nos controles negativos o padrão observado é visivelmente diferente. Da mesma forma, na análise das amostras dos indivíduos estudados foram identificados 4 indivíduos que

apresentaram um grande número de *SNPs* aparentemente em homozigose localizados de forma contígua (Figura 49).

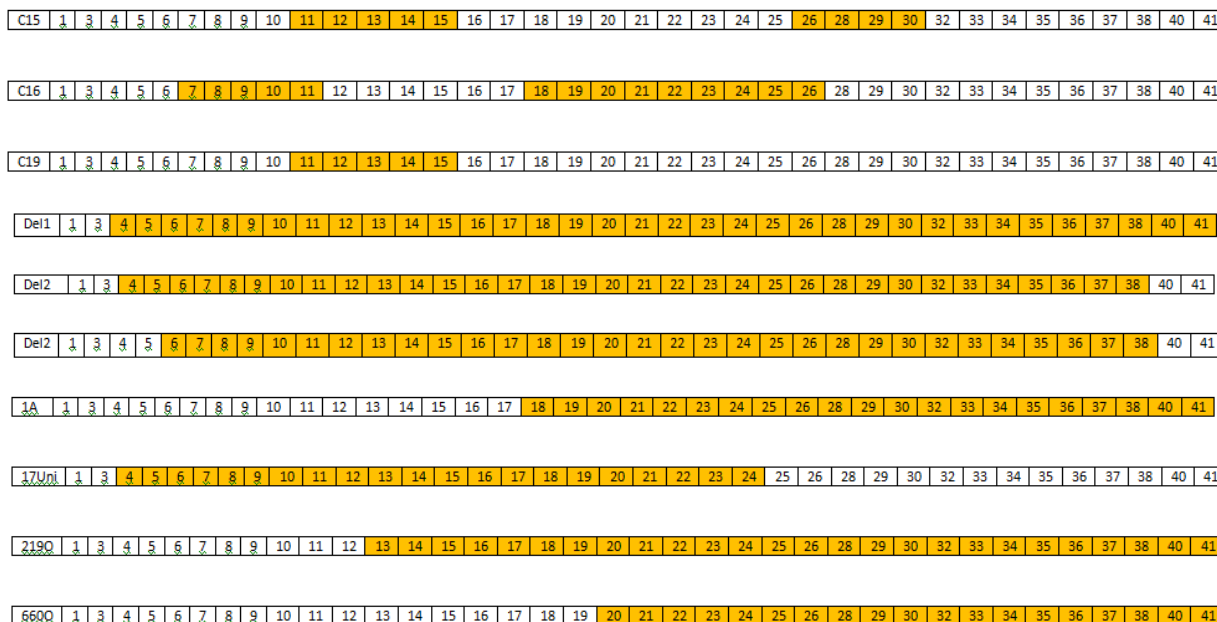


Figura 49. Análise dos dados baseado no genótipo de cada *SNP*. Cada barra representa um indivíduo. Cada *SNP* foi representado por um quadrado com números, que são sequenciais de acordo com a localização do *SNP* no *locus*. Quadrados de cor laranja indicam *SNPs* em homozigose, de cor branca *SNPs* em heterozigose. C15, C16 e C19 são controles negativos. Del1 e Del2 são controles positivos para as deleções del(*GJB6*-D13S1830 e del(*GJB6*-D13S1854) respectivamente. 1A, 17Uni, 219O, 660O são amostras de indivíduos que podem ser portadores de deleções ainda não descritas.

4.3.2. Rastreamento de mutações nos principais genes, nucleares e mitocondriais, envolvidos na perda auditiva.

Foram rastreadas 104 mutações em 21 genes nucleares, e 50 mutações em 14 genes mitocondriais, em 48 pacientes heterozigotos para mutações no *locus* DFNB1. Para tanto se utilizou o método iPLEX® Gold Genotyping da Técnica de Espectrometria de Massa-Sequenom. Todos os ensaios foram analisados utilizando o *software* Typer Analyser versão 4.0 do MALDI-TOF MS Analysis- iPLEX® Gold Genotyping. Neste programa, um espectro

mostra os picos relevantes para um determinado ensaio destacados por linhas coloridas (azul ou vermelho). Picos identificados com linhas em cinza são de outros ensaios (Figura 48a). Um gráfico também é gerado mostrando um *cluster* dos genótipos de todas as amostras testadas no ensaio selecionado. Este gráfico divide os alelos em *clusters* de heterozigotos e homozigotos de forma igualitária, sem considerar maior frequência de algum deles (Figura 49b).

4.3.2.1. Mutações identificadas em genes nucleares

4.3.2.1.1 Alteração p.V609G – Gene *SLC26A4*

A alteração p.V609G foi identificada em heterozigose nos pacientes 103Ba e 17 Unif. A mutação p.V609G ocorre no éxon 17 do gene *SLC26A4* e trata-se da troca da base Timina para Guanina na posição 1826 do gene, resultando na troca do aminoácido Valina para Glicina no códon 609 da proteína (Figura 50).

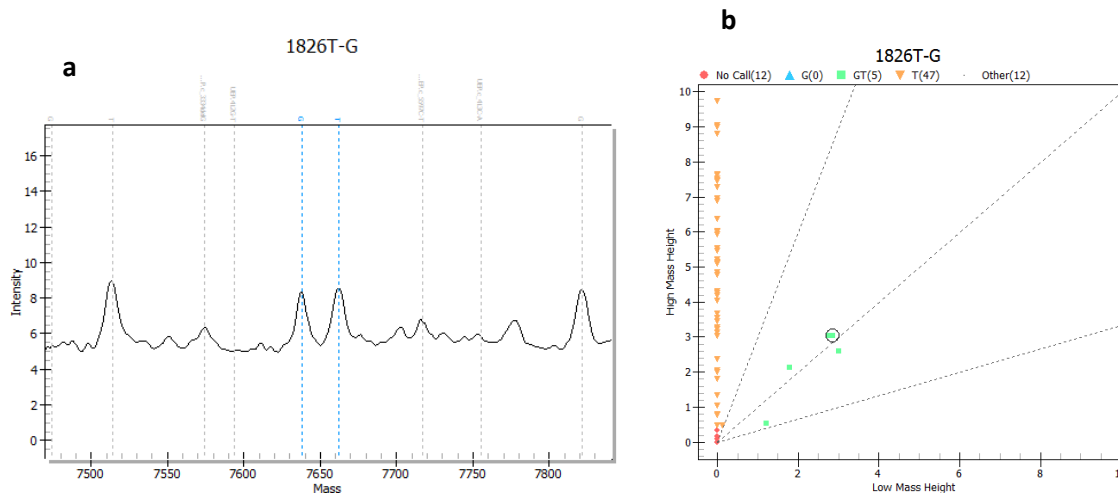


Figura 50. Detecção da alteração p.V609G. (a) Espectro e (b) gráfico gerados no *software Typer Analyser* versão 4.0 do *MALDI-TOF MS Analysis- iPLEX® Gold Genotyping – Sequenom*.

4.3.2.1.2 Alteração p.C282Y - Gene *SLC26A4*

A alteração p.C282Y foi identificada em heterozigose no paciente 503Oto. Essa mutação leva a troca da base Guanina para Adenina no éxon 7, na posição 845 do gene *SLC26A4* resultando na troca do aminoácido Cisteína por Tirosina no códon 282 da proteína (Figura 51).

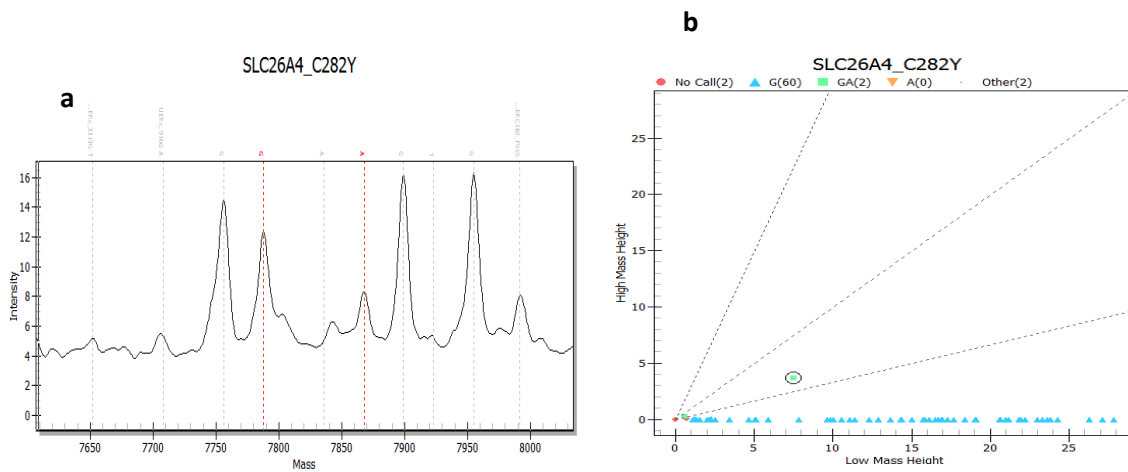


Figura 51. (a) Espectro mostrando a detecção da alteração p.C282Y em heterozigose. (b) Gráfico do ensaio mostrando resultados de todos os pacientes testados. Paciente 503Oto em destaque.

4.3.2.1.3 Alteração p.R1746Q – Gene *CDH23*

No paciente 03Unif foi identificada a mutação p.R1746Q em heterozigose. Essa mutação no éxon 9, leva a troca da base Guanina para Adenina na posição 5237 do gene *CDH23*, resultando na troca do aminoácido Arginina por Glutamina no códon 1746 da proteína (Figura 52).

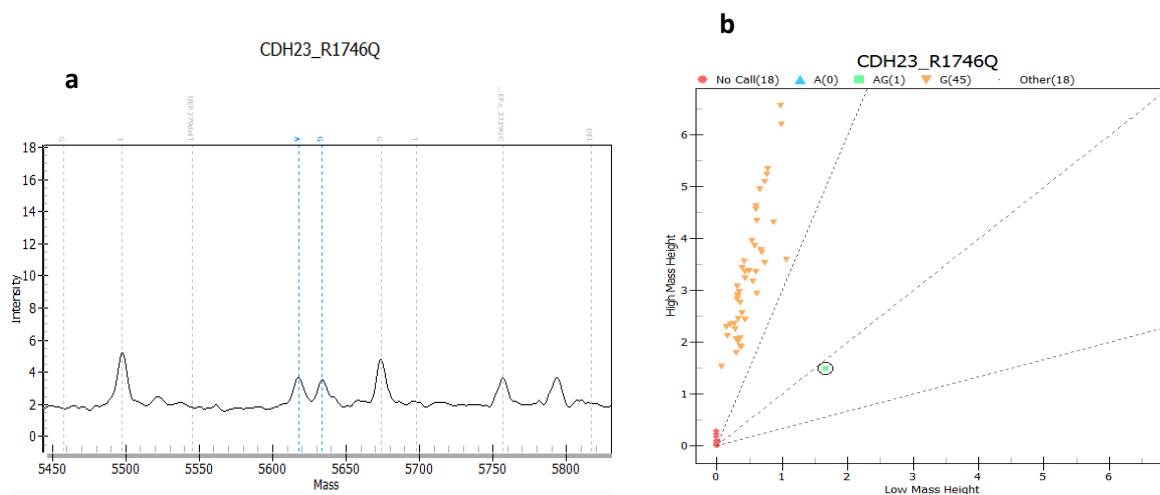


Figura 52. (a) Espectro mostrando a detecção da alteração p.R1746Q. (b) Gráfico do ensaio indicando em destaque o resultado do paciente 03Unif.

4.3.2.1.4 Alteração p.R301Q – Gene *CDH23*

A mutação p.R301Q causa a mudança da base Guanina por Adenina na posição 902 do gene *CDH23*, levando a troca do aminoácido Arginina para Glutamina no códon 301 da proteína. Essa mutação foi identificada em homozigose no paciente 574Oto (Figura 53).

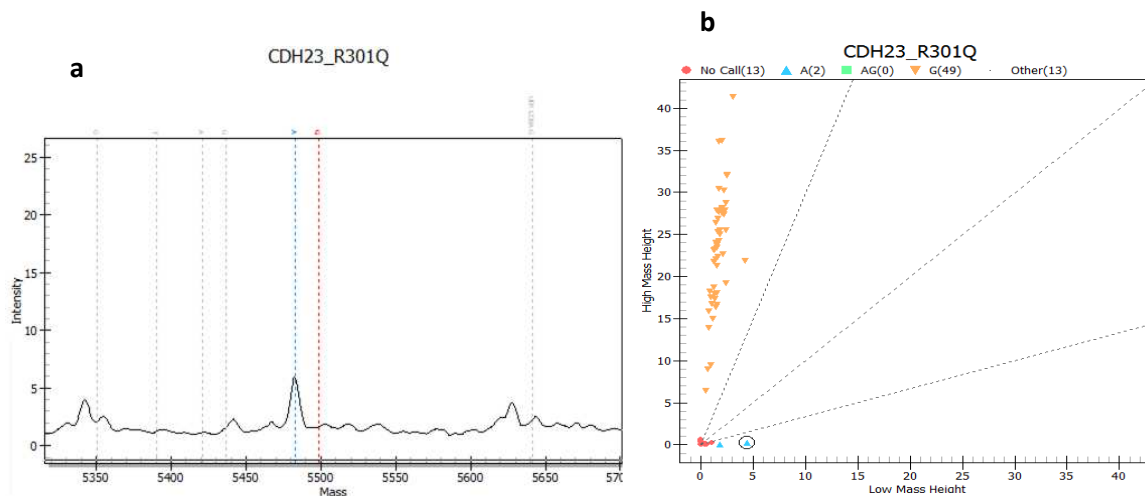


Figura 53. (a) Espectro mostrando a detecção da alteração p.R301Q. (b) Gráfico indicando em destaque o resultado do indivíduo 574Oto.

4.3.2.2 Mutações identificadas em genes mitocondriais

Dentre os 48 indivíduos analisados, foram identificadas 8 diferentes alterações em 18 indivíduos heterozigotos para mutações no *locus* DFNB1.

4.3.2.2.1 Alteração m.4363T>C

A alteração m.4363T>C foi identificada em todos os indivíduos analisados nesse estudo. Essa alteração resulta na troca da base Timina para Citosina na posição 4363 do gene *MT-TQ* que codifica o tRNA^{Gln} (Figura 54).

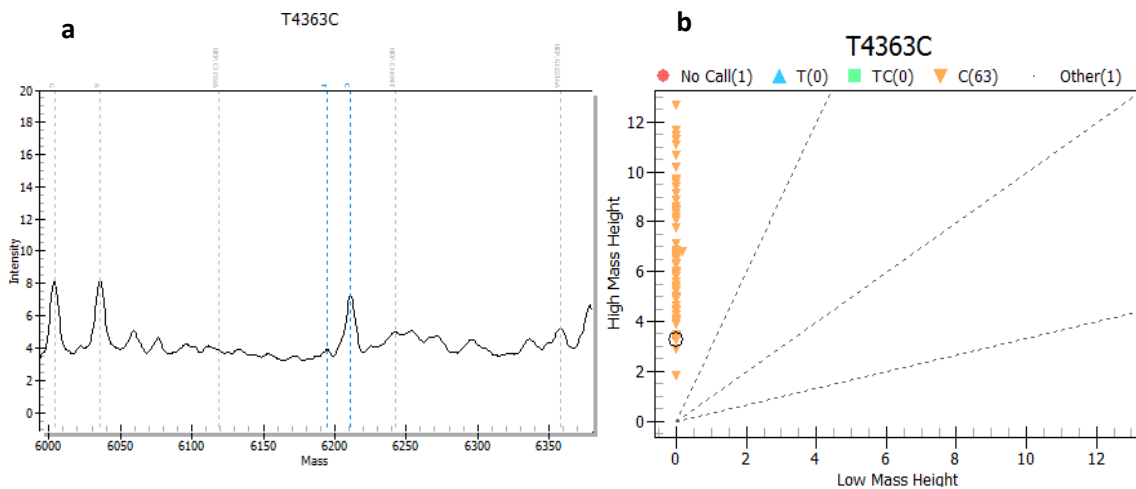


Figura 54. (a) Espectro e (b) gráfico da alteração m.4363T>C. Todos os indivíduos apresentaram o mesmo genótipo gerando apenas um *cluster*.

4.3.2.2.2 Alteração m.709G>A

A alteração 709 G>A se refere a troca da base Guanina para Adenina na posição 709 do gene *MT-RNR1* que codifica a subunidade 12S rRNA (Figura 55). Essa alteração foi encontrada em 7 indivíduos 29Li, 276Oto, 508Oto, 539Oto, 72PM, 90PM, 01Unif (Resumo dos resultados na tabela 15).

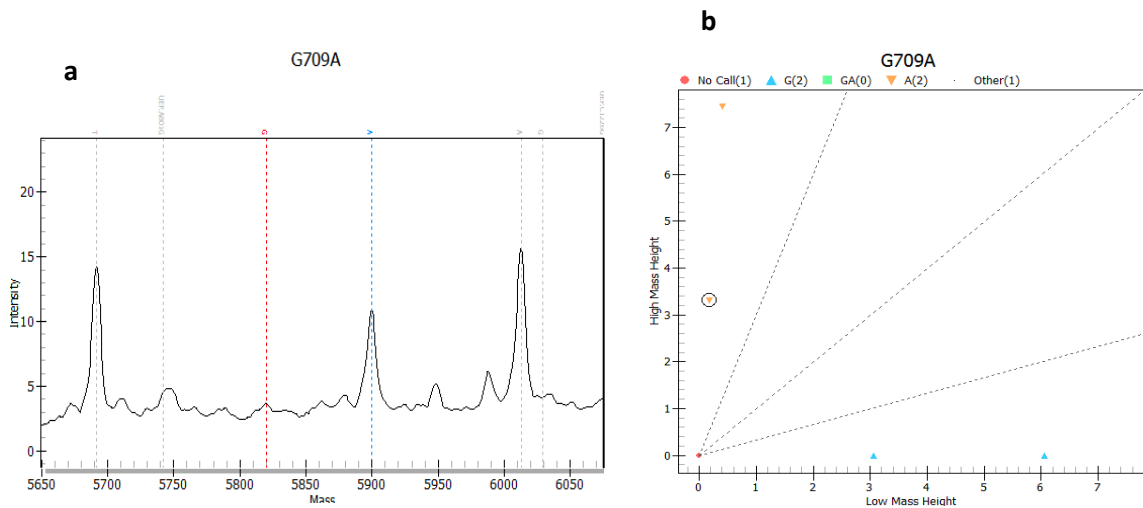


Figura 55. (a) Espectro mostrando a detecção da alteração m.709 G>A (b) Gráfico da alteração m.709 G>A. Em destaque no gráfico o resultado do indivíduo portador da alteração em homoplasma.

4.3.2.2.3 Alteração m.5655T>C

Esta alteração leva a troca da base Timina para Citosina na posição 5655 do gene *MT-TA* que codifica o tRNA^{Ala} (Figura 56). Ela foi encontrada em 3 indivíduos (539Oto, 574Oto e 90PM), 2 deles também portadores da alteração mitocondrial m.709 G>A.

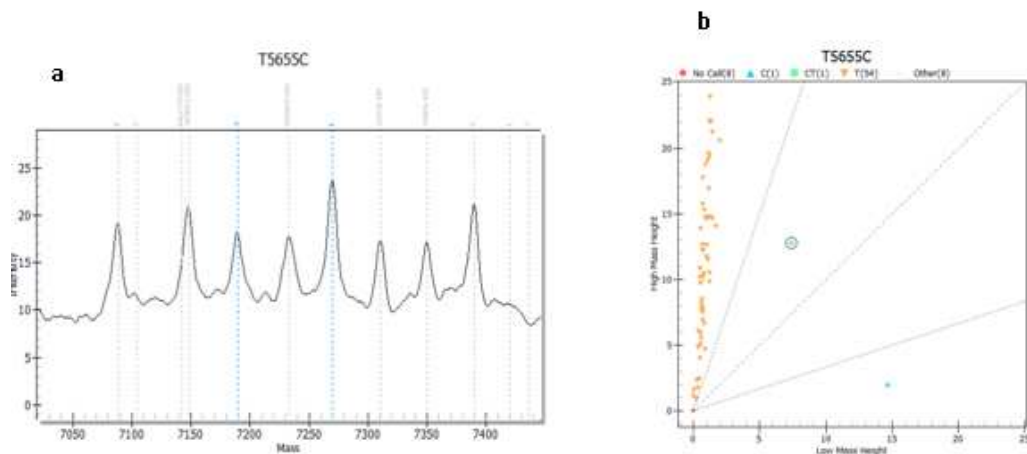


Figura 56. (a) Espectro e (b) gráfico da alteração m.5655T>C. Em destaque no gráfico resultado de um indivíduo portador da alteração em heteroplasma.

4.3.2.2.4 Alteração m.12236G>A

A alteração 12236G>A leva à mudança da base Guanina para Adenina na posição 12236 do gene *MT-TS2* que codifica o tRNA^{Ser} (Figura 57). Essa alteração foi encontrada em apenas 1 indivíduo (54B).

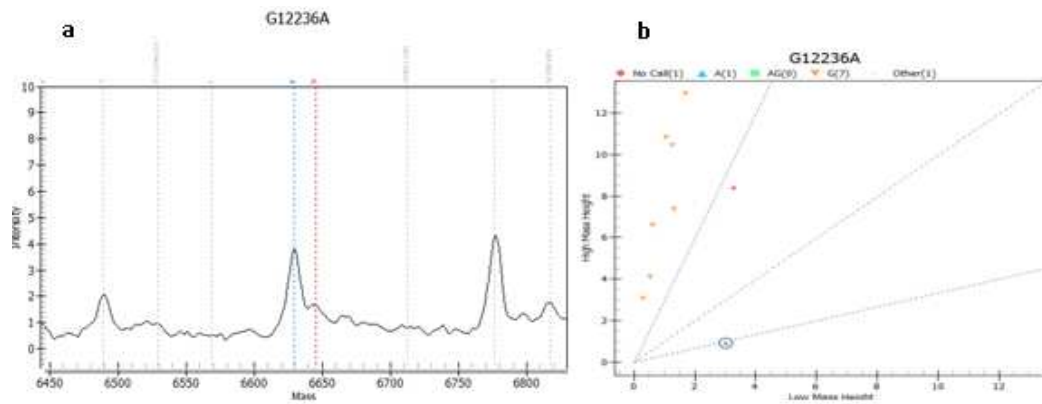


Figura 57. (a) Espectro mostrando a detecção da alteração m.12236G>A (b) Em destaque no gráfico o resultado de um indivíduo portador da alteração em homoplasmia.

4.3.2.2.5 Alteração m.988G>A

Esta alteração causa a troca da base Guanina para Adenina na posição 988 do gene *MT-RNR1* que codifica a 12S rRNA (Figura 58). Ela foi identificada em 1 paciente (118I) também portador da mutação mitocondrial m.5628T>C.

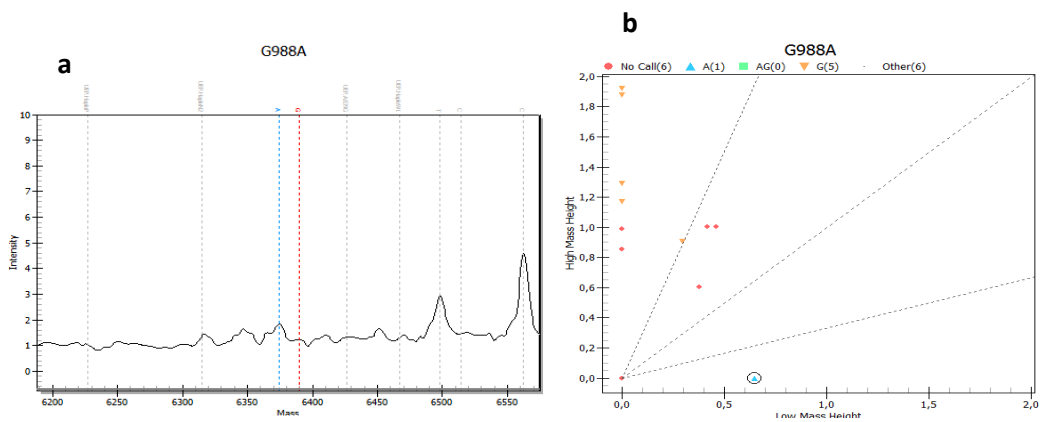


Figura 58. (a) Espectro mostrando a detecção da alteração m.988G>A. (b) Em destaque no gráfico o resultado do indivíduo 118I portador da alteração m.988G>A em homoplasmia.

4.3.2.2.6 Alteração m.5628T>C

A alteração m.5628T>C leva a troca da base Timina por uma Citosina na posição 5628 do gene *MT-TA* que codifica o tRNA^{Ala} (Figura 59). Esta alteração foi identificada em 1 indivíduo (118I) também portador da alteração mitocondrial m.988G>A.

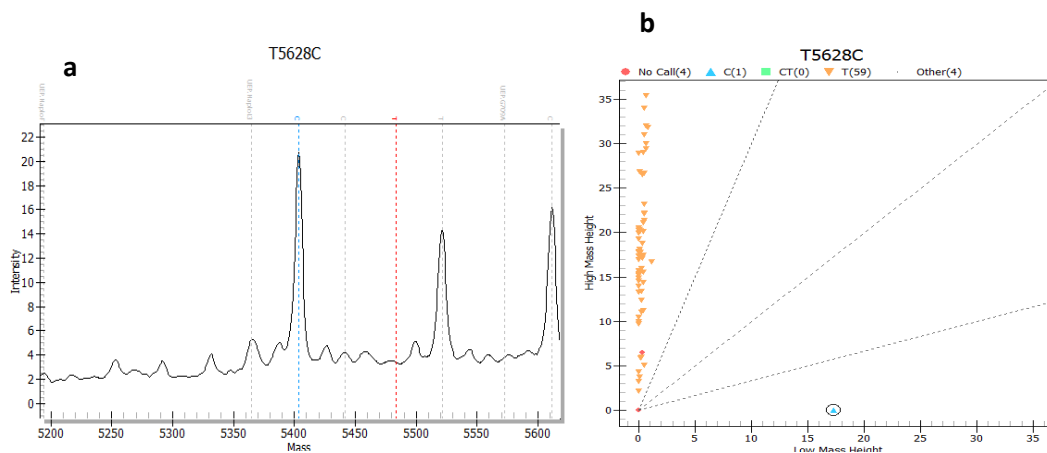


Figura 59. (a) Espectro mostrando a detecção da alteração m.5628T>C. (b) Em destaque no gráfico o resultado de um indivíduo portador da alteração em homoplasmia. Os demais indivíduos sem a alteração foram agrupados em outro *cluster*.

4.3.2.2.7 Alteração m.1027A>G

Esta alteração se refere a troca da base Adenina para Guanina na posição 1027 do gene *MT-RNR1* que codifica a 12S rRNA (Figura 60). Ela foi encontrada em heteroplasmia em 2 indivíduos (628Oto e 8Unif.).

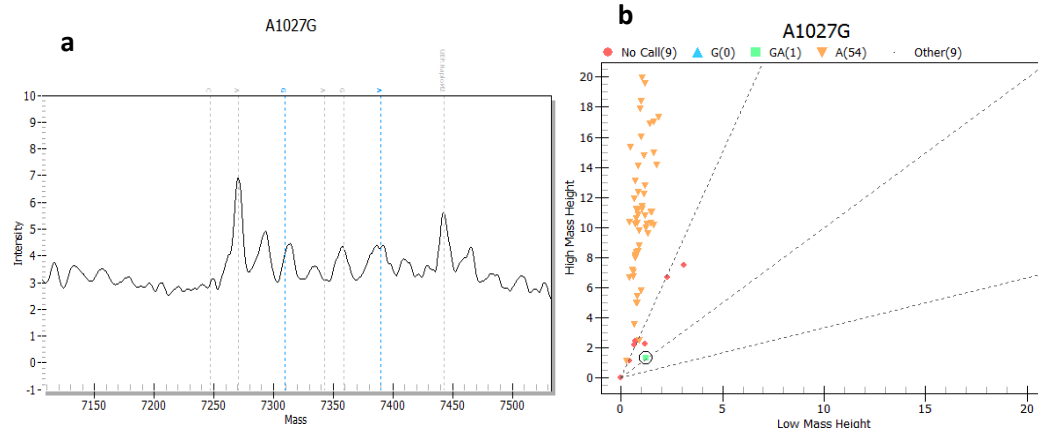


Figura 60. (a) Espectro mostrando a detecção da alteração m.1027A>G. (b) Gráfico indicando em destaque um indivíduo portador da alteração.

4.3.2.2.8. Alteração m.1291T>C

A alteração m.1291T>C se refere a troca da base Timina para Citosina na posição 1291 do gene *MT-RNR1* que codifica a 12S rRNA (Figura 61). Esta alteração foi identificada em apenas 1 indivíduo (03Unif.).

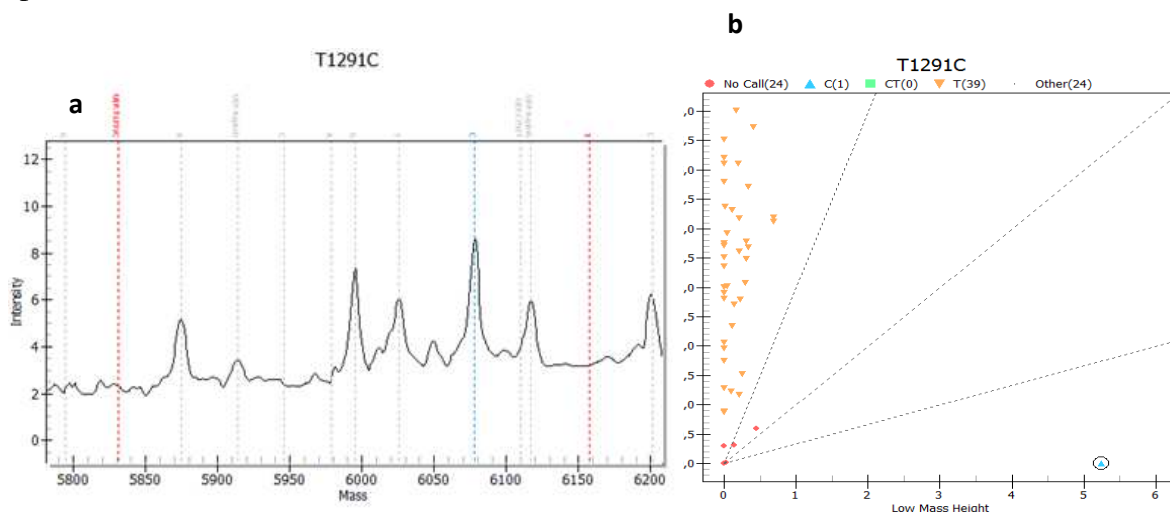


Figura 61. (a) Espectro mostrando a detecção da alteração m.1291T>C. (b) Gráfico indicando em destaque um indivíduo portador da alteração m.1291T>C.

Os resultados do rastreamento das alterações encontradas nos genes nucleares e mitocondriais nos indivíduos estudados se encontram na tabela 15 abaixo. A tabela também mostra o genótipo obtido no primeiro rastreamento das mutações mais comuns.

Tabela 15. Alterações encontradas em genes nucleares e mitocondriais nos pacientes estudados.

INDIVÍDUO	ID	GENÓTIPO ANTERIOR	MUTAÇÃO GENE NUCLEAR	MUTAÇÕES EM GENES MITOCONDRIAIS
1	1B	c.35delG/N	Normal	m.4363T>C
2	16B	c.35delG/N	Normal	m.4363T>C
3	54B	c.35delG/N	Normal	12236G>A / m.4363T>C
4	71B	c.35delG/N	Normal	m.4363T>C
5	103B	c.35delG/N	V609G SLC26A4	m.4363T>C
6	27E	c.35delG/N	Normal	m.4363T>C
7	58E	c.35delG/N	Normal	m.4363T>C
8	146C	c.35delG/N	Normal	m.4363T>C
9	29L	c.35delG/N	Normal	m.709G>A / m.4363T>C
10	219Oto	c.35delG/N	Normal	m.4363T>C
11	232Oto	c.35delG/N	Normal	m.4363T>C
12	257Oto	c.35delG/N	Normal	m.4363T>C
13	261Oto	c.35delG/N	Normal	m.4363T>C
14	275Oto	c.35delG/N	Normal	m.4363T>C
15	276Oto	c.35delG/N	Normal	m.709G>A/ m.4363T>C
16	391Oto	IVS1+1G>A/N	Normal	m.4363T>C
17	396Oto	c.35delG/N	Normal	m.4363T>C
18	449Oto	c.35delG/N	Normal	m.4363T>C
19	503Oto	c.35delG/N	C282Y SLC26A4	m.4363T>C
20	508Oto	c.35delG/N	Normal	m.709G>A/ m.4363T>C
21	509Oto	c.35delG/N	Normal	m.4363T>C
22	539Oto	c.35delG/N	Normal	m.5655T>C/m.709G>A/m.4363T>C
23	571Oto	c.35delG/N	Normal	m.4363T>C
24	574Oto	c.35delG/N	R301Q CDH23	m.5655T>C / m.4363T>C
25	578Oto	c.35delG/N	Normal	m.4363T>C
26	628Oto	Del(<i>GJB6</i> -D13S1854)/N	Normal	m.1027A>G/ m.4363T>C

27	660Oto	c.35delG/N	Normal	m.4363T>C
28	683Oto	c.35delG/N	Normal	m.4363T>C
29	39I	c.35delG/N	Normal	m.4363T>C
30	56I	c.35delG/N	Normal	m.4363T>C
31	118I	c.35delG/N	Normal	m.5628T>C/m.988G>A/m.4363T>C
32	119I	c.35delG/N	Normal	m.4363T>C
33	23PM	c.35delG/N	Normal	m.4363T>C
34	56PM	c.35delG/N	Normal	m.4363T>C
35	72 PM	K168R/N	Normal	m.709G>A/ m.4363T>C
36	74PM	c.35delG/N	Normal	m.4363T>C
37	90 PM	c.35delG/N	Normal	m.709G>A/m.5655T>C/m.4363T>C
38	113PM	c.35delG/N	Normal	m.4363T>C
39	138PM	c.35delG/N	Normal	m.4363T>C
40	69A	K168R/N	Normal	m.4363T>C
41	87A	K168R/N	Normal	m.4363T>C
42	92A	E147K	Normal	m.4363T>C
43	72Ex	c.35delG/N	Normal	m.4363T>C
44	1A.	V37I/N	Normal	m.4363T>C
45	01 Unif	c.35delG/N	Normal	m.709G>A/ m.4363T>C
46	03 Unif	Del(<i>GJB6</i> -D13S1854)/N	R1746Q CDH23	m.1291T>C/ m.4363T>C
47	08 Unif	c.35delG/N	Normal	m.1027A>G / m.4363T>C
48	17 Unif	c.35delG/N	V609G SLC26A4	m.4363T>C

DISCUSSÃO

O percentual de indivíduos com perda auditiva, apresentando mutação de herança autossômica recessiva no gene *GJB2* em um único alelo, chega a ser observado em 40% dos casos. Dessa forma, muitas pesquisas têm sido realizadas a fim de determinar a etiologia genética da surdez nesses casos. Inicialmente, o que se busca no DNA desses indivíduos é uma segunda mutação no outro alelo, uma vez que, a associação dessas mutações pode impedir a expressão das duas cópias do gene, causando o fenótipo da surdez. As deleções no gene *GJB6* identificadas por Del Castilho e colaboradores (2003 e 2005), foram de extrema importância porque explicaram a causa da perda auditiva em vários casos de monoalélicos para mutações no gene *GJB2*. Contudo, a frequência dessas deleções varia significativamente entre diferentes populações. No Brasil, estudos têm demonstrado uma baixa frequência, que pode variar de 4 a 25% (Piatto *et. al.*, 2004, Del Castillo *et. al.*, 2005, da Silva Costa *et. al.*, 2011). Portanto, um grande número de indivíduos permanece com a etiologia da perda auditiva não identificada, indicando a necessidade da investigação de mutações em outros genes.

Nesse estudo foram analisados 48 indivíduos, 96% (46) apresentavam mutações recessivas em heterozigose no gene *GJB2* e 4% no gene *GJB6* (2). Mutações em diferentes genes foram rastreadas nesses pacientes.

A deleção del(CHR13 :19,837,344-19, 968698) no gene *GJB6* foi investigada em todos os pacientes estudados, porém, não foi identificada em nenhum deles. Esta deleção parece ser rara no nosso meio e em várias populações. Em estudos prévios, a deleção del(CHR13 :19,837,344-19, 968698) não foi identificada em 528 indivíduos monoalélicos para mutações nos genes *GJB2* e *GJB6*, dos Estados Unidos, Brasil e vários países da Europa (Wilch *et al.*, 2010) .

Mutações em microRNAs, uma nova classe de reguladores gênicos, têm sido associadas a diferentes patologias humanas. Mutações no *cluster miR-183*, que inclui os *miR-96, 183 e 182*, foram investigadas em um total de 521 indivíduos surdos não relacionados. Destes, 48 eram heterozigotos para mutações nos genes *GJB2* ou *GJB6* e 473 não apresentavam as mutações

mais frequentemente rastreadas. Um total de 11 diferentes alterações, consideradas polimorfismos de base única, foram encontradas no *cluster miR-183*, a maioria já descrita em banco de dados. Algumas delas foram identificadas muito próximas da região *seed* dos genes, importante região conservada e responsável pelo reconhecimento dos mRNA alvo. Duas alterações detectadas ainda não foram descritas anteriormente, porém, estão localizadas fora do transcrito primário. As mutações de ponto já descritas segregando com perda auditiva DFNA50 (Mencía *et al.*, 2009) não foram identificadas nos indivíduos estudados. Portanto, mutações patogênicas no *cluster miR-183* parecem não ser causa frequente de surdez no nosso meio. Nossos resultados estão em concordância com Hildebrand e colaboradores (2010), que ao estudarem 150 indivíduos com perda auditiva não-sindrômica autossômica dominante e 576 famílias com perda auditiva não-sindrômica autossômica recessiva, concluíram que mutações no *cluster miR-183* não são uma causa comum de surdez. Porém, é importante ressaltar que nos casos em que o diagnóstico molecular permanece indefinido, outras alterações até mesmo as mais raras, quando possível, devem ser investigadas. Isso confirma-se com achados como o de Soldá e colaboradores (2012), que encontraram uma nova mutação no *miR-96* segregando com perda auditiva, em uma família italiana.

Devido ao grande número de deleções encontradas no *locus* DFNB1 associadas à perda auditiva, foram investigadas possíveis deleções ou duplicações nessa região, que pudessem explicar o fenótipo de pelo menos alguns dos 48 indivíduos heterozigotos, incluídos neste estudo. Para tanto, utilizamos uma nova ferramenta de genotipagem denominada *iPlexGold Genotyping*, baseada no sistema *MALDI-TOF/MS MassArray-Sequenom*, para a análise simultânea de 41 *SNPs* previamente selecionados, localizados ao longo do *locus* DFNB1. O mérito desta técnica foi permitir o rastreamento de um grande número de *SNPs* que funcionaram como marcadores, na procura de deleções no *locus* analisado. Neste estudo esperava-se que na presença de deleções em homozigose, *SNPs* que estivessem na região deletada, não amplificassem e, portanto, não seriam detectados pelo sistema. Por outro lado, em casos em que a deleção ocorresse em heterozigose, haveria detecção dos *SNPs* envolvidos, porém, com valores de ampliações inferiores quando comparados com controles negativos que não apresentavam a deleção. Os resultados obtidos neste primeiro método de análise

indicaram que provavelmente deleções em homozigose não estão presentes nos pacientes analisados, pois todos os *SNPs* amplificaram. Por outro lado, essa técnica não pareceu indicada para a detecção de deleções em heterozigose, já que não observamos diferenças de amplificação entre os controles negativos e os controles positivos que apresentavam as deleções del(*GJB6-D13S1830*) e a del(*GJB6-D13S1854*) em heterozigose.

Dessa forma, um segundo método foi utilizado para identificação de possíveis portadores de alterações em heterozigose. Deleções em heterozigose podem levar a falsos homozigotos para marcadores, no nosso caso *SNPs*, incluídos na região eliminada. Isso porque não havendo o outro alelo, apenas um será amplificado. Por exemplo, um indivíduo heterozigoto A/T para um marcador, amplificará os 2 alelos, porém, havendo a deleção, apenas 1 deles será amplificado, podendo ser A/- ou T/-, dependendo do alelo deletado. Portanto, esse alelo será detectado como um falso homozigoto. Partindo desse princípio, investigamos dentre os indivíduos estudados quais apresentavam um maior número de *SNPs* sequenciais em aparente homozigose, pois tal evento poderia indicar a presença de deleções na região. Contudo, inicialmente analisamos os controles negativos e positivos e, nestes casos, foi possível verificar uma evidente diferença entre eles. Os controles negativos apresentavam pequenas porções de *SNPs* em homozigose ao contrário dos controles positivos que apresentavam todos os *SNPs* localizados dentro das deleções já descritas, em homozigose (Figura 47). Isto indicou que esse método de análise seria eficiente para determinar possíveis portadores de deleções já descritas e até mesmo não descritas.

Baseado na frequência do número de *SNPs* em homozigose em todo o grupo estudado, dentre os 48 indivíduos analisados 4 foram selecionados como potencialmente portadores de possíveis deleções ainda não descritas. Sendo assim, os indivíduos 1A, 17Unif, 219Oto e 660Oto apresentaram 21, 20, 26 e 19 *SNPs* em homozigose, respectivamente. Portanto, utilizando a técnica de Espectrometria de Massa iPlexGold Genotyping foi possível o rastreamento de indivíduos supostamente portadores de deleções, abrindo possibilidades de, através de outras técnicas, como como por exemplo PCR quantitativo, confirmar os resultados e encontrar os pontos de quebra da região deletada.

Utilizando a mesma técnica de genotipagem, *iPlexGold*-Sequenom, 104 mutações em 21 genes nucleares e, 50 mutações em 14 genes mitocondriais, foram rastreadas nos 48 indivíduos heterozigotos.

No rastreamento de mutações nos genes nucleares, foram encontradas 4 diferentes mutações em 5 indivíduos. A detecção destas mutações foi validada por sequenciamento automático.

A alteração p.V609G foi detectada em 2 indivíduos (103B e 17Unif) heterozigotos para a mutação c.35delG. Esta alteração ocorre no gene *SLC26A4*, que tem sido considerado o segundo gene mais frequentemente envolvido nos casos de perda auditiva não-sindrômica. Mutações no gene *SLC26A4* podem estar associadas tanto nos casos de surdez não-sindrômica, geralmente acompanhada de aqueduto vestibular alargado, quanto na Síndrome de Pendred (surdez síndrômica). A alteração p.V609G tem sido classificada como *SNP*, em banco de dados (*dbSNPs-National Center for Biotechnology Information*). Isto porque, em estudo anterior, ela foi encontrada aproximadamente na mesma frequência, em um grupo controle de ouvintes e em um grupo com perda auditiva (Pera *et al.*, 2008). Porém, Dossena e colaboradores (2011), utilizando cultura de células e métodos fluorimétricos, demonstraram que essa mutação não elimina a função da Pendrina, contudo, leva a uma diminuição da função, indicando um potencial patogênico principalmente se associada a outro fator genético ou ambiental.

A alteração p.C282Y, também encontrada no gene *SLC26A4*, foi detectada em 1 indivíduo heterozigoto para a mutação c.35delG (503Oto). Até o momento, esta mutação ainda não foi descrita na literatura, não se sabendo o seu efeito na proteína. Desta forma, não é possível definir a sua patogenicidade sem uma análise funcional.

Foram rastreadas por sequenciamento direto, outras mutações nos 20 éxons codificantes do gene *SLC26A4*, em todos os indivíduos que apresentaram, pela técnica de espectrometria de massa, mutações em heterozigose nesse gene (103B, 17Unif e 503Oto). Porém, nenhuma alteração foi detectada.

A associação de mutações no gene *SLC26A4* e alterações em outros genes, como *FOXII* e *KCNJ10*, têm sido descritas como causa de perda auditiva não-sindrômica (Yang *et al.*, 2007, 2009). Contudo, até o momento não há estudos que demonstrem que a associação de mutações nos genes *GJB2* e *SLC26A4* possam contribuir para a expressão do fenótipo. Dois indivíduos neste estudo apresentaram o genótipo c.35delG/p.V609G e outro, o genótipo c.35delG/p.C282Y. Devido a grande frequência da mutação c.35delG na população, cerca de 2 a 4% em caucasóides, é possível pensar que sua presença nestes casos pode não estar relacionada com a surdez, se tratando portanto, de um achado ao acaso. Porém, seriam necessários mais estudos para confirmar essa hipótese.

A mutação p.R1746Q no gene *CDH23* foi detectada em heterozigose em um paciente com a deleção del(*GJB6*-D13S1854) no gene *GJB6* (03 Unif). Becirovic e colaboradores (2008), demonstraram com estudos funcionais, que essa mutação cria um novo sítio AG, que atua como um sítio acceptor no mecanismo de *splicing*, levando a perda de 51pb no éxon 40, o correspondente a 17 aminoácidos na proteína. Astuto e colaboradores (2002) e Bolz e colaboradores (2001) observaram a presença da mutação p.R1746Q em homozigose em pacientes com síndrome de Usher tipo 1 e também em pacientes com síndrome de Usher atípica com aparecimento tardio de retinite pigmentosa. Entretanto, Shultz e colaboradores (2012) demonstraram que essa mutação, quando encontrada em trans com outra mutação causadora de perda auditiva não-sindrômica no gene *CDH23*, produzia apenas o fenótipo de surdez, preservando a visão. Portanto, será necessária a investigação da presença de outras mutações no gene *CDH23* para confirmar o envolvimento dessa mutação na perda auditiva do paciente estudado. Devido ao grande número de éxons (69), o rastreamento de mutações no gene *CDH23* é difícil e, conseqüentemente, há poucos relatos sobre a frequência das mutações deste gene na população.

Outra mutação no gene *CDH23*, p.R301Q, foi identificada em homozigose em um indivíduo heterozigoto para a mutação c.35delG (574Oto). A mutação p.R301Q foi descrita em heterozigose associada a outras mutações no gene *CDH23*, causando perda auditiva não-sindrômica severa a profunda, em indivíduos japoneses (Wagatsuma *et al.*, 2007, Miyagawa *et al.*, 2012).

O encontro desta mutação em homozigose pode explicar o fenótipo de surdez no paciente estudado e, conseqüentemente, é provável que a mutação c.35delG não esteja envolvida com a perda auditiva neste caso.

A mutação *p.R301Q* é uma alteração *missense*. Segundo estudos correlacionando genótipo-fenótipo, mutações desse tipo geralmente estão associadas à perda auditiva não-sindrômica (Ahmed *et al.*,2003). De fato, no prontuário do paciente não há relato de alguma perda visual, no entanto exames oftalmológicos serão indicados.

Quanto ao rastreamento de mutações em genes mitocondriais, dentre os 48 indivíduos analisados, 18 apresentaram alguma alteração, sendo detectadas 8 alterações diferentes. A alteração m.4363T>C ocorre em um nucleotídio moderadamente conservado, localizado no anticódon do RNA transportador da Glicina. Foi descrita em associação com outra alteração mitocondrial, G15884A, em um paciente com perda auditiva acompanhada de outros sinais clínicos, contudo, não houve comprovação do envolvimento dessas alterações com o fenótipo do paciente (Wong *et al.*,2002). No presente estudo, essa alteração foi encontrada em todos os pacientes, se tratando, portanto, de um polimorfismo.

A alteração m.709G>A foi detectada em 14% (7/48) dos indivíduos analisados. Devido à alta frequência encontrada, esta alteração parece não estar envolvida com a perda auditiva nos casos incluídos neste estudo. A alteração m.709G>A já foi identificada em alta frequência em outras populações e foi considerada um polimorfismo (Rydzanicz *et al.*, 2009).

A alteração m.5655T>C foi encontrada em 6% (3/48) dos indivíduos estudados, 2 deles também portadores da variante mitocondrial m.709G>A. A alteração m.5655T>C encontra-se na extremidade 3' do gene da tRNA^{Ala}, posição importante na identidade do tRNA. Estudos funcionais demonstraram que ela leva a uma redução de aproximadamente 50% nos níveis do tRNA^{Ala}. Contudo, em um estudo referente à frequência de mutações mitocondriais na população brasileira, que está sendo realizado no nosso laboratório, a alteração m.5655T>C foi encontrada em 4% dos indivíduos do grupo controle ouvinte (dados ainda não publicados).

Consequentemente, não é possível afirmar o envolvimento dessa alteração na perda auditiva dos portadores aqui identificados.

A alteração 12236G>A foi detectada em apenas 1 indivíduo heterozigoto para a mutação c.35delG. Esta alteração ocorre no gene do tRNA^{Ser}(AGY) e apresenta um alto grau de conservação em mamíferos, 73%. Foi primeiramente identificada apresentando um potencial patogênico, em 6 membros de uma família francesa com herança tipicamente materna, segregando com surdez moderada a profunda, pós-lingual (Le´vêque *et al.*, 2007). Esta mutação não tem sido descrita em indivíduos controles normais. Dessa forma, acredita-se que a alteração 12236G>A pode estar envolvida na perda auditiva do paciente 54B analisado neste trabalho.

A alteração m.988G>A localizada no gene 12S rRNA, foi identificada em 1 indivíduo (118I) heterozigoto para a mutação c.35delG. Rydzanicz e colaboradores (2010) detectaram esta alteração em 4 indivíduos com surdez não-sindrômica de grau moderado a profundo, sendo observada herança materna em apenas um deles. O estudo preditivo de análise de estrutura secundária mostrou uma alteração na subunidade 12S rRNA mutada quando comparada à subunidade sem a alteração. Contudo, não existem evidências de patogênicidade na literatura. A alteração m.5628T>C no gene do tRNA^{Ala} também foi identificada no mesmo indivíduo 118I. Esta alteração ocorre em uma base altamente conservada do tRNA, em humanos (Brandon *et al.*, 2004). A alteração da estrutura do tRNA^{Ala} pela mutação m.5628T>C pode levar a uma falha no metabolismo do tRNA, podendo resultar na insuficiência da tradução mitocondrial. Han e colaboradores (2007) descreveram que esta variante pode ter uma função modificadora na manifestação fenotípica da mutação 1494C>T, levando a perda auditiva (Guan *et al.*, 2000). A mutação 1494C>T ocorre no gene 12S rRNA, determina uma disfunção mitocondrial e tem sido associada tanto com perda auditiva induzida por aminoglicosídeos, como perda auditiva não-sindrômica. Segundo o autor, a alteração m.5628T>C piora a disfunção mitocondrial causada pela mutação 1494C>T. Dessa forma, pode-se sugerir que o mesmo possa estar ocorrendo no caso identificado neste estudo. A associação das alterações

causadas pelas duas mutações, m.988G>A e m.5628T>C, encontradas no mesmo paciente, poderia estar levando a expressão do fenótipo.

A alteração m.1027A>G está localizada no gene codificante da 12S rRNA e apresenta um alto índice de conservação, 92,9%. Estudos preditivos de estrutura indicam que ela pode levar a alterações na estrutura terciária ou quaternária do 12S rRNA e podem conduzir a efeitos significativos sobre a função, contribuindo assim para o fenótipo de surdez (Lu et al., 2010). A alteração m.1027A>G foi encontrada em dois pacientes, um portador da deleção del(*GJB6*-D13S1854) no gene *GJB6* (628Oto), e o outro portador da mutação c.35delG (8Unif.). Esta mutação não tem sido encontrada em grupos controles ouvintes e pode estar contribuindo para a perda auditiva dos indivíduos estudados.

Finalmente, a alteração m.1291T>C localizada no gene 12S rRNA tem provocado controvérsias quanto à sua patogenicidade. Ballana e colaboradores (2006) descreveram a natureza desta mutação como provavelmente patogênica, com base no histórico familiar dos indivíduos portadores desta alteração, na predição da estrutura secundária da 12S rRNA alterada devido a mutação e sua ausência em um grupo controle de 95 indivíduos espanhóis ouvintes. Abreu-Silva e cols (2006) estudaram uma amostra de 203 indivíduos surdos e 300 controles ouvintes, e identificaram a alteração m.1291T> em cinco indivíduos surdos e dois controles ouvintes. Portanto, há a necessidade de estudos funcionais para esclarecer se de fato essa mutação pode levar a perda auditiva.

Determinar se uma variante mitocondrial é patogênica não é um processo simples. Dados na literatura têm mostrado que a manifestação fenotípica das mutações patogênicas pode depender do envolvimento de vários fatores modificadores, tais como genes nucleares, haplótipos mitocondriais e até mesmo fatores ambientais como o uso de antibióticos aminoglicosídeos. Neste estudo, usamos alguns critérios para avaliar se as mutações mitocondriais encontradas nos pacientes surdos heterozigotos poderiam ou não estar envolvidas com o fenótipo. Critérios estes que foram: ausência em controles negativos, alto índice de conservação e potencial de causar alterações estruturais ou funcionais. Baseando-se nestes critérios acreditamos que 4 mutações mitocondriais, m.12236G>A, m.5628T>C, m.988G>A e

m.1027A>G, detectadas em 4 indivíduos heterozigotos para mutações no *locus* DFNB1, podem estar envolvidas com a perda auditiva. Nestes casos, as mutações em genes nucleares podem estar agindo como fatores modificadores.

O estudo molecular dos 48 indivíduos heterozigotos para mutações no *locus* DFNB1, apresenta resultados interessantes no que diz respeito a achados que podem ser inéditos nessa área de estudo, assim como também, na identificação de mutações em outros genes que geralmente não fazem parte do grupo de genes ou mutações rotineiramente analisados. Este estudo pode ter identificado 4 indivíduos portadores de possíveis deleções ainda não descritas e demonstrou que mutações nos genes *GJB2* e *GJB6*, quando em heterozigose, podem em alguns indivíduos, não indicar o envolvimento desses genes na perda auditiva do paciente, como foi o caso do indivíduo homozigoto para mutação no gene *CDH23* e que também é portador da mutação 35delG. Além disso, foi possível identificar mutações em genes mitocondriais em 4 indivíduos, que podem estar diretamente envolvidas com a perda auditiva desses pacientes ou ainda, estarem associadas a mutações nucleares detectadas nos mesmos pacientes levando assim, a expressão do fenótipo nesses casos. Porém, maiores estudos serão necessários para confirmar tal hipótese.

Um número considerável de interações genéticas e protéicas está envolvido no complexo mecanismo da audição, o que conseqüentemente, dificulta o diagnóstico molecular da surdez. É provável que no futuro, novos métodos de análise como sequenciamento massivo (*deep sequencing*) e sequenciamento de exomas, que têm sido usado em apenas alguns casos, se tornem mais acessíveis e possam contribuir para diminuir os casos de etiologia indeterminada e ainda, possibilitar a descoberta de outros genes e diferentes mutações ainda não descritas, elucidando intrínsecas interações genéticas envolvidas no mecanismo da audição.

CONCLUSÕES

6- CONCLUSÕES

1 - O estudo do *locus* DFNB1 permitiu a identificação de possíveis novas deleções que, podem vir a explicar o fenótipo em 4 pacientes. Ainda são necessárias análises mais refinadas para determinar os limites dessas deleções.

2 - Mutações no *cluster* miR183/96/182 não são causas comuns de surdez nos pacientes estudados.

3 – O rastreamento de mutações em genes nucleares permitiu esclarecer o diagnóstico molecular em 1 caso e mutações em genes mitocondriais podem explicar o fenótipo de surdez em 4 indivíduos.

4 – O rastreamento de mutações em outros genes pode diminuir o número de casos com diagnóstico inconclusivo, porém, devido à grande complexidade da perda auditiva muitos pacientes ainda permanecem com diagnóstico indefinido.

5 – Em alguns casos, a presença de mutações no gene *GJB2*, principalmente a mutação mais frequente, c.35delG, pode ser casual e em outros podem estar associadas a outras mutações em outros genes.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

7- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abdelhak S, Kalatzis V, Heilig R, Compain S, Samson D, Vincent C, Weil D, Cruaud C, Sahly I, Leibovici M, Bitner-Glindzicz M, Francis M, Lacombe D, Vigneron J, Charachon R, Boven K, Bedbeder P, Van Regemorter N, Weissenbach J, Petit C. A human homologue of the *Drosophila* eyes absent gene underlies branchio-otorenal (BOR) syndrome and identifies a novel gene family. *Nature Genetics*, v. 15, n. 2, p. 157-64, 1997.
- Abreu-Silva, RS; Lezirovitz, K; Braga, MC; Spinelli, M; Pirana, S; Della-Rosa, VA; Otto, PA; Mingroni-Netto, RC. Prevalence of the A1555G (12S rRNA) and tRNASer(UCN) mitochondrial mutations in hearing impaired Brazilian patients. *Braz J Med Biol Res*, 39(2): 219-226, 2006.
- Ahmad, S.; Chen, S.; Sun, J.; Lin, X. Connexins 26 and 30 are co-assembled to form gap junctions in the cochlea of mice. *Biochem Biophys Res Commun*. Jul 25 307(2): 362-8, 2003.
- Ahmed ZM, Riazuddin S, Wilcox ER. The molecular genetics of Usher syndrome. *Clin Genet*; 63: 431-44, 2003.
- Alberts, B; Johnson, A; Lewis, J; Raff, M; Roberts, K; Walter, P. *Molecular Biology of the Cell*, New York: Garland Science, 2002.
- Astuto LM, Bork JM, Weston MD, Askew JW, Fields RR, Orten DJ, Ohliger SJ, Riazuddin S, Morell RJ, Khan S, Riazuddin S, Kremer H, van Hauwe P, Moller CG, Cremers CW, Ayuso C, Heckenlively JR, Rohrschneider K, Spandau U, Greenberg J, Ramesar R, Reardon W, Bitoun P, Millan J, Legge R, Friedman TB, Kimberling WJ. *CDH23* mutation and phenotype heterogeneity: a profile of 107 diverse families with Usher syndrome and nonsyndromic deafness. *Am J Hum Genet*. 71(2):262-75, 2002.

- Ballana E, Govea N, de Cid R, Garcia C, Arribas C, Rosell J, Estivill X. Detection of unrecognized low-level mtDNA heteroplasmy may explain the variable phenotypic expressivity of apparently homoplasmic mtDNA mutations. *Hum Mutat.* Feb;29(2):248-57, 2008.
- Barker DF, Hostikka SL, Zhou J, Chow LT, Oliphant AR, Gerken SC, Gregory MC, Skolnick MH, Atkin CL, Tryggvason K. Identification of mutations in the COL4A5 collagen gene in Alport syndrome. *Science*, v. 248, n. 4960, p. 1224-7, 1990.
- Bartel DP. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell*, 116: 281-297, 2004.
- Beltramello, M; Piazza, V; Bukauskas, FF; Pozzan, T; Mammano, F. *Nat Cell Biol*, 7: 63-69, 2005.
- Beyer, EC. Gap junctions. *International Review of Cytology*, 137: 1-37, 1993.
- Beyer, EC; Lipkind, GM; Kyle, JW; Berthoud, VM. Structural organization of intercellular channels II. Amino terminal domain of the connexins: sequence, functional roles, and structure. *Biochimica et Biophysica Acta*, 2011.
- Bicego, M.; Beltramello, M.; Melchionda, S.; Carella, M.; Piazza, V.; Zelante, L.; Bukauskas, F.F; Arslan, E.; Cama, E.; Pantano, S.; Bruzzone, R.; D'Andrea, P.; Mammano, F. Pathogenetic role of the deafness- related M34T mutation of Cx26. *Hum Mol Genet* 15: 2569-2587, 2006.
- Bilton T, Ramos LR, Ebel S, Teixeira LS Tega LP. Prevalência da deficiência auditiva em uma população idosa. *Mundo Saúde*; 21 (4): 218-25, 1997
- Bitner-Glindzicz, M. Hereditary deafness and phenotyping in humans. *Br Med Bull*, 63: 73-94, 2002.

- Brownstein Z, Bhonker Y, Avraham KB., High-throughput sequencing to decipher the genetic heterogeneity of deafness. *Genome Biol.* 29;13(5):245, 2012
- Bolz H, von Brederlow B, Ramírez A, Bryda EC, Kutsche K, Nothwang HG, Seeliger M, del C-Salcedó Cabrera M, Vila MC, Molina OP, Gal A, Kubisch C. Mutation of *CDH23*, encoding a new member of the cadherin gene family, causes Usher syndrome type 1D. *Nat Genet.* 27(1):108-12, 2001.
- Bork JM, Peters LM, Riazuddin S, Bernstein SL, Ahmed ZM, Ness SL, Polomeno R, Ramesh A, Schloss M, Srisailpathy CR, Wayne S, Bellman S, Desmukh D, Ahmed Z, Khan SN, Kaloustian VM, Li XC, Lalwani A, Riazuddin S, Bitner-Glindzicz M, Nance WE, Liu XZ, Wistow G, Smith RJ, Griffith AJ, Wilcox ER, Friedman TB, Morell RJ.. Usher syndrome 1D and nonsyndromic autosomal recessive deafness DFNB12 are caused by allelic mutations of the novel cadherin-like gene *CDH23*. *Am J Hum Genet.* 68(1):26-37, 2001.
- Brandon MC, Lott MT, Nguyen KC, Spolim S, Navathe SB, Baldi P, Wallace DC. MITOMAP: a human mitochondrial genome database--2004 update. *Nucleic Acids Res.* Jan 1;33(Database issue):D611-3, 2005.
- Chen B, Sun D, Yang L, Zhang C, Yang A, Zhu Y, Zhao J, Chen Y, Guan M, Wang X, Li R, Tang X, Wang J, Tao Z, Lu J, Guan MX. Mitochondrial ND5 T12338C, tRNA(Cys) T5802C, and tRNA(Thr) G15927A variants may have a modifying role in the phenotypic manifestation of deafness-associated 12S rRNA A1555G mutation in three Han Chinese pedigrees. *Am J Med Genet A*, 2008.
- Chen ZY, Hendriks RW, Jobling MA, Powell JF, Breakefield XO, Sims KB, Craig IW. Isolation and characterization of a candidate gene for Norrie disease. *Nature Genetics*, v. 1, n. 3, p. 204-8, 1992.

- Cheng, X.; LI L.; Brashears, S.; Morlet, T.; NG, S.S.; Berlin, C.; Hood, L.; Keats, B. Connexin 26 variants and auditory neuropath/ Dys-Synchrony among children in schools for the deaf. *Am J Med Genet* 139A:13-18, 2005.
- Chen DY, Chen XW, Jin X, Zuo J, Wei CG, Cao KL, Fang FD. Screening of *SLC26A4* (PDS) gene mutation in cochlear implant recipients with inner ear malformation. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi*. Oct 30;87(40):2820-4, 2007.
- Cohn, E.S.; Kelley, P.M.; Fowler, T.W.; Gorga, M.P.; Lefkowitz, D.M., *et al*. Clinical studies of families with hearing loss attributable to mutations in the connexin 26 gene (*GJB2* / DFNB1). *Pediatrics* (103): 546- 550, 1999.
- Common, J.E.A.; Bitner-Glindzicz M.; O'Toole, E.A.; Barnes, M.R.; Jenkins, L.; Forge, A.; Kelsell, D.P. Specific loss of connexin 26 expression in ductal sweat gland epithelium associated with the deletion mutation del(*GJB6*-D13S1830). *Clinical and Experimental Dermatology*, 30:688–693, 2005.
- Couloigner, V; Sterkers, O; Ferrary, E. What's new in ion transports in the cochlea? *Pflugers Arch*, 453: 11-22, 2006.
- Corey D.P . Cell biology of mechanotransduction in inner-ear hair cells. *F1000 Biol Rep*. 1: 58, 2009.
- Czarnocka B. Thyroperoxidase, thyroglobulin, Na(+)/I(-) symporter, pendrin in thyroid autoimmunity. *Front Biosci*. Jan 1;16:783-802. Review, 2011.
- da Silva-Costa SM, Martins FT, Pereira T, Pomilio MC, Marques-de-Faria AP, Sartorato EL. Searching for digenic inheritance in deaf Brazilian individuals using the multiplex ligation-dependent probe amplification technique. *Genet Test Mol Biomarkers*. Dec;15(12):849-53, 2011.
- Daahl, H.H.; Tobin, S.E.; Poulakis, Z.; Rickards, F.W.; XU, X.; Gillam, L.; Williams, J.; Saunders, K.; Cone-Wesson, B.; Wake, M. The contribution of *GJB2* mutations

- slight or mild hearing loss in Australian elementary school children. *J Med Genet* 43: 850-855, 2006.
- Dahl, E.; Manthey, D.; Chen, Y.; Schwarz, H.J.; Chang, Y.S.; Lalley, P.A.; Nicholson, B.J. & Willecke, K. Molecular cloning and functional expression of mouse connexin-30, a gap junction gene highly expressed in adult brain and skin. *J Biol Chem* 271: 17903-10, 1996.
- De Nobrega M, Weckx LL, Juliano Y. Study of the hearing loss in children and adolescents, comparing the periods of 1990-1994 and 1994-2000. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol.* Jun;69(6):829-38, 2005.
- Deininger PL, Batzer MA. Alu repeats and human disease. *Mol Genet Metab*, 67:183-93, 1999.
- Del Castillo, F.J.; DelCastillo, F.J.; Hutchin, T.; Leonardi, E.; Oliveira, C.A.; Azahin, H.; Siemering, K.R.; Weil, D.; Wuyts, W.; Aguirre, L.A.; Martin, Y.; Moreno-Pelayo, M.A.; Villamar, M.; Avraham, K.B.; Dahl, H.H.; Kanann, M.; Nance, W.E.; Petit, C.; Smith, R.J.; Van Camp, G.; Sarorato, E.L.; Murgia, A.; Moreno, F.; DelCastillo, I.- 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 nonsyndromic hearing impairment. *J. Med. Genet.*, 42: 588-94, 2005.
- Del Castillo, I.; Moreno-Pelayo, M. A.; DelCastillo, F. J.; Brownstein, Z.; Marlin, S.; Adina, Q.; *et al.*- Prevalence and Evolutionary origins of the del(*GJB6-D13S1830*) mutation in the DFNB1 *locus* in hearing impairment subjects: a multicenter study. *Am. F. Hum. Genet.*, 73(6): 1452-8, 2003.
- Del Castillo, I; Villamar, M; Moreno-Pelayo, MA; Del Castillo, FJ; Alvarez, A; Tellería, D; Menéndes, I; Moreno, F. A deletion involving the connexin 30 gene in nonsyndromic hearing impairment. *N Engl J Med*, 346(4): 243-249, 2002.

- Denoyelle, F.; Weil, D.; Maw, M.A.; Wilcox, A.S.; Lench, N.J.; Allen-Powell, D.R.; Osborn, A.H.; Dahl, H.H.M.; Middleton, A.; Houseman, M.J.; Dodé, C.; Marlin, S.; Boulila-Elgaïed, A.; Grati, M.; Ayadi, H.; Benarab, S.; Bitoun, P.; Lina-Granae, G.; Godet, J.; Mustapha, M.; Loiselet, J.; El-Zir, É.; Auboïs, A.; Joannard, A.; Levilliers, J.; Garabédian, E.N.; Mueller, R.F. Prelingual deafness: high prevalence of a 35delG mutation in the connexin 26 gene. *Hum. Mol. Genet.* 6(12):2173-77, 1997.
- Denoyelle, F.; Marlin, S.; Weil, D.; Moatti, L.; Chauvin, P.; Garabedian, E.N.; Petit, C. Clinical features of the prevalent form of childhood deafness, DFNB1, due to a connexin 26 gene defect: implication for genetic counseling. *Lancet* (17): 1298-1303, 1999.
- Dossena S, Bizhanova A, Nofziger C, Bernardinelli E, Ramsauer J, Kopp P, Paulmichl M. Identification of allelic variants of pendrin (*SLC26A4*) with loss and gain of function. *Cell Physiol Biochem.*28(3):467-76, 2011.
- Dror, AA & Avraham, KB. Hearing Loss: Mechanisms Revealed by Genetics and Cell Biology. *Annual Review of Genetics*, 43: 411-437, 2009.
- Everett, L.A.; Glaser, B.; Beck, J.C.; Idol, J.R.; Buchs, A.; Heyman, M.; Adawi, F.; Hazani, E.; Nassir, E.; Baxevanis, A.D.; Sheffield, V.C.; Green, E.D. Pendred syndrome is caused by mutations in a putative sulphate transporter gene (PDS). *Nature Genet.* 17(4): 411-422, 1997.
- Feldmann, D; Le Maréchal, C; Jonard, L; Thierry, P; Czajka, C; Couderc, R; Ferec, C; Denoyelle, F; Marlin, S; Fellmann, F. A new large deletion in the DFNB1 locus causes nonsyndromic hearing loss. *Eur J Med Genet*, 52(4): 195-200, 2009.
- Finsterer, J; Fellingner, J. Nuclear and mitochondrial genes mutated in nonsyndromic impaired hearing. *Int J Pediat Otorhinolaryngol*, 69: 621-649, 2005.

- Fishel-Ghodsian, N; Prezant, TR; Bu, X; Oztas, S. Mitochondrial ribosomal RNA gene mutation in a patient with sporadic aminoglycoside ototoxicity. *Am J Otolaryngol*, 14: 339-403, 1993.
- Forge, A.; Becker, D.; Casalotti, S.; Edwards, J.; Marziano, N.; Nickel, R. – Connexins and gap junctions in the inner ear. *Audiol Neuro-Otol*, 7: 141-145, 2002.
- 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. High carrier frequency of the 35delG deafness mutation in European populations. Genetic Analysis Consortium of *GJB2* 35delG. *Eur J Hum Genet*, 8: 19-23, 2000.
- Green G.E.; Scott, D.A.; McDonald, J.M.; Sheffield, V.C.; Smith, R.J.H. Carrier rates in the midwestern United States of *GJB2* mutations causing inherited deafness. *JAMA* 281: 2211-2216, 1999
- Guan M.X., Fischel-Ghodsian N., Attardi G., A biochemical basis for the inherited susceptibility to aminoglycoside ototoxicity, *Hum.Mol. Genet.* 9 1787–1793, 2000.
- Han D, Dai P, Zhu Q, Liu X, Huang D, Yuan Y, Yuan H, Wang X, Qian Y, Young WY, Guan MX. The mitochondrial tRNA(Ala) T5628C variant may have a modifying role in the phenotypic manifestation of the 12S rRNA C1494T mutation in a large Chinese family with hearing loss. *Biochem Biophys Res Commun.* Jun 1;357(2):554-60, 2007.
- Heller, S; Sheane, CA; Javed, Z; Hudspeth, AJ. Molecular markers for cell types of the inner ear and candidate genes for hearing disorders. *Proc Natl Acad Sci USA*, 95(19): 11400-11405, 1998.
- Hildebrand MS, Witmer PD, Xu S, Newton SS, Kahrizi K, Najmabadi H, Valle D, Smith RJ. miRNA mutations are not a common cause of deafness. *Am J Med Genet A.* Mar;152A(3):646-52, 2010.

- Hildebrand MS, Newton SS, Gubbels SP, Sheffield AM, Kochhar A, de Silva MG, Dahl HH, Rose SD, Behlke MA, Smith RJ. Advances in molecular and cellular therapies for hearing loss. *Mol Ther.* Feb;16(2):224-36, 2008.
- Hilgert, N; Smith, RJH; Van Camp, G. Forty-six genes causing nonsyndromic hearing impairment: which ones should be analyzed in DNA diagnostics? *Mutat Res*, 681(2-3): 189-196, 2009a.
- Hyslop SJ, James AM, Maw M, Fischel-Ghodsian N, Murphy MP. The effect on mitochondrial function of the tRNA Ser(UCN)/COI A7445G mtDNA point mutation associated with maternally-inherited sensorineural deafness. *Biochem Mol Biol Int.* Jul;42(3):567-75, 1997.
- Ito, T; Noguchi, Y; Yashima, T; Ohno, k; Kitamura, K. Hereditary Hearing Loss and Deafness Genes in Japan. *J Med Dent Sci*, 57: 1-10, 2010.
- Kelley, P.M.; Harris, D.J.; Comer, B.C.; Askew, J.W.; Fowler, T.; Smith, S.D.; Kimberling, W.J. Novel mutations in the connexin 26 gene (*GJB2*) that cause autosomal recessive (DFNB1) hearing loss. *Am. J. Hum. Genet.* 62(4):792-99, 1998.
- Kelsell DP, Dunlop J, Stevens HP, Lench NJ, Liang JN, Parry G, Mueller RF, Leigh IM. Connexin 26 mutations in hereditary non-syndromic sensorineural deafness. *Nature*, v. 387, n. 6628, p. 80-3, 1997.
- Kemperman MH, Hoefsloot LH, Cremers CW. Hearing loss and connexin 26. *Journal of the Royal Society of Medicine*, v.95, n. 4, p. 171-7, 2002.
- Kikuchi, T.; Kimura, R.S.; Paul, D.L.; Adams, J.C. Gap junctions in the rat cochlea: immunohistochemical and ultrastructural analysis. *Anat. Embryol.* (Berl.). 191(2):101-18, 1995.

- Kikuchi, T.; Adams, J.C.; Miyabe, Y.; So E.; Kobayashi T. Potassium ion recycling pathway via gap junction systems in the mammalian cochlea and its interruption in hereditary nonsyndromic deafness. *Med Electron Microsc.*33(2):51-6, 2000.
- Kokotas, H; Petersen, MB; Willems; PJ. Mitochondrial deafness. *Clin Genet*, 71: 379–91, 2007.
- Krawczak, M & Cooper, DN. Human Gene Mutation Database. *Trends Genet*, 13: 121-122, 1997. Disponível em: <www.hgmd.org>. Acesso em: Novembro/2011.
- Kumar, NM & Gilula, NB. Cloning and characterization of human and rat liver cDNAs coding for a gap junction protein. *J Cell Biol*, 103: 767-776, 1986.
- Kumar NM, Gilula NB. The gap junction communication channel. *Cell*, v. 84, n. 3, p. 381-388, 1996.
- Kuhn S, Johnson SL, Furness DN, Chen J, Ingham N, Hilton JM, Steffes G, Lewis MA, Zampini V, Hackney CM, Masetto S, Holley MC, Steel KP, Marcotti W. miR-96 regulates the progression of differentiation in mammalian cochlear inner and outer hair cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. Feb 8;108(6):2355-60, 2011.
- Lautermann, J.; Frank, Ten Cate, W.J.; Altenhoff, P.; Grummer, R.; Traub, O., et al. Expression of the gap-junction connexins 26 and 30 in the rat cochlea. *Cell Tissue Res* 294: 415-420, 1998.
- Lee RC, Feinbaum RL, Ambros V. The *C.elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementary to *lin-14*. *Cell*; 75: 843-854, 1993.
- Lévêque M, Marlin S, Jonard L, Procaccio V, Reynier P, Amati-Bonneau P, Baulande S, Pierron D, Lacombe D, Duriez F, Francannet C, Mom T, Journal H, Catros H, Drouin-Garraud V, Obstoy MF, Dollfus H, Eliot MM, Faivre L, Duvillard C, Couderc R, Garabedian EN, Petit C, Feldmann D, Denoyelle F. Whole mitochondrial genome screening in maternally inherited non-syndromic hearing

- impairment using a microarray resequencing mitochondrial DNA chip. *Eur J Hum Genet.* 15(11):1145-55, 2007.
- Lewis MA, Quint E, Glazier AM, Fuchs H, De Angelis MH, Langford C, van Dongen S, Abreu-Goodger C, Piipari M, Redshaw N, Dalmay T, Moreno-Pelayo MA, Enright AJ, Steel KP. An ENU-induced mutation of miR-96 associated with progressive hearing loss in mice. *Nat Genet.* May;41(5):614-8, 2009.
- Maeda S, Nakagawa S, Suga M, Yamashita E, Oshima A, Fujiyoshi Y, Tsukihara T. Structure of the connexin 26 gap junction channel at 3.5 Å resolution. *Nature.* Apr 2;458(7238):597-602, 2009.
- Lu, J; Qian, Y; Li, Z; Yang, A; Zhu, Y; Li, R; Yang, L; Tang, X; Chen, B; Ding, Y; Li, Y; You, J; Zheng, J; Tao, Z; Zhao, F; Wang, J; Sun, D; Zhao, J; Meng, Y; Guan, M. Mitochondrial haplotypes may modulate the phenotypic manifestation of the deafness-associated 12S rRNA 1555A>G mutation. *Mitochondrion*, 10: 69–81, 2010.
- Martinez J, Patkaniowska A, Urlaub H. Single-stranded antisense siRNAs guide target RNA cleavage in RNAi. *Cell*; 110: 563-574, 2002.
- Mencía A, Modamio-Høybjør S, Redshaw N, Morín M, Mayo-Merino F, Olavarrieta L, Aguirre LA, del Castillo I, Steel KP, Dalmay T, Moreno F, Moreno-Pelayo MA. Mutations in the seed region of human miR-96 are responsible for nonsyndromic progressive hearing loss. *Nat Genet.* May;41(5):609-13. d, 2009.
- Miyagawa M, Nishio SY, Usami S. Prevalence and clinical features of hearing loss patients with *CDH23* mutations: a large cohort study. *PLoS One.* 7(8):e40366. 2012.
- Mochizuki T, Lemmink HH, Mariyama M, Antignac C, Gubler MC, Pirson Y, Verellen-Dumoulin C, Chan B, Schröder CH, Smeets HJ. Identification of mutations in the

- alpha 3(IV) and alpha 4(IV) collagen genes in autosomal recessive Alport syndrome. *Nature Genetics*, v.1, p. 77-81, 1994.
- Nance WE. The genetics of deafness. *Mental Retardation and Developmental Disabilities Research Reviews*, v. 9, n. 2, p. 109-119, 2003.
- Nakaya K, Harbidge DG, Wangemann P, Schultz BD, Green ED, *et al.* Lack of pendrin HCO₃⁻ transport elevates vestibular endolymphatic [Ca²⁺] by inhibition of acid-sensitive TRPV5 and TRPV6 channels. *Am. J. Physiol. Renal. Physiol.* 292:F1314–21, 2007.
- Oliveira, C.A.; Alexandrino, F.; Sandes, K.A.; Silva, W.A.; Maciel-Guerra, A. T.; Magna, L. A.; Sartorato, E. L. Frequency of the 35delG mutation in the *GJB2* gene in samples of European, Asian and African Brazilians. *Human Biology, Detroit* (76) n. 2: 313-316, 2004.
- Oliveira, C.A; Alexandrino, f.; Christiani, T.V.; Steiner, C.E; Cunha, J.L.; Guerra, A.T.; Sartorato, E.L. Molecular genetics study of deafness in Brazil: 8-year experience. *Am J Med Genet A.*: 143(14):1574-9, 2007.
- Oliveira, C.A; Pimpinati, C.J.; Alexandrino, F.; Magna, L.A.; Maciel-Guerra, A.T.; Sartorato, E.L. Allelic frequencies of the 35delG mutation of the *GJB2* gene in different Brazilian regions. *Genet Test.* 11(1):1-3, 2007.
- Park, H.; Houn Hahn, S.; Chun, Y.; Park, K.; Kim, H. Connexin 26 mutations associated with non-syndromic hearing loss. *Laryngoscope*, 110(9):1535-1538, 2000.
- Parker, M.J.; Fortnum, H.; Young, I.D.; Davis, A.C. Variations in genetic assessment and recurrence risks quoted for childhood deafness: a survey of clinical geneticists. *J Med Genet.* Feb;36(2):125-30, 1999.
- Parving A, Hauch AM. The causes of profound hearing impairment in a school for the deaf--a longitudinal study. *Br J Audiol.* Apr;28(2): 63-9, 1994.

- Paul, DL. Molecular cloning of cDNA for rat liver gap junction protein. *J Cell Biol*, 103: 123-134, 1986.
- Pera A, Dossena S, Rodighiero S, Gandia M, Botta G, Meyer G, Moreno F, Nofziger C, Hernandez-Chico C, Paulmichl M: Functional assessment of allelic variants in the *SLC26A4* gene involved in Pendred syndrome and nonsyndromic EVA. *Proc Natl Acad Sci USA* 008;105:18608-18613, 2008.
- Piatto, V.B.; Bertollo, E.M.G.; Sartorato, E.L.; Maniglia, J.V. Prevalence of the *GJB2* mutations and the del(*GJB6*-d13s1830) mutation in Brazilian patients with deafness. *Hearing Research*: 196: 87-93, 2004.
- Pollak ,A.; Skórka, A.; Mueller-Malesinska, M.; Kostrzewa, G.; Kisiel, B.; Waligóra, J.; Krajewski, P.; Oldak, M.; Korniszewski, H.; Ploski, R. M34T and V37I mutations in *GJB2* associated hearing impairment: Evidence for pathogenicity and reduced penetrance. *Am J Med Genet A.*: 143A: 2534-2543, 2007.
- Prezant, TR; Agopian, JV; Bohlman, MC; Bu, X; Oztas, S; Qiu, WQ; Arnos, KS; Cortopassi, GA; Jaber, L; Rotter, JI *et al.* Mitochondrial ribosomal RNA mutation associated with both antibiotic-induced and non-syndromic deafness. *Nat Genet*, 4: 289-294, 1993.
- Pryor SP, Madeo AC, Reynolds JC, Sarlis NJ, Arnos KS, Nance WE, Yang Y, Zalewski CK, Brewer CC, Butman JA, Griffith AJ. *SLC26A4/PDS* genotype-phenotype correlation in hearing loss with enlargement of the vestibular aqueduct (EVA): evidence that Pendred syndrome and non-syndromic EVA are distinct clinical and genetic entities. *J Med Genet*. Feb;42(2):159-65, 2005.
- Pupo, AC; Balieiro, CR; Figueiredo, RSL. Retrospective study of hearing impaired children and teenager: characterizing the etiologies and audiologic aspects. *Rev CEFAC*, 10(1):84-91, 2008.

- Rabionet, R.; Zelante, L.; Lopez-Bigas, N.; D'Agruma, L.; Melchionda, S.; Restagno, G.; Arbones, M.L.; Gasparini, P.; Estivill, X. Molecular basis of childhood deafness resulting from mutations in the *GJB2* (connexin 26) gene. *Hum Genet.* Jan;106(1):40-4, 2000.
- Rabionet, R; López-Bigas, N; Arbonès, ML; Estivill, X. Connexin mutations in hearing loss, dermatological and neurological disorders. *TRENDS in Molecular Medicine*, 8(5): 205-212, 2002.
- Reinhart BJ, Slack FJ, Basson M. The 21-nucleotide let-7 RNA regulates developmental timing in *Caenorhabditis elegans*. *J Biol Chem*; 281: 1381-1388, 2000.
- Richard, G.; Brown, N.; Smith, L.E. et al; The spectrum of mutations in erythrokeratodermis-novel and de novo mutations in *GJB3*. *Hum Genet* 106: 321-329, 2000.
- Russo, ICP. Overview of audiology in Brazil: state of the art. *Audiology*, 39(4): 202-206, 2000.
- Rydzanicz M, Wróbel M, Cywińska K, Froehlich D, Gawecki W, Szyfter W, Szyfter K Apr;13(2):167-72 Screening of the general Polish population for deafness-associated mutations in mitochondrial 12S rRNA and tRNA Ser(UCN) genes. *Genet Test Mol Biomarkers*, 2009.
- Rydzanicz M, Wróbel M, Cywińska K, Froehlich D, Gawecki W, Szyfter W, Szyfter K. Screening of the general Polish population for deafness-associated mutations in mitochondrial 12S rRNA and tRNA Ser(UCN) genes. *Genet Test Mol Biomarkers*. Apr;13(2):167-72, 2009.
- Samanich, J.; Lowes, C.; Burk, R.; Shanske, S.; LU, J.; Shanske, A.; Morrow, B.E. Mutations in *GJB2*, *GJB6*, and mitochondrial DNA are rare in African American and Caribbean Hispanic individuals with hearing impairment. *Am J Med Genet A*. Apr 15;143A(8): 830-8, 2007.

- Santos AF, Felix F, Martins GSQ, Pinna MH, Bento RF, Monteiro TA, Andrada NC. Perda Auditiva Neurossensorial: Tratamento - Associação Brasileira de Otorrinolaringologia e cirurgia Cérvico-Facial, 2011 http://www.projetodiretrizes.org.br/diretrizes11/perda_auditiva_neurossensorial_tratamento.pdf
- Santos, R.L.; Aulchenko, Y.S.; Huygen, P.L.; Van Der Donk, K.P.; Wijs, I.J.; Kemperman, M.H.; Admiraal, R.J.C.; Kremer, H.; Hoefsloot, L.H.; Cremers, C.W.R.J. Hearing impairment in Dutch patients with connexin 26 (*GJB2*) and connexin 30 (*GJB6*) mutations. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol* 69 (2): 165-174, 2005.
- Sartorato, E.L.; Gottardi, E.; Oliveira, C.A.; Magna, L.A.; Annichino-Bizzachi, J.M.; Seixas, C.A.; Maciel-Guerra, A.T. Determination of carrier frequency of the 35delG mutation in Brazilian neonates. *Clinical Genetics*. 58(4):339, 2000.
- Scott DA, Wang R, Kreman TM, Sheffield VC, Karniski LP. The Pendred syndrome gene encodes a chloride-iodide transport protein. *Nature Genetics*, v. 21, n. 4, p. 440-3, 1999.
- Scott HS, Kudoh J, Wattenhofer M, Shibuya K, Berry A, Chrast R, Guipponi M, Wang J, Kawasaki K, Asakawa S, Minoshima S, Younus F, Mehdi SQ, Radhakrishna U, Papasavvas MP, Gehrig C, Rossier C, Korostishevsky M, Gal A, Shimizu N, Bonne-Tamir B, Antonarakis SE. Insertion of beta-satellite repeats identifies a transmembrane protease causing both congenital and childhood onset autosomal recessive deafness. *Nature Genetics*, v. 27, n. 1, p. 59-63, 2001.
- Seeman, P.; Sakmaryova, I.; High prevalence of the IVS a + 1G to A/*GJB2* mutation among Czech hearing impaired patients with monoallelic mutation in the coding region of *GJB2*. *Clinical Genetics* 69: 410-413, 2006.

- Shahin H, Walsh T, Sobe T, Abu Sa'ed J, Abu Rayan A, Lynch ED, Lee MK, Avraham KB, King MC, Kanaan M. Mutations in a novel isoform of TRIOBP that encodes a filamentous-actin binding protein are responsible for DFNB28 recessive nonsyndromic hearing loss. *American Journal of Human Genetics*, v. 78, n. 1, p. 144-52, 2006.
- Shahin, H.; Walsh, T.; Sobe, T.; Lynch, E.; King, M.C.; Avraham, K.B.; Kanaan, M.. Genetics of congenital deafness in the Palestinian population: multiple connexin 26 alleles with shared origins in the Middle East. *Hum Genet* 110: 284-289, 2002
- Simões, A.M. & Maciel-Guerra, A.T. A surdez evitável: predominância de fatores ambientais na etiologia da surdez neurosensorial profunda. *Jornal de Pediatria*. 68:254-257, 1992.
- Smith, RJ, Bale, JF, Jr., and White, KR. Sensorineural hearing loss in children. *Lancet* 365: 879–890, 2005.
- Snoeckx, R.L; Huygen, P.L.M.; Feldmann, D.; ET AL. *GJB2* Mutations and Degree of Hearing Loss: A Multicenter Study. *Am. J. Hum. Genet.* 77:945–957, 2005.
- Soldà G, Robusto M, Primignani P, Castorina P, Benzoni E, Cesarani A, Ambrosetti U, Asselta R, Duga S. A novel mutation within the MIR96 gene causes non-syndromic inherited hearing loss in an Italian family by altering pre-miRNA processing. *Hum Mol Genet.* Feb 1;21(3):577-85, 2012.
- Steel, K.P. Genetic deafness: a step closer. *Pediatrics*. Mar;103(3): 674, 1999.
- Sue CM, Tanji K, Hadjigeorgiou G, Andreu AL, Nishino I, Krishna S, Bruno C, Hirano M, Shanske S, Bonilla E, Fischel-Ghodsian N, DiMauro S, Friedman R. Maternally inherited hearing loss in a large kindred with a novel T7511C mutation in the mitochondrial DNA tRNA(Ser(UCN)) gene. *Neurology*, v. 52, n. 9, p. 1905-1908, 1999.

- Schultz JM, Bhatti R, Madeo AC, Turriff A, Muskett JA, Zalewski CK, King KA, Ahmed ZM, Riazuddin S, Ahmad N, Hussain Z, Qasim M, Kahn SN, Meltzer MR, Liu XZ, Munisamy M, Ghosh M, Rehm HL, Tsilou ET, Griffith AJ, Zein WM, Brewer CC, Riazuddin S, Friedman TB. Allelic hierarchy of *CDH23* mutations causing non-syndromic deafness DFNB12 or Usher syndrome USH1D in compound heterozygotes. *J Med Genet* Nov;48(11):767-75, 2011.
- Sun, J.; Ahmad, S.; Chen, S.; Tang, W.; Zhang, Y.; Chen, P.; Lin, X. Cochlear gap junctions coassembled from Cx26 and 30 show faster intercellular Ca²⁺ signaling than homomeric counterparts. *Am J Physiol Cell Physiol*. Mar;288(3): C613-23, 2005.
- Tang, H.Y.; Fang, P.; Ward, P.A.; Schmitt, E.; Darilek, S.; Manolidis, S.; Oghalai, J.S.; Roa, B.B.; Alford, R.L. DNA sequence analysis of *GJB2*, encoding connexin 26: observations from a population of hearing impaired cases and variable carrier rates, complex genotypes, and ethnic stratification of alleles among controls. *Am J Med Genet A*. 15;140(22):2401-15, 2006.
- Van Camp, G & Smith, RJH. Hereditary Hearing Loss Homepage. Disponível em <<http://hereditaryhearingloss.org>>. Acesso 2012.
- Van Laer, L.; Coucke, P.; Mueller, R.F.; Caethoven, G.; Flothmann, K.; Prasad, S.D.; Chamberlin, G.P.; Houseman, M.; Taylor, G.R.; Van de Heyning, C.M.; Franssen, E.; Rowland, J.; Cucci, R.A.; Smith, R.J.; Van Camp, G. A common founder for the 35delG *GJB2* gene mutation in connexin 26 hearing impairment. *J Med Genet*. Aug;38(8): 515-8, 2001.
- Wagatsuma M, Kitoh R, Suzuki H, Fukuoka H, Takumi Y, et al. Distribution and frequencies of *CDH23* mutations in Japanese patients with nonsyndromic hearing loss. *Clin Genet* 72: 339–344, 2007

- Wilch, E.; Zhu, M.; Burkhart, K.B.; Regier, M.; Elfenbein, J.L.; Fisher, R.A.; Friderici, K.H. Expression of *GJB2* and *GJB6* is reduced in a novel *DFNB1* allele. *The American Journal of Human Genetics* 79: 174-179, 2006.
- Wilch, E; Azaiez, H; Fisher, RA; Elfebein, J; Murgia, A; Birkenhäger, R; Bolz, H; da Silva-Costa, SM; Del Castilho, I; Haaf, T; Hoefsloot, L; Kremer, H; Kubisch, C; Le Marechal, C, Pandya, A, Sartorato, EL; Schneider, E; Van Camp, G; Wuyts, W; Smith, RJ; Friderici, KH. A novel *DFNB1* deletion allele supports the existence of a distant cis-regulatory region that controls *GJB2* and *GJB6* expression. *Clin Genet*, 78(3): 267-274, 2010.
- Wilcox, S.A.; Saunders, K.; Osborn, A.H.; Arnold, A.; Wunderlich, J.; Kelly, T.; Collins, V.; Wilcox, L.J.; McKinlay Gardner, R.J.; Kamarinos, M.; Cone-Wesson, B.; Williamson, R.; Dahl, H.H. High Frequency Hearing Loss Correlated with mutations in the *GJB2* Gene. *Hum. Genet.* 106: 399-405, 2000.
- Willecke, K.; Eiberger, J.; Degen, J.; Eckardt, D.; Romualdi, A.; Guldenagel, M.; et al. Structural and functional diversity of connexin genes in the mouse and human genome. *Biol Chem*, 383: 725-737, 2002.
- Wong LJ, Liang MH, Kwon H, Park J, Bai RK, Tan DJ. Comprehensive scanning of the entire mitochondrial genome for mutations. *Clin Chem*. Nov;48(11):1901-12, 2002.
- Wu CC, Lu YC, Chen PJ, Yeh PL, Su YN, Hwu WL, Hsu CJ. Phenotypic analyses and mutation screening of the *SLC26A4* and *FOXI1* genes in 101 Taiwanese families with bilateral nonsyndromic enlarged vestibular aqueduct (*DFNB4*) or Pendred syndrome. *Audiol Neurootol*.15(1):57-66, 2010
- Xia, J.H.; Liu, C.Y.; Tang, B.S. ET AL Mutations in the gene encoding gap junction protein beta-3 associated with autosomal dominant hearing impairment. *Nature Genet* 20: 370-373, 1998.

- Xia, A.; Katori, Y.; Oshima, T.; Watanabe, K.; Kikuchi, T.; Ikeda, K. Expression of connexin 30 in the developing mouse cochlea. *Brain Res.* Apr 20;898(2):364-7, 2001.
- Yang T, Gurrola JG, Wu H, Chiu SM, Wangemann P, Snyder PM, Smith RJ. Mutations of KCNJ10 together with mutations of *SLC26A4* cause digenic nonsyndromic hearing loss associated with enlarged vestibular aqueduct syndrome. *American Journal of Human Genetics*, v. 84, n. 5, p. 651-7, 2009.
- Yang T, Vidarsson H, Rodrigo-Blomqvist S, Rosengren SS, Enerback S, Smith RJ. Transcriptional control of *SLC26A4* is involved in Pendred syndrome and nonsyndromic enlargement of vestibular aqueduct (DFNB4). *American Journal of Human Genetics*, v. 80, n. 6, p. 1055-63, 2007.
- Zhao H, Young WY, Yan Q, Li R, Cao J, Wang Q, Li X, Peters JL, Han D, Guan MX. Functional characterization of the mitochondrial 12S rRNA C1494T mutation associated with aminoglycoside-induced and non-syndromic hearing loss. *Nucleic Acids Res.* Feb 18;33(3):1132-9, 2005.
- Zelante, L; Gasparini, P; Estivill, X; Melchionda, S; D'Agruma, L; Govea, N; Milá, M; Monica, MD; Lutfi, J; Shohat, M; Mansfield, E; Delgrosso, K; Rappaport, E; Surrey, S; Fortina P. Connexin 26 mutations associated with the most common form of non-syndromic neurosensory autosomal recessive deafness (DFNB1) in Mediterraneans. *Hum Mol Genet*, 6(9): 1605-1609, 1997.

ANEXOS

Genet Test Mol Biomarkers. 2011Dec;15(12):849-53. doi:10.1089/gtmb.2011.0034.

Searching for digenic inheritance in deaf Brazilian individuals using the multiplex ligation-dependent probe amplification technique.

da Silva-Costa SM, Martins FT, Pereira T, Pomilio MC, Marques-de-Faria AP, Sartorato EL.

Source

Centro de Biologia Molecular e Engenharia Genética, Universidade Estadual de Campinas, Cidade Universitária Zeferino Vaz s/n, Barão Geraldo, Campinas, Brazil.

Abstract

Mutations in the genes coding for connexin 26 (Cx26), connexin 30 (Cx30), and connexin 31 (Cx31) are the main cause of autosomal recessive nonsyndromic sensorineural hearing loss (AR-NSNHL). The 35delG mutation is the most frequent in the majority of Caucasian populations and may account for up to 70% of all GJB2 mutations. As a large number of affected individuals (10%-40%) with GJB2 mutations carry only one mutant allele, it has been postulated that the presence of additional mutations in the GJB6 gene (Cx30) explains the deafness condition found in these patients. In the present study, we screened the c.35delG mutation in ~600 unrelated Brazilian patients, with moderate to profound AR-NSNHL. Other point mutations in the coding region of the GJB2 gene were screened by sequencing analysis as well as the IVS 1+1 G>A splice site mutation in the same gene. Digenic mutations including large deletions and duplications were investigated in the Cx26, 30, and 31 genes in monoallelic individuals for mutations in the GJB2 gene. Large deletions and duplications were assessed by multiplex ligation-dependent probe amplification. We found 46 patients with mutations in only one GJB2 allele. Different pathogenic mutations associated with c.35delG were found in 13 patients. Two patients were identified with digenic heterozygous mutations. Our findings contributed to more accurate diagnosis and more appropriate genetic counseling in 28% of patients studied (13/46).

Clin Genet. 2010 Sep;78(3):267-74. doi: 10.1111/j.1399-0004.2010.01387.x.

A novel DFNB1 deletion allele supports the existence of a distant cis-regulatory region that controls GJB2 and GJB6 expression.

Wilch E, Azaiez H, Fisher RA, Elfenbein J, Murgia A, Birkenhäger R, Bolz H, Da Silva-Costa SM, Del Castillo I, Haaf T, Hoefsloot L, Kremer H, Kubisch C, Le Marechal C, Pandya A, Sartorato EL, Schneider E, Van Camp G, Wuyts W, Smith RJ, Friderici KH.

Source

Genetics Program, Michigan State University, East Lansing, MI 48824, USA.

Abstract

Eleven affected members of a large German-American family segregating recessively inherited, congenital, non-syndromic sensorineural hearing loss (SNHL) were found to be homozygous for the common 35delG mutation of GJB2, the gene encoding the gap junction protein Connexin 26. Surprisingly, four additional family members with bilateral profound SNHL carried only a single 35delG mutation. Previously, we demonstrated reduced expression of both GJB2 and GJB6 mRNA from the allele carried in trans with that bearing the 35delG mutation in these four persons. Using array comparative genome hybridization (array CGH), we have now identified on this allele a deletion of 131.4 kb whose proximal breakpoint lies more than 100 kb upstream of the transcriptional start sites of GJB2 and GJB6. This deletion, del(chr13:19,837,344-19,968,698), segregates as a completely penetrant DFNB1 allele in this family. It is not present in 528 persons with SNHL and monoallelic mutation of GJB2 or GJB6, and we have not identified any other candidate pathogenic copy number variation by arrayCGH in a subset of 10 such persons. Characterization of distant GJB2/GJB6 cis-regulatory regions evidenced by this allele may be required to find the 'missing' DFNB1 mutations that are believed to exist.



FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

<http://www.fcm.unicamp.br/fcm/pesquisa/comite-de-etica-em-pesquisa>

CEP, 22/01/13.
(PARECER CEP: N° 396/2006)

PARECER

I-IDENTIFICAÇÃO:

PROJETO: “ESTUDO MOLECULAR DA PERDA AUDITIVA”.

PESQUISADOR RESPONSÁVEL: Edi Lúcia Sartoro

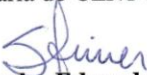
II – PARECER DO CEP.

O Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP tomou ciência e aprova o adendo que inclui o projeto “ESTUDO MOLECULAR EM INDIVÍDUOS SURDOS COM DIAGNÓSTICO GENÉTICO INDEFINIDO”, com a finalidade de doutorado da aluna Sueli Matilde da Silva Costa, referente ao protocolo de pesquisa supracitado.

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

III – DATA DA REUNIÃO.

Homologado na I Reunião Ordinária do CEP/FCM, em 22 de janeiro de 2013.


Prof. Dr. Carlos Eduardo Steiner
COORDENADOR do COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA
FCM / UNICAMP

Lista dos *primers* utilizados nos ensaios *iPLEX® Gold Genotyping - MALDI-TOF /MS MassArray-System* (Sequenom, Inc.).

1. *Primers* utilizados no rastreamento de deleções ou duplicações no *locus* DFNB1

Well	SNP-ID	Primer Capture F	Primer Capture R	Primer Extensão
W1	rs9315384	ACGTTGGATGTTAGGTTGACAAGCACCTTC	ACGTTGGATGCAGACAGCAGAGACTCTATC	CAAGCACCTTCACATTT
W1	rs944015	ACGTTGGATGCCAGCCTTCAAATACAGC	ACGTTGGATGATTCGCCAGGACAGAACAGT	TACAGCTTGAGGCTTCA
W1	rs7327522	ACGTTGGATGATATTCTCCACAAAACGGG	ACGTTGGATGTCTCACCTCTGTTGGATACC	AGGAAGACATGGGTTCT
W1	rs17081227	ACGTTGGATGTTTCCTCTCTGTCTACCCCG	ACGTTGGATGCAGGGAACCTTGAGTACTGG	CACCTATACACATCCAG
W1	rs4770027	ACGTTGGATGCAACACAGGAAGGCATTGTC	ACGTTGGATGAGAACCACAGAGTTGAACAG	AAGGCATTGTCCAGGTGA
W1	rs9506487	ACGTTGGATGCAGAGCTCCGTGTATCTCAG	ACGTTGGATGGAGAACACATCCTTTCTGGG	gaTCAGCGCTGCCTTTTCT
W1	rs9506498	ACGTTGGATGTAGTTTCCTCTCCTCATCCG	ACGTTGGATGACAAGGCATGACATGTTGAG	GGCTCTGTGTTCTACATAA
W1	rs7332444	ACGTTGGATGAATTCAGGACCAAGTTGGG	ACGTTGGATGATCCAGCTTTTGATCTTC	cGGGGGAAAAGTAGAGCAA
W1	rs9552152	ACGTTGGATGCATAAGCCAGCAGGCAGATA	ACGTTGGATGCACCACATCCTTTCTAAGGC	CAGCAGGCAGATAAACTAAA
W1	rs9506494	ACGTTGGATGCTAGGTAAGTACTGCAACACAGG	ACGTTGGATGTTGTTTTGCTCTGGGTGGG	AACACAGGTGTAAGCTGA
W1	rs9509128	ACGTTGGATGATCCGATCCCTGATCTACCA	ACGTTGGATGTGGAGGACACTAAATGGGAC	GGATAACTTCTCCATCATCT
W1	rs9578271	ACGTTGGATGGAAGTGAGTTCCTCAGTCAG	ACGTTGGATGTGGACTCACGGAATGAATGC	gGCTGTGTGGAATAGTATGAC
W1	rs9509249	ACGTTGGATGTCAGGTGTCCCCTGAACAAT	ACGTTGGATGGGGAGTAAGAGATACAGGAC	CCCTGAACAATGTCTGTTTCTG

W1	rs7987144	ACGTTGGATGTACTGAGACCTCATAATCTG	ACGTTGGATGTGGCTCTGCACTGCACACCT	GACCTCATAATCTGAGACAAAG
W1	rs10492508	ACGTTGGATGGTGAAGGCTCAAGGATGGAC	ACGTTGGATGACCATGCCCGACCTGACAT	agGAGCTCCATGAAATTGTTTA
W1	rs9552183	ACGTTGGATGATACTAGAGCTGTCCTTCCC	ACGTTGGATGAGAGACCTTGGTTAGGAGTG	gtTTCCCCTCTGACATCTGCAC
W1	rs945372	ACGTTGGATGGTGATTAAAGTCTACGCCTG	ACGTTGGATGAAAGTTACCCCAAAGGCCAC	ctTCTACGCCTGACTTCCCCTT
W1	rs9550633	ACGTTGGATGCCATAGCCACCTCTATGAT	ACGTTGGATGAGATGGGCAGGGAGTGGTTC	CCTCTATGATTTGGTTCAGTTCTC
W1	rs945366	ACGTTGGATGATCTGCCGTGCGTATCATT	ACGTTGGATGCCTATCTCTTGACACTTGCG	gCTGCAGGCCAACAGCCAGGGAGA
W1	rs9550638	ACGTTGGATGTGGGACTATCTCTCAAGGTG	ACGTTGGATGTTAAACTCCCCATTGATCCC	tcCAGAGATATAGTAAGGGAGGTA
W1	rs2314232	ACGTTGGATGCAACTCCAGTGCTGGTATT	ACGTTGGATGCAGCGTGTGAGTACATGATA	ttTATTATATTCCACATGGAGCCC
W1	rs7981756	ACGTTGGATGGATAGAAATGGCATTAAACC	ACGTTGGATGTGAGCCTAGGATGATCAAAC	GAAATGGCATTAAACCTGTACATCA
W1	rs6650231	ACGTTGGATGAAAGGGCAACTGAAGCACTG	ACGTTGGATGTAGGAGGAAGCCAACAGAAC	TGATTAAACCCCAAGCCATACAGCC
W1	rs7321826	ACGTTGGATGTTGCCAGTGTGGGTCTGCT	ACGTTGGATGTGGTTGTTGCAAACCTGGGAC	CTTTAAAGTGATTATTAAGTGTTAC
W1	rs9509191	ACGTTGGATGTCGAACTCATCTTCCGAC	ACGTTGGATGCCATTCCCATCAACACATTG	cccttTTCCGACTATTATCCTCTGA
W1	rs9315492	ACGTTGGATGATGGAACCTGCAGGTGAAC	ACGTTGGATGTCATGGCAGCCTTTCTTCTAG	ctAACAGACAAAAATCATGTCTTCGTC
W 2	rs11147641	ACGTTGGATGACAGCTAATCTCCAGATCAC	ACGTTGGATGTTTTGGCCGAGCTGCACAT	TCCAGATCACACCCAT
W 2	rs7319601	ACGTTGGATGGAAGGTGTGTCTCAGCAA	ACGTTGGATGGGCCAGAGCTTGTGCTTCT	ACCAAGACAGGAAGACA
W 2	rs4331204	ACGTTGGATGTATTACAAGTCTTCTAGCC	ACGTTGGATGAGAGGAGTGGTTGTGGTCAG	AGTCTTCTAGCCTCTACA
W 2	rs4770014	ACGTTGGATGGTGAGTTAACCGTCTTTGTG	ACGTTGGATGCAAATTCCTGAAGCATAAC	cCCGTCTTTGTGGAGGTA
W 2	rs3936015	ACGTTGGATGTCTCTTCTAGCCAGCTATG	ACGTTGGATGCAGAAAGGCCATGAAGAGTG	cCTCCTGTTACACGACCTG
W 2	rs9509266	ACGTTGGATGCCTTCATAGGGCACATCAGT	ACGTTGGATGTGCGTGGTCCCAATAGACAG	AGCAGTCTCTGTTACAAAC
W 2	rs7323769	ACGTTGGATGCATTTTGAATGAGCAGTTC	ACGTTGGATGTATGGGCCAAATTGCTCCG	GGAATGAGCAGTTCACATAC

W 2	rs4272877	ACGTTGGATGTCATTTCACTCCCCTGCTTG	ACGTTGGATGTCAATTGCACAGGGGAAAAG	ggaTGCTTGAAGTTTCAGT
W 2	rs12868032	ACGTTGGATGCTGAAGGCATTTTTGAAACTC	ACGTTGGATGAACCGAGAGTGATTTTTAGG	ACTCAAATAAACTTCCTCTG
W 2	rs9652061	ACGTTGGATGGTAAACCTTGGGCAGCAATG	ACGTTGGATGAATGGGAAGCCTGCCATCTC	TGCTCTTATATCAGAATTGGCT
W 2	rs7335998	ACGTTGGATGGACAGACTTCCAACAGCAA	ACGTTGGATGCAGGGAACCTAATAGCTGAA	gCCAACAGCAAAATATCAAGTT
W 2	rs9315607	ACGTTGGATGCAAGGCCAGATATTTTAA	ACGTTGGATGCTATGAGTTTTTGTATGTC	CAGATATTTTAAAAGTGAACCTCA
W 2	rs9509119	ACGTTGGATGACACCACAGCCCCTCCATC	ACGTTGGATGCTGTTGTGTATTTCCAGTTCC	CGCCACACCACCACGGCCGCCTGGA
W 2	rs7337130	ACGTTGGATGGTTGGGTTGCTCTTGATGTC	ACGTTGGATGCAAATGTCCACAGGAAAATC	ACAAAGAAACTCTGTTGGTCCTGATT
W 2	rs9552217	ACGTTGGATGGACTCCATTAAACCTTTTTC	ACGTTGGATGGTCTGTTTTCATGCTGCTAA	CCATTAAACCTTTTTCTTTCTTAAATT

2. Primers utilizados no rastreamento de mutações em genes nucleares.

Well	SNP-ID	Primer Capture F	Primer Capture R	Primer Extensão
W1	GJB2_p_V37I	ACGTTGGATGCCACACCTCCTTTGCAG	ACGTTGGATGCAGCATTGGAAAGATCTGGC	CTCCTTGCAGCCACAA
W1	WFS1_Ala716Thr	ACGTTGGATGTGAAGAACGGGAGCATGTTG	ACGTTGGATGCTTCAAGTACGTCCGCGTG	GTTGATGGCAGACTCGG
W1	GJB2_p_W172X	ACGTTGGATGAAGCAGTCCACAGTGTGGG	ACGTTGGATGATGTCATGTACGACGGCTTC	ACAGTGTGGGACAAGG
W1	TECTA_c_5668C-T	ACGTTGGATGACACTGGCAACATCATCACC	ACGTTGGATGAGGAGATCTTGATATCCAGC	AACATCATCACCAGGGAC
W1	MYO15_c_6796G-A	ACGTTGGATGTGTTTTCCCTTGCTTCCAC	ACGTTGGATGATTCCTTGCTCATAGAGACC	CTTGCTTCCACAGGCTATG
W1	GJB2_p_R75Q	ACGTTGGATGACGTGTGCTACGATCACTAC	ACGTTGGATGACACGAAGATCAGCTGCAGG	aTCCCCATCTCCCACATCC
W1	SLC_1229C-T	ACGTTGGATGTTGTTTTGTGGCCACCACTG	ACGTTGGATGCTGTTGTTCTACCTGTGTC	tACCACTGCTTTCCCGCA
W1	GJB2_p_M93I	ACGTTGGATGCCTCTTCTTCTCATGTCTCC	ACGTTGGATGCTGCAGCTGATCTTCTGTGTC	TGTCTCCGGTAGGCCACGTG
W1	TMPR_207delC	ACGTTGGATGACATCTGTACTTCCCTGAGC	ACGTTGGATGCACTCTGAAAGAGCTGTTGG	TTCCTGAGCAGTGAAGTG
W1	MYO15_c_10573delA	ACGTTGGATGATGAGAAGCGGCTCACATTG	ACGTTGGATGTCTGGCAGAAGGTAAGTGGAG	tctCGGCTCACATTGCCCCCC
W1	OTOF_2905-23_D19I11	ACGTTGGATGACATGTACCAGGCCCGCAG	ACGTTGGATGATTGATGAAGAAGACGCGGG	tgctCGCAGCCTCTTTGCCGC
W1	SLC_578C-T	ACGTTGGATGTACCTGTATAATTCCAACC	ACGTTGGATGGACTGCAGCTAGAGATAC	cttcTAATTCCAACCAGCAGA
W1	MIR96_13G-A	ACGTTGGATGCACTGCACATGATTGCTCAG	ACGTTGGATGCACCAGTGCCATCTGCTTG	ACAAGCAAAAATGTGCTAGTG
W1	GJB2_p_N206S	ACGTTGGATGCAGTGTCTGGAATTTGCATC	ACGTTGGATGTGGCTTTTTGACTTCCCAG	tcttGAATTTGCATCCTGCTGA
W1	SLC_425C-T	ACGTTGGATGAGACTTTTTTTCCCAAGGAC	ACGTTGGATGTACGAGAAAGTTCGTGCGG	cttgTTTTCCCAGGACCTTTTC
W1	GJB2_p_E147K	ACGTTGGATGCCTACACAAGCAGCATCTTC	ACGTTGGATGAGCCGTCGTACATGACATAG	taacCTTCTCCGGGTCATCTTC
W1	OTOF_c_2485C-T	ACGTTGGATGAGGTGAAGCGGCACCGGT	ACGTTGGATGAAGCGCAGCTTCTGCAGGA	cactGGACAAGCTGAGGCTGTGC
W1	TMC1_c_1334G-A	ACGTTGGATGCCTTGTGTTAATCTCATCC	ACGTTGGATGCATCGCTTTGAAATGGCTAC	TGCCTAAAAGAAGAGCAAAAATG

W1	OTOF_c_4491T-A	ACGTTGGATGAGACTTGCAAGGAGGGAAAG	ACGTTGGATGGCAATGACCCCATCAATGTG	ctACGGGAGTCTACCCGGACCAC
W1	OTOF_5800-5801insC	ACGTTGGATGTTTACTGACAGCAGAGGAGG	ACGTTGGATGCAGGGCACTCACTTGGGTT	cttCCCGCAATGAACCTGACCCCC
W1	MTT_m_7445A-G	ACGTTGGATGACCACACATTCGAAGAACCC	ACGTTGGATGGGCTTGAAACCAGCTTTGGG	AAGAACCCGTATACATAAAATCTAG
W1	CDH23_P240L	ACGTTGGATGGAGGAGAATGCTCGTAGATG	ACGTTGGATGCTTGGCCATCATCATCACAG	agGCTCGTAGATGTTGGTGCTGTAA
W1	MTR_m_1494C-T	ACGTTGGATGAGTTGAACAGGGCCCTGAAG	ACGTTGGATGCCTCTATATAAATGCGTAGGG	ttAAGCGGTACACACCCGCCCTCAC
W1	1622T-C_rs144457142	ACGTTGGATGGCCTAAAATCATTGGGTTGC	ACGTTGGATGCCCTTCAAACCATTTTGGG	gggtTTGCAATTTATTTGCTTCAAAT
W1	KCN_P194H	ACGTTGGATGTTTCAGCCAGCATGCAGTTG	ACGTTGGATGGAGGCTTTTGCGCATATTGG	ccGTTGTGGCCTCCACAATGGCAAGC
W2	OTOF_c_3400C-T	ACGTTGGATGAAAAGGGAAGGGCCACACAG	ACGTTGGATGTGGACCGAGGTCCCATCAT	CCCTCGCACCTCCACTC
W2	TMC1_c_1939T-C	ACGTTGGATGAGGGTCTTCAAAGCTTCCAG	ACGTTGGATGCGATCATGTACAAGACAGGC	TGCTCATCTCTTCTG
W2	SLC_1334T-G	ACGTTGGATGTGATGATCGCCATTCTTGCC	ACGTTGGATGCAATCGGTATGCAGAGAAGC	GAAGCTTCTGGAACCTT
W2	CDH23_R1746Q	ACGTTGGATGCTCAGGTGCTTGTGAATGTG	ACGTTGGATGGTGACTTCAAATGGTCCCTC	ATGTGCCTACCTTCCCC
W2	OTOF_c_4227_1G-T	ACGTTGGATGCACACACCCTAGAAGGGTC	ACGTTGGATGCCGAGAAGAAGAAACCCAAG	gCTGCTCCTAGGCTCTCA
W2	SLC_279delT	ACGTTGGATGGTCAAGGAATGGCTGCTTAG	ACGTTGGATGGCCAACATTTACCTTGCAG	CGTCATTTCTGGGAGTTAG
W2	OTOF_c_3239G-C	ACGTTGGATGCTCAGCTCGAGTACTACCAG	ACGTTGGATGTCTTCCCTGCAGTCCCACCT	GAGTACTACCAGATCTACC
W2	GJB2_c_167delT	ACGTTGGATGTTGTGGCTGCAAAGGAGGTG	ACGTTGGATGGATCGTAGCACACGTTCTTG	ctcTTTGTCTGCAACACCC
W2	KCNQ4_W276S	ACGTTGGATGACTCCGACTTCTCTCTCTAC	ACGTTGGATGAGAAGGGCAGCCCTACAAAG	ttgCGCCGACTCGCTCTGGT
W2	TMC1_c_1165C-T	ACGTTGGATGGGATACCTCATCTTTTGGGC	ACGTTGGATGTTTTTCCCACCACCCAAGG	TCATCTTTTGGGCTGTGAAG
W2	GJB2_p_K168R	ACGTTGGATGATGTCATGTACGACGGCTTC	ACGTTGGATGAAGCAGTCCACAGTGTGGG	tttCATGCAGCGGCTGGTGA
W2	CDH23_Asp2148ASN	ACGTTGGATGGGGAGTCAATTGATGTCATCG	ACGTTGGATGAGTCTACAGGCTAACGGTG	gGAGAGGAACGGTGCCCCGGT
W2	TRIOBP_R347X	ACGTTGGATGATCTACACAGTGGAAACACCC	ACGTTGGATGTGGGTAGAAGAGGTTCTGGG	gggCAGAGCTTCTCTCCCTCA
W2	OTOF_c_3413T-C	ACGTTGGATGAGGTTACCCGCTTTAGGTC	ACGTTGGATGCTCTTCTCTGCACCCAC	cttGTCCCGTAGGCCCCAGAAC

W2	MIR96_c_14C-A	ACGTTGGATGCACTGCACATGATTGCTCAG	ACGTTGGATGCACCAGTGCCATCTGCTTG	gaaaAAGCAAAAATGTGCTAGT
W2	SLC_1226G-A	ACGTTGGATGCTGTTGTTCTACCTGTGTC	ACGTTGGATGTTGTTTTGTGGCCACCACTG	ccGTGCTCTCTGGACGGCCGTG
W2	SLC_1707_5G-A	ACGTTGGATGTTCTATGGCAATGTCGATGG	ACGTTGGATGGAAGTCTCAAAGAGGTTAG	taacTGTATCAAGTCCACAGTAA
W2	TECTA_c_5509T-G	ACGTTGGATGCTAAGTGAAGCTCTCCAG	ACGTTGGATGAAAATCTTCCCCTCGATGC	gtggGAGGATCAATGACAGACAG
W2	SLC_1826T-G	ACGTTGGATGGGGATATCAAGTTCCTCCAG	ACGTTGGATGTCTTCGTTTAGAATGGCATC	GGCTCAAAGCATTATTTGTTGAA
W2	MYO15_c_3334delG	ACGTTGGATGAAAGAGCTCAGTCTGCAC	ACGTTGGATGCCAGAGCCCCTGCCAAG	ccatGCATGACCACAGCAAACGCC
W2	SLC_412G-T	ACGTTGGATGATCTTTGGAACATCAAGAC	ACGTTGGATGGCACTTAATATAGCCAAAAC	ccTTGGAACATCAAGACATATCTCA
W2	TECTA_c_5597C-T	ACGTTGGATGGTTGTTGGCGCTTCGATCC	ACGTTGGATGTCTGACTCCCCTTGTTCTG	GAGTGTGTTTTTATACATGATATGC
W2	TMPR_c_413C-A	ACGTTGGATGTACCTTGGGAAACCCAGTTG	ACGTTGGATGTCGTGGAAGACCATGTGCTC	ggaaAGTTGGGCACAGGCAACATTT
W2	OTOF_c_5431A-T	ACGTTGGATGATCTTGTACTCGGTCTCGTC	ACGTTGGATGTGTTCCCTTCGACTACCTG	gtatTCCCAGGAGAACATGGACTCCT
W2	GJB2_IVS1A	ACGTTGGATGAGAGACCCCAACGCCGAGA	ACGTTGGATGAGGTTCTGGCCGGGCAGT	actCCGCCGCTTCTCCCGACGCAG
W2	c_100C-T	ACGTTGGATGTCTGGTCCGTTTCCTTTG	ACGTTGGATGTAGGTGAAGAGGAAGAGGAG	aacgaTTTGGTCTCAAGCTCTCTCTTC
W3	GJB2_p_E129K	ACGTTGGATGAGATGACCCGGAAGAAGATG	ACGTTGGATGGGAGATCAAACCCAGAAGG	CCACCACAGGGAGCCTT
W3	GJB2_c_235delC	ACGTTGGATGACGTGTGCTACGATCACTAC	ACGTTGGATGTGGCGTGGACACGAAGATCA	ACATCCGGCTATGGGCC
W3	GJB2_c_35delG	ACGTTGGATGTCTTTCCAGAGCAAACCGC	ACGTTGGATGCAATGCTGGTGGAGTGTGTTG	GCAGACGATCTGGGGG
W3	GJB2_p_S113R	ACGTTGGATGGGGTTTTGATCTCTCGATG	ACGTTGGATGCGGAGACATGAGAAGAAGAG	CCTCGATGTCCTTAAATTC
W3	OTOF_c_1601delC	ACGTTGGATGATCCAGCAGCGTGTAGTTAC	ACGTTGGATGCCCTCATTGTTTGTCCAC	ACATGTTCAACCAGGCTGG
W3	c_2905-2923D19I11-2	ACGTTGGATGATTGATGAAGAAGACGCGGG	ACGTTGGATGTTCCAGCTCCGAGCGCAT	AGAGTCGCTGCTGTCCGGC
W3	CDH23_Q1716P	ACGTTGGATGTGAGGCGGTGGGATAAGATG	ACGTTGGATGTGGACTACGAGATCAGCCAC	cTGGGATAAGATGGGGCAC
W3	SLC_2326C-T	ACGTTGGATGTGTTTTCCCTTGCTCCAC	ACGTTGGATGATTCCTTGCTCATAGAGACC	CCCTTGCTCCACAGGCTATG
W3	SLC_c_445G-A	ACGTTGGATGTACGAGAAAGTTCGTCGG	ACGTTGGATGTTCCCAGGACCTTTCCAG	CCATGCTCAGAACAACAGATC

W3	TECTA_c_3107G-A	ACGTTGGATGATGAGGGCTATGCTCTACTG	ACGTTGGATGTCATTGGTGGCAAGTTGGTG	AGTGTGTCACGCGGAGTGAGT
W3	CDH23_p_D2202N	ACGTTGGATGATGCCGACAATGTGGTACTC	ACGTTGGATGTGAGCCAGGCACTGTCATTG	tcCTCTAGCTTTGGGTTGAGGT
W3	OTOFc_2122C-T	ACGTTGGATGATGTTGGCATTGTAGAGGCG	ACGTTGGATGACTACTTCCATCTGCCCTAC	tttATGTAGATGCAGGGCTTTC
W3	TMIE_R84W	ACGTTGGATGTACATCTTGGCTGCCTTTCG	ACGTTGGATGTGCTGTGTCTTCAACTGTCG	ctCTTCGATCTCCTCCGGGTCC
W3	MTR_m_1555A-G	ACGTTGGATGCACCTTCCAGTACACTTACC	ACGTTGGATGACCCTCCTCAAGTATACTTC	TACACTTACCATGTTACGACTTG
W3	MYO15_9957_9960del	ACGTTGGATGACACTGTGAAGAGTCCCTT	ACGTTGGATGTGCAGCCAAGTGCCTGCACG	ggagtAAGAGTCCCTCAGGTAG
W3	GJB2_p_R184P	ACGTTGGATGGCAGGATGCAAATCCAGAC	ACGTTGGATGCAACACTGTGGACTGCTTTG	cccacGACAGTCTTCTCCGTGGGC
W3	OTOF_1841G-A	ACGTTGGATGGAGCTGTGCAGGTAATGG	ACGTTGGATGGTTTCTCCGGTCGATCATTG	AAATGGAAGAATTCTTCTCTTTG
W3	FOX_G258R	ACGTTGGATGCAGGACATCTGGATGGAGC	ACGTTGGATGGGAAGCTGTTAAGGCAAGGG	ccACATCTTGGATGGAGCCTCACCA
W3	OTOF_c_5785A-C	ACGTTGGATGTCACTTGGGTTTCTCTAGGG	ACGTTGGATGTTTACTGACAGCAGAGGAGG	GGTTTCTCTAGGGGTCAGGTTTCT
W3	CDH23_U1_6050-9G-A	ACGTTGGATGCCCTTTTCTGTGTGTTCC	ACGTTGGATGGTCAATGATGACACCTGACC	gGTGTGTTTCCCTGGCTGGCGGCACC
W3	GJB2_p_M34T	ACGTTGGATGTTGGAAAGATCTGGCTCACC	ACGTTGGATGATCTCCCCACACTCCTTTG	TCACCGTCTTTCATTTTTCGCATT
W4	GJB2_p_V95M	ACGTTGGATGCTGCAGCTGATCTTCGTGTC	ACGTTGGATGCCTTCTTCTCATGTCTCC	TCCTAGTGGCCATGCAC
W4	CDH23_D2045N	ACGTTGGATGTCATTGACCGGGAGGCATT	ACGTTGGATGATGGTGTGATGAGCAGGTGGG	TGCTGCTGCTGGCTGAG
W4	TMIE_R81C	ACGTTGGATGTCACGCTGTGCTGTCTTC	ACGTTGGATGTACATCTTGGCTGCCTTTCG	TGCTGTGCTTCAACTGT
W4	CDH23_D990N	ACGTTGGATGTGTACACGCCGGGAAGAAG	ACGTTGGATGTCTTCTGCGGCAGAAGCCA	AGAAGGTGGGCGTCTCGT
W4	FOX_G335V	ACGTTGGATGTGACCTTCAACTCCTTCTCC	ACGTTGGATGATAGCTGAGCATGTTGGTGG	AGCAACCACAGCGGTGGGG
W4	6013G-T_rs11843171	ACGTTGGATGATCCTGTGTTTTGCAAACGG	ACGTTGGATGTAACCCCTCCGGGAGTGCAG	TGGGGAGCAGGAAGGGTCA
W4	KCN_R348C	ACGTTGGATGCTTGAGCTTTTCAGGGTCTC	ACGTTGGATGGACCAAGTTGTGAAAGTGGC	CTTTTCAGGGTCTCCGTAGC
W4	SLC_IVS8A	ACGTTGGATGTTTCATATGGAGCCAACCTG	ACGTTGGATGTTAGTACTAAGAGGAACACC	GTAAATCCATCCCAAGGGG
W4	GJB2_p_E47X	ACGTTGGATGTATGATCCTCGTTGTGGCTG	ACGTTGGATGGCAGGGTGTTCAGACAAAG	GCAAAGGAGGTGTGGGGAGAT

W4	DFNB59_R183W	ACGTTGGATGTCTGTGCATGCTGGAATTCG	ACGTTGGATGTTCCCATGGCAACACTTTAG	TGGAATTCGAGGGGAAGCAATG
W4	CDH23_A1586P	ACGTTGGATGAACAAGGACATGGCCTTCCG	ACGTTGGATGCAGGTGGTAGAAGCTCTGG	TGGACCGCATCAGCGGTGAGATC
W4	GJB2_p_W24X	ACGTTGGATGCACAACGAGGATCATAATGC	ACGTTGGATGGTGTGAACAAACTCCACC	CGAAAAATGAAGAGGACGGTGAGC
W4	SLC_C282Y	ACGTTGGATGCTATAGGAATAGGGACTGGG	ACGTTGGATGTGCTGGATTGCTCACCATTG	tTCATTTAATTCCTTAAGTCCATA
W4	MYO15_c_3313G-T	ACGTTGGATGAGGCATGACCACAGCAAAAC	ACGTTGGATGAGCCCCCTTGGCGCCCATCA	CGCCAGGGGCTGCTGGCGCCGTT
W4	TMPR_c_916G-A	ACGTTGGATGAGCCTACAAGACCTCGTCC	ACGTTGGATGTTACCCTCATCGGTGTCTC	GCAGCTGGACTTACTGCAGGCAGCG
W4	CIB2_F91S	ACGTTGGATGTAGTTTGCCTTGAGCTCTCG	ACGTTGGATGTTTTCCGAGGATGGTGAAGG	aGCAGAGCACGGAAAACATGTCCACA
W4	TMPR_IVS4-6G-A	ACGTTGGATGTCCACTGGCCACTAATAAGC	ACGTTGGATGACGAAGCAGCTGTGAACACC	ACTAATAAGCCTTTCTTTCTGCACATC
W5	FOX_R267Q	ACGTTGGATGATCTTGGATGGAGCCTCACC	ACGTTGGATGAGGAAGCTGTTAAGGCAAGG	CAGTCCCCAGAGAAGC
W5	CDH23_R301Q	ACGTTGGATGTCTTTGCCCTGGACTACATC	ACGTTGGATGTTACAGTCAGGATGAAGCC	GAATGGCCTGCTGGACC
W5	SLC_c_1238A-G	ACGTTGGATGCTGTTGTTCTACCTGTGTC	ACGTTGGATGTTGTTTTGTGGCCACCACTG	CTTCTCCAGTGTCTCTCC
W5	OTOF_c_4960G-A	ACGTTGGATGAAGGTCTTCTGGTTCTGCTG	ACGTTGGATGACATGCTCGTCTGTGGGCTT	TGAGCCGCCGGCACCCACA
W5	CDH23_R2029W	ACGTTGGATGTTTCTGTGTGTTCCCTGGC	ACGTTGGATGAGGATGGGTGGCGAGAATG	GTCAGGTGTCATCATTGAC
W5	OTOF_c_2348delG	ACGTTGGATGTTCTCTCCCTCGCTGACAA	ACGTTGGATGCTCCCTCATGCAGGACTTGA	CCTCGCTGACAAGGACCAGG
W5	GJB2_p_L90P	ACGTTGGATGCTGCAGCTGATCTTCGTGTC	ACGTTGGATGCCTCTTCTTCTCATGTCTCC	TCGTGTCCACGCCAGCGCTCC
W5	GJB2_p_V153I	ACGTTGGATGATGGAGAAGCCGTCGTACAT	ACGTTGGATGACAAGCAGCATCTTCTCCG	CGTCGTACATGACATAGAAGA
W5	CIB2_I123T	ACGTTGGATGTGCCCTACAGACTTCAACAC	ACGTTGGATGCATCCAGCTCTGACTTAGTG	AGACTTCAACACTGACAACCTCA
W5	COCH_P51S	ACGTTGGATGGTTTTACCAGAGGCTTGGAC	ACGTTGGATGAGAGAATTCTCAAGAGGGC	AAGAGAAAGCAGATGTCTCTGC
W6	GJB2_p_R184W	ACGTTGGATGGCAGGATGCAAATCCAGAC	ACGTTGGATGTGTCCCAACTGTGGACTG	AGTCTTCTCCGTGGGCC
W6	FOX_G258E	ACGTTGGATGCAGGACATCTTGGATGGAGC	ACGTTGGATGGGAAGCTGTTAAGGCAAGGG	GGATGGAGCCTCACCAG
W6	TMPR_c_1221C-T	ACGTTGGATGACAGCCTCTCTTGTGACAC	ACGTTGGATGATCTCCCCCTCCATGCTCTG	CCTCTTGTGACACACCAGG

W6	OTOF_c_1552-1567del16	ACGTTGGATGTCTCCCCTGCTGACCTTTG	ACGTTGGATGACTCGGACAAGGTCAACGAC	GCTGACCTTTGTCTCCGTCA
W6	CIB2_C99W	ACGTTGGATGGGAACCTCACTTCAACGAC	ACGTTGGATGTAGTTTGCCTTGAGCTCTCG	GGACATGTTTTCCGTGCTCTG

3. Primers utilizados no rastreamento de mutações em genes mitocondriais.

Well	SNP-ID	Primer Capture F	Primer Capture R	Primer Extensão
W1	T4336C	ACGTTGGATGTAGGAGCTTAAACCCCTTA	ACGTTGGATGAGGTGGCACGGAGAATTTTG	ACCCCTTATTTCTAGGAC
W1	G8363A	ACGTTGGATGAGATTAAGAGAACCAACACC	ACGTTGGATGAATTATGGTGGCCATACGG	gCCAACACCTCTTACAGT
W1	T1291C	ACGTTGGATGTCAGCCTATATACCGCCATC	ACGTTGGATGCGTCTTTACGTGGTACTTG	AGCAAACCTGATGAAGGC
W1	C792T	ACGTTGGATGGCATCAAGCACGCAGCAATG	ACGTTGGATGTTAATCACTGCTGTTTCCCG	ATGCAGCTCAAAACGCTTAG
W1	A1555G	ACGTTGGATGACCCTCCTCAAGTATACTTC	ACGTTGGATGCACTTTCAGTACACTTACC	CCTACGCATTTATATAGAGGAG
W1	C7462T	ACGTTGGATGACCACACATTCGAAGAACCC	ACGTTGGATGGGCTTGAACCAGCTTTGGG	gCTAGACAAAAAAGGAAGGAAT
W1	T15908C	ACGTTGGATGAATACTCAAATGGGCCTGTC	ACGTTGGATGGGTTTTTCATCTCCGGTTTAC	GCCTGTCCTTGTAGTATAAACTAA
W1	T1180G	ACGTTGGATGCGAGCCACAGCTTAAACTC	ACGTTGGATGTCGATTACAGAACAGGCTCC	aaTAAACTCAAAGGACCTGGCGG
W1	T990C	ACGTTGGATGCTATTTTGTGTCAACTGGAG	ACGTTGGATGGAGTGTTTTAGATCACCCCC	cccTGTGTCAACTGGAGTTTTTAC
W1	A5568G	ACGTTGGATGTTTCAAGTTGATGCAGAGTGGG	ACGTTGGATGCCTTCAAAGCCCTCAGTAAG	atTCCTTAGCTGTTACAGAAATTAAG
W1	T669C	ACGTTGGATGGGATGCTTGCATGTGTAATC	ACGTTGGATGGCTCACATCACCCATAAAC	caTGTAATCTTACTAAGAGCTAATAG

W1	A856G	ACGTTGGATGGGGAAACAGCAGTGATTAAC	ACGTTGGATGATTGACCAACCCTGGGGTTA	gggAGCAATAAACGAAAGTTTAACTA
W2	G622A	ACGTTGGATGAGAAAGGCTAGGACCAAACC	ACGTTGGATGCTCCTCAAAGCAATACACTG	GGGGTGATGTGAGCCCGT
W2	C12224T	ACGTTGGATGCTTACGACCCCTTATTTACC	ACGTTGGATGGCCATGTTGTTAGACATGGG	CCGAGAAAGCTCACAAGAA
W2	G988A	ACGTTGGATGGAGTGTTTTAGATCACCCCC	ACGTTGGATGCTATTTTGTGTCAACTGGAG	gAAAGCTAAAACCTCACCTGA
W2	A839G	ACGTTGGATGCAACCCTGGGGTTAGTATAG	ACGTTGGATGGGGAAACAGCAGTGATTAAC	gAGCTTAGTTAAACTTTTCGTT
W2	A745G	ACGTTGGATGGTGAGTTCACCCTCTAAATC	ACGTTGGATGAGGCTAAGCGTTTTGAGCTG	gCCCTCTAAATCACCAGATCA
W2	G15927A	ACGTTGGATGAAATGGGCCTGTCCTTGATAG	ACGTTGGATGCTGATTTGTCCTTGAAAAAG	CTAATACACCAGTCTTGTAACC
W2	G5821A	ACGTTGGATGAGCTGCTTCTTCGAATTTG	ACGTTGGATGTCTAAAGACAGGGGTTAGGC	gAATTCAATATGAAAATCACCTC
W3	A636G	ACGTTGGATGCTGAAAATGTTTAGACGGGC	ACGTTGGATGGCTAATAGAAAGGCTAGGAC	TTAGACGGGCTCACATC
W3	A735G	ACGTTGGATGTGCGTGCTTGATGCTTGTTT	ACGTTGGATGTTACACATGCAAGCATCCCC	TGTTCTTTTGATCGTGG
W3	A1116G	ACGTTGGATGTTAAGCTGTGGCTCGTAGTG	ACGTTGGATGATACCCCACTATGCTTAGCC	CGAGCAGTTTTGTTGATT
W3	A1331G	ACGTTGGATGATTTCTTGCCACCTCATGGG	ACGTTGGATGTGAAGGCTACAAAGTAAGCG	CACCTCATGGGCTACACCT
W3	T4363C	ACGTTGGATGGGGCCCGATAGCTTATTTAG	ACGTTGGATGATGAGAATCGAACCCATCCC	GTGGCACGGAGAATTTTGG
W3	C1192A	ACGTTGGATGTCGATTACAGAACAGGCTCC	ACGTTGGATGCGAGCCACAGCTTAAACTC	aaAGAACAGGCTCCTCTAGA
W3	C1494T	ACGTTGGATGAGTTGAACAGGGCCCTGAAG	ACGTTGGATGCCTCTATATAAATGCGTAGGG	cccgACACACCGCCCGTCACC
W3	T1005C	ACGTTGGATGGTTAAAGCCACTTTCGTAGTC	ACGTTGGATGGCTAAAACCTCACCTGAGTTG	TTTCGTAGTCTATTTTGTGTCA
W3	A827G	ACGTTGGATGCACACCCCCACGGGAAACA	ACGTTGGATGCTGGGGTTAGTATAGCTTAG	gCACGGGAAACAGCAGTGATTA
W3	T5655C	ACGTTGGATGCCACTCTGCATCAACTGAAC	ACGTTGGATGTGTGGGTTTAAAGTCCATTG	CCACTTTAATTAAGCTAAGCCCT
W3	T10454C	ACGTTGGATGTGTAATGAGGGGCATTTGG	ACGTTGGATGCAAAACGAATGATTTGCACTC	tGGGGCATTGGTAAATATGATT
W3	A14693G	ACGTTGGATGGCATAACATCATTATTCTCGC	ACGTTGGATGCTTGTAGTTGAAATACAACG	ccCATTATTCTCGCACGGACTACA
W3	T5587C	ACGTTGGATGCCTTCAAAGCCCTCAGTAAG	ACGTTGGATGTTCAAGTTGATGCAGAGTGGG	GCAATACTTAATTTCTGTAACAGC

W3	T5802C	ACGTTGGATGGGTTTGAAGCTGCTTCTCG	ACGTTGGATGCCTCTTTTACCAGCTCCGA	ggGCTGCTTCTTCGAATTTGCAAT
W3	A1374G	ACGTTGGATGATGAGGTGGCAAGAAATGGG	ACGTTGGATGCCACCTTCGACCTTAAGTT	gGGCAAGAAATGGGCTACATTTTCT
W4	T5628C	ACGTTGGATGAAACCCCACTCTGCATCAAC	ACGTTGGATGGGGTTTAAAGTCCCATTGGTC	CATCAACTGAACGCAAA
W4	G709A	ACGTTGGATGTCGTGGTGATTTAGAGGGTG	ACGTTGGATGAGGTTTGGTCTAGCCTTTC	AGGGTGAACCTACTGGAA
W4	A801G	ACGTTGGATGGCATCAAGCACGCAGCAATG	ACGTTGGATGTTAATCACTGCTGTTTCCCG	AAACGCTTAGCCTAGCCAC
W4	C1226G	ACGTTGGATGTCATATCCCTCTAGAGGAGC	ACGTTGGATGCGGTATATAGGCTGAGCAAG	GTTCTGTAATCGATAAACCC
W4	T1452C	ACGTTGGATGTATACTTGAGGAGGGTGACG	ACGTTGGATGGTCGAAGGTGGATTTAGCAG	gggCAGGGCCCTGTTCAACT
W4	C1310T	ACGTTGGATGCAAACCCTGATGAAGGCTAC	ACGTTGGATGACCTCATGGGCTACACCTTG	GCTACAAAGTAAGCGCAAGTA
W4	G5540A	ACGTTGGATGACGCTACTCCTACCTATCTC	ACGTTGGATGTATTGCACTTACTGAGGGC	aAGGTTAAATACAGACCAAGA
W4	A7445C	ACGTTGGATGACCACACATTGGAAGAACCC	ACGTTGGATGGGCTTGAACCAGCTTTGGG	tAACCCGTATACATAAAATCTAG
W4	A1027G	ACGTTGGATGATCCCAGTTTGGGTCTTAGC	ACGTTGGATGCTCCAGTTGACACAAAATAG	GTGTTCAGATATGTTAAAGCCAC
W4	G12183A	ACGTTGGATGACCAAAACATCAGATTGTG	ACGTTGGATGGTTCCTGTGAGCTTCTCGG	gTCAGATTGTGAATCTGACAACA
W5	T642C	ACGTTGGATGCTCCTCAAAGCAATACACTG	ACGTTGGATGAGAAAGGCTAGGACCAAACC	GGGCTCACATCACCCCA
W5	A1453G	ACGTTGGATGGTCGAAGGTGGATTTAGCAG	ACGTTGGATGTATACTTGAGGAGGGTGACG	AACTAAGAGTAGAGTGCTT
W5	C1537T	ACGTTGGATGCCATGTTACGACTTGTCTCC	ACGTTGGATGACCCTCCTCAAGTATACTTC	CTTGTCTCTCTATATAAATGC
W5	A7456G	ACGTTGGATGACCACACATTGGAAGAACCC	ACGTTGGATGGGCTTGAACCAGCTTTGGG	CATAAAATCTAGACAAAAAAGGA
W5	A4316G	ACGTTGGATGCTGATAAAAGAGTTACTTTG	ACGTTGGATGGGGTTCGATTCTCATAGTCC	GATAGAGTAAATAATAGGAGCTTA

ANEXO 5

- Análise da genotipagem de cada *SNP* nos controles positivos (1Del2, 2Del2 e 3Del1) e negativos (C15, C16 e C19), utilizando a Técnica de Espectrometria de Massa iPLEX Gold-Sequenom. A localização dos *SNPs* no cromossomo 13, os alelos identificados assim como, a área dos picos de amplificação são mostrados na tabela abaixo.

<i>SNP</i>	Crom.13	Alleles	1 Del2	Area	2 Del2	Area	3Del1	Area	C15	Area	C16	Area	C19	Area
rs4272877	19656134	T/C	T	348.72	T	301.25	T	168.44	T	198.43	T	340.52		
							C	177.13	C	188.54			C	273.26
rs9315384	19682018	T/C	C	94.80			C	92.96	C	24.36	C	121.20	C	67.76
			T	86.66	T	177.09			T	28.88				
rs7981756	19688742													
			C	39.18	C	67.84	A	32.30	C	13.48	C	39.18	C	67.84
rs945366	19699844	G/A	T	113.20	T	126.63			T	74.35			T	56.90
					C	113.20	C	67.40	C	75.31	C	98.11		
rs945372	19713271	G/A			T	187.23	T	91.51	T	110.42	T	87.51	T	82.00
			C	132.23					C	87.17	C	79.84	C	83.71
rs9509119	19722043	G/A	G	196.35			G	177.24	G	122.88	G	98.69	G	111.88
					A	292.22			A	202.89	A	189.85		
rs10492508	19727582	T/C	G	34.44			G	44.44	G	11.33	G	25.74	G	26.54
					A	32.47								
rs7319601	19736219	G/A			G	23.07	G	25.07	G	24.96	G	26.12	G	35.38
			A	40.26					A	22.84	A	28.53		
rs9652061	19744172	C/T	C	167.58			C	141.21	C	97.51	C	173.22	C	145.21
					T	182.68			T	146.68				
rs9509128	19756775	G/C			G	136.76	G	69.78	G	65.02				
			C	130.33							C	112.12	C	46.75
rs7327522	19769195	A/G			G	147.91	G	101.46	G	78.80	G	96.95	G	62.95
			A	140.07							A	68.55	A	26.89

rs7323769	19775866	A/G			A	189.23	A	203.06	A	217.09	A	145.78	A	149.13
			G	216.22							G	117.41	G	137.13
rs 9550633	19784909	A/G					G	51.11			G	44.32	G	45.32
			A	60.00	A	71.94			A	43.79	A	33.35	A	34.31
rs 9578271	19790442	C/T												
			C	38.27	C	52.53	C	28.85	C	29.44	C	35.74		
rs 11147641	19795528	C/T							T	162.87			T	172.21
			C	180.75	C	137.04	C	181.44	C	117.23	C	216.14	C	151.45
rs 12868032	19808048	C/T	C	224.00	C	150.80			C	176.75	C	135.28	C	139.17
							T	203.64	T	166.46	T	166.1	T	117.69
rs 9315492	19818058	G/A												
			G	31.70	G	50.97	G	34.54	G	34.97	G	38.23	G	19.04
rs 9550638	19824553	C/T							T	13.60			T	53.27
			C	46.50	C	71.78	C	58.43	C	19.37	C	65.09		
rs 9552152	19831535	A/G												
			A	61.31	A	40.96	A	40.39	A	21.32	A	58.48	A	26.06
rs 944015	19837005	G/A												
			C	207.04	C	199.37	C	101.40	C	131.24	C	168.44	C	102.98
rs 4770014	19842343	C/A	C	236.64	C	256.86	C	231.00	C	239.23	C	231.01	C	208.45
rs 17081227	19848071	A/T												
			A	256.29	A	168.47	A	127.65	A	121.02	A	196.02	A	126.85
rs 9509191	19853431	A/T							A	38,44			No allele	
			T	34,77	T	23,46	T	25,7			T	25,28	No allele	
rs 4331204	19860029	T/C	C	319.67			C	310.25	C	258.40	C	264.92	C	331.14
					T	327.65			T	182.18	T	169.29		
rs 6650231	19870722	C/T											No allele	
			C	134.68	C	143.83	C	80.09	C	77.92	C	104.00	No allele	
rs 9506487	19896937	G/A	G	141.77	G	141.30	G	78.33	G	108.59	G	108.40	G	38.84

													A	24.41
rs 4770027	19905342	A/G							A	27.19	A	55.03	A	53.85
			G	80.65	G	82.74	G	49.87	G	35.87	G	49.54		
rs 9552183	19913215	C/T	C	29.06	C	53.35	C	12.49	No allele		C	29.79		
									No allele				T	17.63
rs 3936015	19928892	C/A	G	179.97			G	172.96	G	218.62	G	80.59	G	172.33
					T	152.89					T	119.82		
rs 9315607	19939654	T/A							No allele		No allele			
			A	46.72	A	48.75	A	45.73	No allele		No allele		A	13.01
rs 9506494	19945858	T/C							C	29.92			C	31.65
			T	150.00	T	120.42	T	73.71	T	23.12	T	106.20	T	18.46
rs 7321826	19951366	T/A	T	57.63	T	119.58	T	61.61	T	47.18	T	82.66	T	24.95
rs 9506498	19958833	C/T	C	125.25	C	124.83	C	67.40		45.08	C	91.28	C	31.08
									T	30.71			T	22.56
rs 9509249	19966045	A/C					C	19.61	C	19.61	C	19.79		
			A	42.75	A	42.95								
rs 7335998	19971094	G/C							C	71.01				
			G	166.57	G	143.46	G	132.15	G	80.78	G	143.95	G	129.28
rs 2314232	19985335	T/C	C	77.42	C	73.19			C	24.34	C	49.97	C	53.66
			T	86.71	T	83.07	T	70.90	T	23.36	T	54.85		
rs 9509266	19994681	C/G			C	113.50	C	248.37			C	146.29		
			G	269.55	G	106.21			G	281.12	G	135.45	G	234.86